

(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2005-500245

(P2005-500245A)

(43) 公表日 平成17年1月6日(2005. 1. 6)

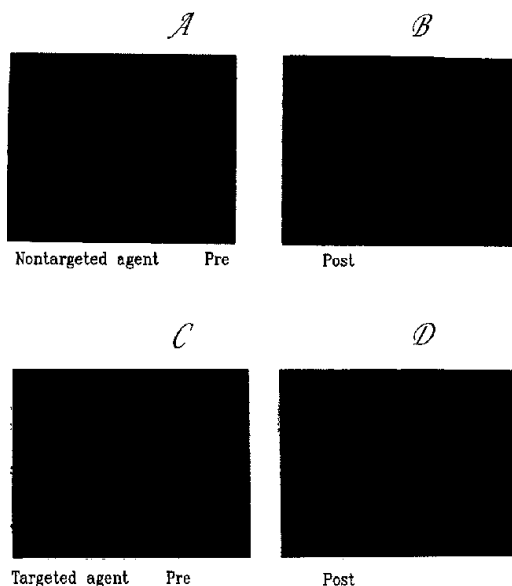
(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 49/00	A 6 1 K 49/00 C	4 C 0 7 6
A 6 1 B 5/055	A 6 1 K 41/00 Z N A	4 C 0 8 4
A 6 1 K 41/00	A 6 1 K 47/48	4 C 0 8 5
A 6 1 K 47/48	A 6 1 P 7/02	4 C 0 9 6
A 6 1 P 7/02	A 6 1 P 9/10	4 C 6 0 1
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 350 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-538970 (P2002-538970)	(71) 出願人	503156965
(86) (22) 出願日	平成13年10月17日 (2001. 10. 17)		イマックス セラピューティクス、インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成15年4月28日 (2003. 4. 28)		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) 国際出願番号	PCT/US2001/032308	(74) 代理人	100066692
(87) 国際公開番号	W02002/036161		弁理士 浅村 皓
(87) 国際公開日	平成14年5月10日 (2002. 5. 10)	(74) 代理人	100072040
(31) 優先権主張番号	09/699, 679		弁理士 浅村 肇
(32) 優先日	平成12年10月30日 (2000. 10. 30)	(74) 代理人	100088926
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 長沼 暉夫
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR) , AU, CA, JP	(74) 代理人	100102897
			弁理士 池田 幸弘
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 診断及び治療に使用するための新規のターゲット化組成物

(57) 【要約】

診断及び治療用途のために使用することができる新規のターゲット化組成物。この組成物は、脂質、タンパク質又はポリマーガス充填ベシクルを含有し、これはさらに、一般式：L-P-Tの新規の化合物を含有する〔式中、Lは、疎水性化合物を含み、Pは、親水性ポリマーを含み、かつTは、心筋細胞、内皮細胞、上皮細胞、腫瘍細胞及び糖タンパク質G P I I b I I I a受容体を含む組織、細胞又は受容体をターゲットとするターゲッティングリガンドを含む〕。組成物は、超音波などの画像診断、さらに治療用超音波などの治療用途と組み合わせて使用することができる。

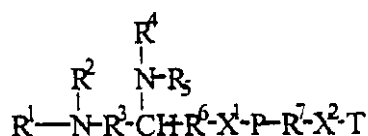


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

次式を有する化合物

【化 1】



(IV)

10

[上式中、

X^1 及び X^2 は独立に、直接結合あるいは $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^8)-$ 、 $-\text{C}(=\text{X}^3)-$ 、 $-\text{C}(=\text{X}^3)-\text{N}(\text{R}^8)-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^8)-\text{C}(=\text{X}^3)-$ 及び $-\text{C}(=\text{X}^3)-\text{N}(\text{R}^8)-\text{C}(=\text{X}^3)-$ からなる群から選択される架橋原子又は基であり；

X^3 は、 $-\text{O}-$ 又は $-\text{S}-$ であり；

R^1 は、約 7 個から約 23 個の炭素からなるアシルであり；

R^2 は、水素又は低級アルキルであり；

R^3 は、直接結合又は 1 から約 10 個の炭素からなるアルキレンであり；

20

R^4 は、約 7 個から約 23 個の炭素からなるアシルであり；

R^5 は、水素又は低級アルキルであり；

R^6 及び R^7 は独立に、直接結合又は 1 から約 10 個の炭素からなるアルキレンであり；

R^8 は、水素又は低級アルキルであり；

P は、親水性ポリマーであり；かつ

T は、心筋細胞、内皮細胞、上皮細胞、腫瘍細胞及び糖タンパク質 GPIIb/IIIa 受容体からなる群から選択される細胞又は受容体をターゲットとするターゲットングリガンドである]。

【請求項 2】

式中、

30

X^1 及び X^2 は独立に、 $-\text{C}(=\text{X}^3)-$ 、 $-\text{C}(=\text{X}^3)-\text{N}(\text{R}^8)-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^8)-\text{C}(=\text{X}^3)-$ 及び $-\text{C}(=\text{X}^3)-\text{N}(\text{R}^8)-\text{C}(=\text{X}^3)-$ からなる群から選択される架橋基であり；

R^1 は、約 10 個から約 22 個の炭素からなるアシルであり；

R^2 は、水素であり；

R^3 は、1 から約 10 個の炭素からなるアルキレンであり；

R^4 は、約 10 個から約 22 個の炭素からなるアシルであり；

R^5 は、水素であり；

R^6 及び R^7 は独立に、直接結合又は低級アルキレンであり；かつ

R^8 は、水素である、請求項 1 に記載の化合物。

40

【請求項 3】

式中、

X^1 は、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ であり；

X^2 は、 $-\text{C}(=\text{O})-$ であり；

R^1 は、約 15 個から約 20 個の炭素からなるアシルであり；

R^3 は、1 から約 3 個の炭素からなるアルキレンであり；

R^4 は、約 15 個から約 20 個の炭素からなるアシルであり；かつ

R^6 は、直接結合であり；

R^7 は、低級アルキレンである、請求項 2 に記載の化合物。

【請求項 4】

50

式中、

R^1 は、約 17 個から約 19 個の炭素からなるアシルであり；

R^3 は、メチレンであり；

R^4 は、約 17 個から約 19 個の炭素からなるアシルであり；かつ

R^7 は、エチレンである、請求項 3 に記載の化合物。

【請求項 5】

式中、

R^1 及び R^2 は、約 18 個の炭素からなるアシルである、請求項 4 に記載の化合物。

【請求項 6】

前記の親水性ポリマーが、ポリアルキレンオキシド、ポリビニルアルコール、ポリビニル
ピロリドン、ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリホスファゼン、ポリ（ヒ
ドロキシアルキルカルボン酸）及びポリオキサゾリジンからなる群から選択されている、
請求項 1 に記載の化合物。 10

【請求項 7】

前記の親水性ポリマーが、ポリアルキレンオキシドを含有する、請求項 6 に記載の化合物
。

【請求項 8】

前記の親水性ポリマーが、ポリエチレングリコール及びポリプロピレングリコールからな
る群から選択されている、請求項 7 に記載の化合物。

【請求項 9】

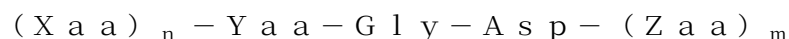
前記の親水性ポリマーが、ポリエチレングリコールである、請求項 8 に記載の化合物。 20

【請求項 10】

前記の親水性ポリマーが、PEG 3400 である、請求項 8 に記載の化合物。

【請求項 11】

前記のターゲッティングリガンドが、次式のペプチドを包含する、請求項 1 に記載の化合
物



[上式中、

m 及び n は独立に、1 から約 100 の整数であり；

Xaa 及び Zaa は独立に、天然アミノ酸及び合成アミノ酸からなる群から選択され； 30

Yaa は、アルギニン、ホモアルギニン及びリジン-N-アセトイミデートであり；

ただし、 Xaa 及び Zaa が、イオウを含有するアミノ酸である場合には、 Xaa 及び Zaa は、ジスルフィド結合を介して相互に結合してよい]。

【請求項 12】

式中、

Xaa は、グリシンであり；

Yaa は、アルギニンであり；

Zaa は、セリンであり；

n は、1、2 又は 3 であり；かつ

m は、1 である、請求項 11 に記載の化合物。 40

【請求項 13】

式中、

n は、3 である、請求項 12 に記載の化合物。

【請求項 14】

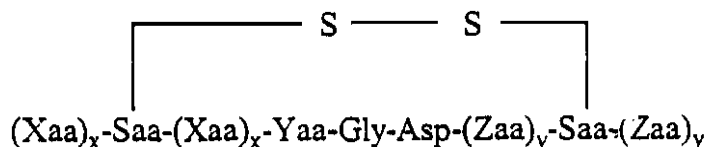
式中、

Xaa 及び Zaa が、イオウ含有アミノ酸から独立に選択されるアミノ酸を包含する、請
求項 11 に記載の化合物。

【請求項 15】

前記のターゲッティングリガンドが、次式のペプチドを包含する、請求項 1 に記載の化合
物

【化 2】



〔上式中、

x 及び y はそれぞれ独立に、0 から約 50 の整数であり；

Saa はそれぞれ、天然及び合成のイオウ含有アミノ酸からなる群から選択され；

Xaa 及び Zaa はそれぞれ独立に、中性アミノ酸及び合成アミノ酸からなる群から選択され；かつ

Yaa は、アルギニン、ホモアルギニン及びリジン-N-アセトイミデートから選択される〕。

【請求項 16】

Saa はそれぞれ独立に、D-システイン、L-システイン、D-ペニシラミン及び L-ペニシラミンからなる群から選択される、請求項 15 に記載の化合物。

【請求項 17】

水性キャリア中に脂質、タンパク質又はポリマーガス充填ベシクルを含有する、インビボで治療的又は診断的に使用するためのターゲット化ベシクル組成物において、前記のベシクルがさらに請求項 1 に記載の化合物を含有する、ターゲット化ベシクル組成物。

【請求項 18】

前記のベシクルが、リポソーム及びミセルからなる群から選択されている、請求項 17 に記載のターゲット化ベシクル組成物。

【請求項 19】

前記のベシクルが、リポソームを包含する、請求項 18 に記載のターゲット化ベシクル組成物。

【請求項 20】

前記のリポソームが、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン及びホスファチジン酸からなる群から選択されるリン脂質を含有する、請求項 19 に記載のターゲット化ベシクル組成物。

【請求項 21】

前記のホスファチジルコリンが、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジミリストイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン及びジステアロイルホスファチジルコリンからなる群から選択されている、請求項 20 に記載のターゲット化ベシクル組成物。

【請求項 22】

前記の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包含する、請求項 21 に記載のターゲット化ベシクル組成物。

【請求項 23】

前記のホスファチジルエタノールアミンが、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、N-スクシニルジオレオイルホスファチジルエタノールアミン及び 1-ヘキサデシル-2-パルミトイルグリセロホスホエタノールアミンからなる群から選択されている、請求項 20 に記載のターゲット化ベシクル組成物。

【請求項 24】

前記の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包含する、請求項 23 に記載のターゲット化ベシクル組成物。

【請求項 25】

前記のホスファチジン酸が、ジパルミトイルホスファチジン酸を包含する、請求項 20 に記載のターゲット化ベシクル組成物。

【請求項 26】

前記のベシクルが、ペルフルオロ炭化水素及び六フッ化イオウからなる群から選択されるガスを含む、請求項 17 に記載のターゲット化ベシクル組成物。

【請求項 27】

前記のペルフルオロ炭化水素ガスが、ペルフルオロメタン、ペルフルオロエタン、ペルフルオロプロパン、ペルフルオロブタン及びペルフルオロシクロブタンからなる群から選択されている、請求項 26 に記載のターゲット化ベシクル組成物。

【請求項 28】

前記のペルフルオロ炭化水素ガスが、ペルフルオロプロパン及びペルフルオロブタンからなる群から選択されている、請求項 27 に記載のターゲット化ベシクル組成物。

10

【請求項 29】

前記のペルフルオロ炭化水素ガスが、ペルフルオロブタンを含む、請求項 28 に記載のターゲット化ベシクル組成物。

【請求項 30】

前記のガスが、少なくとも部分的にガス前駆体由来する、請求項 17 に記載のターゲット化ベシクル組成物。

【請求項 31】

前記のガス前駆体が、約 37℃を上回る沸点を有する、請求項 30 に記載のターゲット化ベシクル組成物。

【請求項 32】

前記のガス前駆体が、ペルフルオロ炭化水素を含む、請求項 31 に記載のターゲット化ベシクル組成物。

20

【請求項 33】

前記のペルフルオロ炭化水素が、ペルフルオロペンタン及びペルフルオロヘキサンからなる群から選択される、請求項 32 に記載のターゲット化ベシクル組成物。

【請求項 34】

前記のベシクルがさらに、前記のガス及び前記の化合物とは異なる生物活性剤を含む、請求項 17 に記載のターゲット化ベシクル組成物。

【請求項 35】

前記の生物活性剤が、遺伝物質、ジヒドロエルゴタミン、硫酸ヘパリン、組織プラスミノゲンアクチベーター、ストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ、ヒルジン及びこれらの混合物からなる群から選択される治療薬を含む、請求項 34 に記載のターゲット化ベシクル組成物。

30

【請求項 36】

患者の局部内の血栓を撮像する方法において、(i) 請求項 17 に記載のターゲット化ベシクル組成物を患者に投与するステップと、(ii) 画像診断により、患者の前記の局部を走査するステップとを含む方法。

【請求項 37】

前記の画像診断が、診断用超音波を含む、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

患者の前記の局部が、心臓部を含む、請求項 37 に記載の方法。

40

【請求項 39】

血管中の血栓を溶解する方法において、(i) 静脈内注入により、請求項 17 に記載のターゲット化ベシクル組成物を患者に投与するステップと、(ii) 画像診断により、前記の患者を走査して、前記の血栓を可視化するステップと、(iii) 超音波エネルギーを前記の血栓に適用するステップとを含む方法。

【請求項 40】

血管中の血栓を溶解する方法において、(i) 静脈内注入により、請求項 35 に記載のターゲット化ベシクル組成物を患者に投与するステップと、(ii) 画像診断により、前記の患者を走査して、前記の血栓を可視化するステップと、(iii) 超音波エネルギーを

50

前記の血栓に適用するステップとを包含する方法。

【請求項 4 1】

患者の体内局部の画像を得る方法において、(i) 請求項 1 7 に記載のターゲット化ベシクル組成物を患者に投与するステップと、(ii) 超音波を使用して、患者を走査し、局部の可視画像を得るステップとを包含する方法。

【請求項 4 2】

前記のターゲッティングリガンドが、動脈硬化の局部をターゲットとする、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記の動脈硬化が、アテローム斑を包含する、請求項 4 1 に記載の方法。

10

【請求項 4 4】

前記のターゲッティングリガンドが、梗塞している心筋をターゲットとする、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記のターゲッティングリガンドが、ガン細胞をターゲットとする、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 6】

患者の体内にある病的組織の存在を診断する方法において、(i) 請求項 1 7 に記載のターゲット化ベシクル組成物を患者に投与するステップと、(ii) 超音波を使用して、患者を走査し、局部の可視画像を得るステップとを含む方法。

20

【請求項 4 7】

前記のターゲッティングリガンドが、動脈硬化の局部をターゲットとする、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記の動脈硬化が、アテローム斑を包含する、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記のターゲッティングリガンドが、梗塞している心筋をターゲットとする、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記のターゲッティングリガンドが、ガン細胞をターゲットとする、請求項 4 6 に記載の方法。

30

【請求項 5 1】

生物活性剤をインビボで治療輸送するための方法において、(i) 治療的に有効な量の、請求項 3 4 に記載のターゲット化ベシクル組成物を患者に投与するステップと、(ii) 超音波エネルギーを患者に適用して、前記のターゲットベシクルから前記の生物活性剤を放出するステップとを包含する方法。

【請求項 5 2】

前記の超音波エネルギーにより、前記のベシクルを破裂させる、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

画像診断により、患者を走査して、ターゲット部位でベシクルを可視化するステップをさらに含む、請求項 5 1 に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、新規のターゲット化組成物及びその使用に関する。特に本発明は、新規の化合物及びこれらの化合物を含有するターゲット化組成物並びに画像診断及び／又は生物活性剤の投与のためのこれらの組成物の使用方法に関する。

【0002】

(発明の背景)

50

疾患を診断するために、様々な撮像技術が使用されている。これらの撮像技術には、X線撮像が含まれる。X線では、生じる画像は、患者の体内の構造及び組織間の異なる密度を反映する。この撮像技術の診断的有用性を改善するために、造影剤 (c o n t r a s t a g e n t s) を使用して、周囲組織に比較して該当組織の密度を高めることができる。このような造影剤の例には例えば、食道、胃、腸及び直腸を含む胃腸部のX線調査のために使用することができるバリウム、ヨウ化化合物が含まれる。さらに造影剤を、コンピュータ断層撮影 (C T) 及びコンピュータ連動断層撮影 (C A T) 調査で使用する、該当組織、例えば胃腸管の可視化を改善するために使用することもできる。

【0003】

磁気共鳴映像法 (M R I) は、X線とは異なり、イオン化放射線を必要としない別の撮像技術である。M R I は、様々な走査面、例えば軸方向、冠方向、矢状方向又は直交方向で、体の断面画像を得るために使用することができる。M R I は、磁場、高周波エネルギー及び磁場勾配を用いて、体の画像を作成する。組織間のコントラスト又はシグナル強度差は、T 1 (縦) 及び T 2 (横) 緩和値及び、遊離水に通常は対応している組織のプロトン密度を反映している。造影剤を使用して、患者の局部でのシグナル強度を変えるために、いくつかの可能なアプローチを利用することができる。例えば、T 1 又は T 2 又はプロトン密度を変えるように、造影剤を設計することができる。

【0004】

一般的には、M R I は、造影剤の使用を必要とする。造影剤を使用することなく、M R I を行うと、生じた画像中で、該当組織と周囲組織とを判別することは難しい。以前には、M R I では常磁性造影剤が第一に、注目されていた。常磁性造影剤は、不対電子を含有する物質を必要とする。不対電子は、主磁場内で小さな磁石として作用して、縦 (T 1) 及び横 (T 2) 緩和の速度を高める。常磁性造影剤は通常、不対電子源をもたらす金属イオン、例えば、遷移金属イオンを含有する。しかしながら、これらの金属イオンは通常、極めて毒性である。毒性を低減しようと、金属イオンは通常、リガンドでキレート化される。

【0005】

特に酸化鉄である金属酸化物が、M R I 造影剤として使用されている。酸化鉄の小さい粒子、例えば、約 20 nm 未満の直径を有する粒子は、望ましい常磁性緩和特性を有するが、これらの主な効果は、体積磁化率に基づく。ニトロキシドは、これも常磁性である M R I 造影剤の別の群である。これらは比較的低い緩和性を有し、通常は、常磁性イオンよりも低い有効性を有する。

【0006】

存在する M R I 造影剤は、数多くの制限を受けている。例えば、キレート化金属が含まれる造影剤を含む特定の造影剤は、高い画像ノイズを伴うことがある。このノイズは通常、固有ぜん動運動並びに呼吸又は心臓血管作用からの運動により生じる。加えて、造影剤でのシグナル強度は通常、使用される造影剤の濃度及びパルス系列に左右される。十分に高濃度の常磁性種を使用しない限り、造影剤の吸収によって、特に、小腸の遠位部で、画像の解釈が複雑になりうる。例えば、K o r n m e s s e r e t a l, M a g n e t i c R e s o n a n c e I m a g i n g, 6 : 1 2 4 (1 9 8 8) 参照。

【0007】

他の造影剤は、パルス系列のバリエーションに対して感度が低く、より一貫したコントラストをもたらさう。しかしながら、高い濃度のフェライトなどの粒子は、例えば、腸管液体の吸収が生じ、超常磁性物質が濃縮される結腸で特に明白である磁化率アーチファクトをもたらさう。

【0008】

毒性が、もう 1 つの問題であり、これは通常、M R I のための造影剤を含む近年利用されている造影剤に随伴する。例えば、フェライトは往々にして、経口投与の後に、悪心、さらに鼓腸及び血清鉄の一過性の上昇の症状を惹起する。G d - D T P A 中で錯化されているガドリニウムイオンは、遊離の形では極めて毒性である。胃での高い酸性度 (低い p H

10

20

30

40

50

）及び腸での高いアルカリ度（高いpH）を含む胃腸管の様々な環境により、錯体からの遊離イオンの脱カップリング及び分離の確度が高まることがある。

【0009】

超音波は、例えば、組織微小血管などの血管系を含む体の様々な範囲を調査するための別の有用な画像診断技術である。超音波は、他の診断技術を上回るある程度の利点をもたらす。例えば、核医学及びX線を用いる診断技術は通常、患者を電離電子線に暴露することを含む。このような放射線は、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）及びタンパク質を含む細胞内物質に損傷をもたらさう。超音波は、このような強力な損傷放射線を用いない。加えて、超音波は、精巧で高価な装置を必要とするCT及びMRIを含む他の診断技術に比較して、比較的安価である。

10

【0010】

超音波は、患者を音波に暴露することを含む。通常、音波は、体組織によって吸収されることにより散逸されるか、組織を貫通するか、又は組織に反射される。通常は、後方散乱又は反射率と称される組織による波長の反射が、超音波画像を現像するためのベースとなる。これに関して、音波は、様々な体組織から様々な反射される。この異なる反射は、観察される特定の組織の成分及び密度を含む様々なファクターに基づく。超音波は、1メガヘルツ（MHz）から10MHzの周波数を有する音波を検出することができるトランスデューサーを通常は用いて、様々な反射された音波を検出することを含む。検出された音波を集積して、定量化された画像にし、組織の画像に変換された定量化音波を、調査することができる。

20

【0011】

前記の診断技術のように、超音波は通常、造影剤の使用を必要とする。代表的な造影剤には例えば、固体粒子の懸濁液、乳化液滴及びガス充填気泡が含まれる。例えば、Hilmanらの米国特許第4466442号及び公開国際特許出願WO92/17212号及びWO92/21382号参照。Widderらの公開出願EP-A第0324938号には、熱変性可能な生体適合性タンパク質、例えばアルブミン、ヘモグロビン及びコラーゲンから製造された安定化マイクロ気泡タイプ超音波造影剤（imaging agent）が開示されている。

【0012】

超音波から得られた画像の品質は、大幅に改善された。しかしながら、特に、血管血液供給で灌流される組織中の血管系に関する画像に関しては、更なる改善が必要である。したがって、血管系及び血管関連臓器の医学的に有用な画像を得ることができる改善された造影剤を含む改善された超音波技術に対する必要性が存在する。

30

【0013】

液-ガス界面からの音波の反射は、極めて有効である。したがって、ガス充填バブルを含むバブルは、造影剤として有用である。ここで使用する場合、「バブル」との用語は、ガス又はその前駆体を充填されている内部ボイドを取り囲む1つ又は複数の膜又は壁の存在により通常は特徴付けられるベシクルに関する。代表的なバブルには例えば、リポソーム、ミセルなどが含まれる。後記でより詳細に記載するように、造影剤としてのバブルの有効性は、例えば、バブルのサイズ及び／又は弾性を含む様々なファクターに応じる。

40

【0014】

バブルサイズの効果に関しては、次の見解が得られている。専門家には知られているように、バブルに反射されるシグナルは、バブルの半径（ r^6 ）の関数である（レイリー散乱体）。したがって、診断用超音波の周波数範囲では、4マイクロメートル（ μm ）の直径を有するバブルは、2 μm の直径を有するバブルに対して、64倍の散乱能を有する。したがって一般的に、バブルが大きくなるほど、反射されるシグナルは大きくなる。

【0015】

しかしながら、バブルサイズは、バブルが通過すべき毛細血管の直径に制限される。通常、10 μm を上回る直径を有するバブルを含む造影剤は危険なものとなりうる。それというのも、微細血管が閉塞されうるためである。したがって、造影剤中のバブルの約99%

50

以上が、 $10\text{ }\mu\text{m}$ 未満の直径を有するのが望ましい。平均バブル直径も重要であり、 $1\text{ }\mu\text{m}$ を上回るべきであり、 $2\text{ }\mu\text{m}$ を上回るのが好ましい。バブルの容量加重 (volume weighted) 平均直径は、約7から $10\text{ }\mu\text{m}$ であるべきである。

【0016】

バブルの弾性も、重要である。この理由は、高度に弾性なバブルは変形して、必要な場合には、毛細血管に「押し入る」か、かつ／又はバブルの周囲に血液が流れるようにすることができるためである。これにより、梗塞の可能性が低減される。バブルを含む造影剤の有効性は、バブル濃度にも左右される。通常、バブル濃度が高くなるほど、造影剤の反射率は大きくなる。

【0017】

造影剤としてのバブルの有効性に関する他の重要な特性は、バブル安定性である。ここで使用する場合、特に、ガス充填バブルに関して、「バブル安定性」とは、気圧よりも高い圧力にさらされた後にも、その中に捕捉されているガスを保持するバブルの能力のことである。造影剤として有効であるためには、バブルは通常、水銀 (Hg) 300 mm (mm) の圧力に約1分間さらされた後に、捕捉されているガスの50%より多くを保持することを必要とする。特に有効なバブルは、Hg 300 mm の圧力に1分間さらされた後に、捕捉されているガスの75%を維持し、90%の捕捉ガス含有率は、極めて有効な造影剤をもたらす。放圧した後に、バブルが本来のサイズに戻ることが、特に望ましい。このことは通常、「バブル回復性」と称される。

【0018】

所望の安定性を備えていないバブルは、不十分な造影剤をもたらす。例えば、バブルがその中に捕捉されているガスをインビボで放出すると、反射率は低下する。同様に、低い回復性を有するバブルのサイズも、インビボで低減して、低い反射率をもたらす。

【0019】

先行技術で開示されているバブルの安定性は通常、造影剤として使用するには不十分である。例えば、先行技術は、脂質含有壁又は膜を含むバブルを開示しており、これには、ガス充填リポソームが含まれる。例えば、Ryanらの米国特許第4900540号及び同第4544545号；Ticknerらの米国特許第4276885号；KlavenssらのWO93/13809号及びSchneiderらのEPO第0554213号及びWO91/15244号参照。LanzaらのWO93/20802号は、音響的に反射性のオリゴメラリポソームを開示しており、これは、二分子層の間に高い水性スペースを有するマルチメラリポソームであるか、非同心的に二分子層の間に組み込まれているリポソームを有して、内部で分かれている二分子層を含む。超音波撮像を強化するための超音波造影剤としてのその使用及び患者に投与されたりポソーム中に輸送されている薬剤を監視する際のその使用も、記載されている。D'Arrigoの米国特許第4684479号及び同第5215680号はそれぞれ、液中ガスエマルジョン及び脂質コーティングされているマイクロバブルを開示している。

【0020】

先行技術に開示されているバブルの多くは、不本意にも、不十分な安定性を有する。したがって、先行技術のバブルは、インビボで壊れやすく、例えば、中に含有されている治療薬及び／又は診断薬の早すぎる放出が生じる。バブル安定性を改善しようとして、様々な研究が行われている。このような研究には例えば、その膜又は壁が、アルブミンなどのタンパク質又は架橋によりかなり強化された物質を含有するバブルの調製が含まれる。例えば、生分解性架橋剤で架橋されているタンパク質を含有するバブルが開示されているKlavenssらのWO92/17212号参照。Moseleyらにより、1991年のカリフォルニア州ナパでのSociety for Magnetic Resonance in Medicineの会合において、「Microbubbles: A Novel MR Susceptibility Contrast Agent」と称される要約書にまとめられたプレゼンテーションが行われた。Moseleyらにより記載されたマイクロバブルは、ヒトアルブミンのシェルでコーティングされている気体を含む

10

20

30

40

50

。もしくは、バブル膜は、タンパク質ではないが、生体適合性化合物と架橋する化合物を含有してよい。例えば、K l a v e n e s s らのWO 9 2 / 1 7 4 3 6 号、WO 9 3 / 1 7 7 1 8 号及びWO 9 2 / 2 1 3 8 2 号参照。

【0021】

外側膜にタンパク質を使用するか、膜成分を架橋させることを含む、バブルを安定化するための先行技術は、様々な欠点を有する。例えば、前記の架橋は通常、それに関する代謝予定が知られていない架橋タンパク質又は他の化合物を含む新規の材料を使用することを伴う。加えて、架橋は、架橋化合物の単離及び精製を含む付加的な化学的プロセスステップを必要とする。さらに、アルブミンなどのタンパク質からなるバブル膜の使用及びバブル膜成分の架橋は、バブルの壁に剛性を与える。これにより、低い弾性を有し、したがって変形し、毛細血管を通過する能力の低いバブルが生じる。このように、タンパク質及び／又は架橋を必要とする先行技術の造影剤では、血管の閉塞の可能性が高い。 10

【0022】

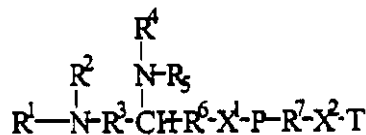
したがって、新規かつ／又は改良された安定化造影剤及びその製造方法が必要である。本発明は、このこと、さらに他の重要な目的を対象としている。

【0023】

(発明の概要)

本発明は、1 つには、次式を有する新規の化合物を対象とする

【化3】



20

(IV)

[上式中、

X^1 及び X^2 は独立に、直接結合あるいは $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^8)-$ 、 $-\text{C}(=\text{X}^3)-$ 、 $-\text{C}(=\text{X}^3)-\text{N}(\text{R}^8)-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^8)-\text{C}(=\text{X}^3)-$ 及び $-\text{C}(=\text{X}^3)-\text{N}(\text{R}^8)-\text{C}(=\text{X}^3)-$ からなる群から選択される架橋原子又は基であり； 30

X^3 は、 $-\text{O}-$ 又は $-\text{S}-$ であり；

R^1 は、約7個から約23個の炭素からなるアシルであり；

R^2 は、水素又は低級アルキルであり；

R^3 は、直接結合又は1から約10個の炭素からなるアルキレンであり；

R^4 は、約7個から約23個の炭素からなるアシルであり；

R^5 は、水素又は低級アルキルであり；

R^6 及び R^7 は独立に、直接結合又は1から約10個の炭素からなるアルキレンであり；

R^8 は、水素又は低級アルキルであり；

P は、親水性ポリマーであり；かつ

T は、心筋細胞、内皮細胞、上皮細胞、腫瘍細胞及び糖タンパク質 GPIIb/IIIa 受容体からなる群から選択される細胞又は受容体をターゲットとするターゲティングリガンドである。 40

【0024】

さらに、インビボで治療又は診断に使用するためのターゲット化ベシクル組成物及び処方物を提供する。これらの組成物及び処方物は、水性キャリア中に、脂質、タンパク質又はポリマーガス充填ベシクル、さらに前記の化合物を含有する。

【0025】

本発明の他の実施形態は、診断及び治療用途で、これらの組成物及び処方物を使用する方法を対象とする。本発明のこれら、及び他の態様は、次の詳細な記載で明らかになるであろう。

50

【0026】

本発明の実施形態を詳述するために、現段階で好ましい形態を図面で示す。しかしながら、本発明は、示されているとおりの配置及び手段に限定されない。

【0027】

(発明の詳細な説明)

前記及び本開示全体で使用されるように、次の用語は、特に記載のない限り、次の意味を有すると理解されたい。

【0028】

「脂質」とは、通常、両親媒性及び生体適合性の合成又は天然由来化合物のことである。脂質は通常、親水性成分及び疎水性成分を含有する。代表的な脂質には例えば、脂肪酸、中性脂肪、リン脂質、糖脂質、界面活性剤、脂肪族アルコール、ロウ、テルペン及びステロイドが含まれる。一定の好ましい実施形態では、ここに記載されている組成物中に導入されうる脂質は、スルフヒドリル基又はジスルフィド結合を含有しない。

10

【0029】

「脂質組成物」とは、通常は水性媒体中に脂質化合物を含有する組成物のことである。代表的な脂質組成物には、懸濁液、エマルジョン及びベシクル組成物が含まれる。

【0030】

「脂質処方物」とは、生物活性剤をさらに含有する脂質組成物のことである。

【0031】

「ベシクル」とは、1個又は複数の内部ボイドを形成する1つ又は複数の壁又は膜の存在により通常は特徴付けられる球状実体のことである。ベシクルは例えば、ここに記載される様々な脂質を含む脂質、タンパク性材料あるいは、天然、合成及び半合成ポリマーを含むポリマー材料から処方することができる。好ましいベシクルは、脂質から処方された壁又は膜を含むものである。これらの好ましいベシクルでは、脂質は、単分子層又は二分子層の形であってよく、単分子層又は二分子層脂質を使用して、1つ又は複数の単分子層又は二分子層を生じさせることができる。単分子層又は二分子層が2つ以上である場合には、単分子層又は二分子層は、同心であってよい。脂質を使用して、ユニラメラベシクル（1つの単分子層又は二分子層からなる）、オリゴラメラベシクル（約2つ又は約3つの単分子層又は二分子層からなる）又はマルチラメラベシクル（約3を上回る単分子層又は二分子層からなる）を生じさせることができる。同様に、タンパク質又はポリマーから調製されたベシクルも、1つ又は複数の同心壁又は膜を含みうる。タンパク質又はポリマーから調製されたベシクルの壁又は膜は、実質的に充実性（均一）であってよい。これらは、多孔性又は半多孔性であってよい。一定の好ましい実施形態では、ベシクルは、スルフヒドリル基又はジスルフィド結合を含有しない。ここに記載されているベシクルは、例えば、リポソーム、ミセル、バブル、マイクロバブル、ミクロスフェア、脂質一、ポリマー一及び／又はタンパク質被覆バブル、マイクロバブル及び／又はミクロスフェア、マイクロバルーン、エロゲル、包接化合物結合ベシクルなどと一般的に称されるような実体を含む。ベシクルの内部ボイドは、液体（例えば、水溶液が含まれる）、ガス、ガス前駆体及び／又は、例えば必要に応じターゲッティングリガンド及び／又は生物活性剤を含む固体又は溶質材料を充填されていてよい。

20

30

40

【0032】

「リポソーム」とは、通常は1つ又は複数の同心層、例えば単分子層又は二分子層の形である脂質化合物を含む両親媒性化合物の通常は球状のクラスター又は凝集体のことである。これらはここでは、脂質ベシクルとも称される。例えば、イオン脂質及び／又は非イオン脂質から、リポソームを処方することができる。非イオン脂質から処方されたリポソームは、ニオソームとも称される。

【0033】

「ミセル」とは、脂質から処方されたコロイド実体のことである。一定の好ましい実施形態では、ミセルは、単分子層又は六方H₂相構造を有する。好ましい他の実施形態では、ミセルは、二分子層構造を有してもよい。

50

【0034】

「エーロゲル」とは、複数の小さな内部ボイドにより特徴付けられる、通常は球状の実体のことである。合成材料（例えば、レソルシノール又はホルムアルデヒドのベーキングから調製されたフォーム）、さらに多糖又はタンパク質などの天然材料から、エーロゲルを処方することができる。

【0035】

「包接化合物」とは、ベシクルを随伴しうる固体、半多孔性又は多孔性粒子のことである。好ましい形態では、包接化合物は、ベシクルを含むキャビティを含有するケージ様の構造を形成しうる。1個又は複数のベシクルが、包接化合物に結合しうる。望ましい場合には、安定化材料を包接化合物に随伴させて、ベシクルと包接化合物との会合を促進することができる。包接化合物をそれから処方することができる適切な材料には、例えば、カルシウムヒドロキシアパタイトなどの多孔性アパタイト、カルシウム塩で沈殿させたアルギン酸などのポリマー及び金属イオンからなる沈殿物が含まれる。

10

【0036】

本発明のベシクルは好ましくは、ガス又はガス前駆体を含有する。「ガス充填ベシクル」とは、ガスがその中に封入されているベシクルのことである。「ガス前駆体充填ベシクル」とは、ガス前駆体がその中に封入されているベシクルのことである。ベシクルは、最小限にか、部分的にか、又は実質的に完全に、ガス及び／又はガス前駆体で充填されていてよい。一定の好ましい実施形態では、ベシクルは実質的に、又は完全にガス及び／又はガス前駆体で充填されていてよい。ガス及び／又はガス前駆体充填ベシクルに関して使用される場合の「実質的に」との用語は、ベシクルの内部ボイド容量の約50%より多くが、ガスからなることを意味する。好ましくは、実質的に充填されているベシクルの内部ボイドの60%より多くが、ガスからなり、この際、70%より多いのが、さらに好ましい。さらに好ましくは、実質的に充填されたベシクルの内部ボイドの約80%より多くがガスからなり、約90%より多いのが、いっそう好ましい。特に好ましい実施形態では、ベシクルの内部ボイドの約95%より多くがガスからなり、約100%が、極めて好ましい。本発明の好ましい一実施形態とは考慮しないが、ベシクルは、所望ならば、ガス又はガス前駆体を含有しないか、実質的に含有しない。

20

【0037】

「ベシクル組成物」とは、通常は水性媒体中のベシクルを含有する組成物のことである。

30

【0038】

「ベシクル処方物」とは、生物活性剤も含有するベシクル組成物のことである。ベシクル処方物中で使用するために適したベシクル又はベシクル種には例えば、ガス充填ベシクル及びガス前駆体充填ベシクルが含まれる。

【0039】

「エマルション」とは、2種又はそれ以上の液体からなる類脂質混合物のことであり、通常は、コロイドの形である。脂質は、エマルション中に不均一に分散されていてよい。もしくは、脂質は、例えば、クラスター又は、単分子層又は二分子層を含む層の形に凝集してもよい。

【0040】

「懸濁液」とは、長時間にわたって安定なままである、液体中に浮いている微細な液体又は固体粒子の混合物のことである。

40

【0041】

「六方HII相構造」とは、液体媒体、例えば水性媒体中の脂質からなる通常は管状の凝集体のことであり、その際、脂質の親水性部分が、通常は内部に面していて、管の内部の液体環境と会合している。脂質の疎水性部分は通常は、外側に向かっていて、錯体は、六方管の形を呈する。複数の管が通常は、六方相構造と一緒に詰まっている。

【0042】

「患者」との用語は、哺乳類を含む動物、好ましくはヒトのことである。

【0043】

50

「患者の体内局部」及び「該当局部」との句は、患者全体か、又は患者の特定区域又は部分のことである。患者の体内局部及び該当局部には例えば、画像診断で撮像される部位及び／又は生物活性剤で処理される部位が含まれる。このような部位の例には例えば、心筋組織を含む心臓局部、さらに、血管系及び循環系及びガン組織を含む他の体組織が含まれる。ここで使用される場合の「血管系」との句は、体又は体の臓器又はその一部の血管を示している。

【0044】

「生物活性剤」との用語は、患者で疾患の存在の有無を診断するための方法及び／又は患者の疾患を治療するための方法などの、治療又は診断のための適用に関連して使用することができる物質のことである。ここで使用する場合、「生物活性剤」とは、インビトロ及び／又はインビボで生物作用を発揮しうる物質でもある。生物活性剤は、中性に、又は正に、又は負に荷電されていてもよい。適切な生物活性剤の例には、診断薬、薬剤、医薬品、合成有機分子、タンパク質、ペプチド、ビタミン、ステロイド及び、ヌクレオシド、ヌクレオチド及びポリヌクレオチドを含む遺伝物質が含まれる。

10

【0045】

「診断薬」とは、患者の体内局部を撮像するための、かつ／又は患者で疾患の存在の有無を診断するための方法に関して使用することができる薬剤のことである。代表的な診断薬には例えば、患者の超音波、磁気共鳴映像法又はコンピュータ断層撮影法に関連して使用するための造影剤、例えば、ここに記載の脂質及び／又はベシクル組成物が含まれる。

【0046】

ここで使用する場合、「ポリマー」とは、2個又はそれ以上の繰り返し単位の化学的結合から生じる分子のことである。したがって、「ポリマー」との用語には例えば、ダイマー、トリマー及びオリゴマーが含まれうる。ポリマーは、合成、天然由来又は半合成であってよい。好ましい形態では、「ポリマー」との用語は、10個又はそれ以上の繰り返し単位を含む分子のことである。一定の好ましい実施形態では、ここで記載する組成物中に導入しうるポリマーは、スルフヒドリル基又はジスルフィド結合を含有しない。

20

【0047】

「増粘剤」とは、ここに記載されている脂質及び／又はベシクル組成物中に導入されると、粘度調整剤、乳化及び／又は可溶化剤、懸濁剤及び張度上昇剤として作用しうる、通常は親水性の様々な材料のうちのいずれかのことである。増粘剤は、そのような特性により組成物の安定性の維持を助けうると、考えられている。

30

【0048】

「分散剤」とは、例えば、ここに記載されている一定の脂質及び／又はベシクル組成物を含むコロイド粒子の懸濁媒体に加えられると、粒子の均一な分離を促進しうる界面活性剤のことである。一定の好ましい実施形態では、分散剤は、ポリマーシロキサン化合物を含んでもよい。

【0049】

「遺伝物質」とは通常、デオキシリボ核酸（DNA）及びリボ核酸（RNA）を含むヌクレオチド及びポリヌクレオチドのことである。遺伝物質は、当技術分野の専門家に知られている合成化学的方法論により、又は組換え技術を使用することにより、又はこれら2つの組合せにより製造することができる。DNA及びRNAは場合によって、非天然ヌクレオシドを含有してもよく、一本鎖又は二本鎖であってよい。「遺伝物質」とは、センス及びアンチセンスDNA及びRNA、即ち、DNA及び／又はRNA中のヌクレオチドの特異的配列に対して相補的であるヌクレオチド配列のことでもある。

40

【0050】

「薬剤」又は「医薬品」とは、患者の疾病、病気、疾患又は外傷を治療（予防、診断、緩和又は治療を含む）する際に使用することができる治療薬又は予防薬のことである。治療に有効なペプチド、ポリペプチド及びポリヌクレオチドも、薬剤又は医薬品との用語の意味に含まれる。

【0051】

50

「安定化材料」とは、例えば、エマルション、懸濁液、分散液及びベシクル組成物を含む、ここに記載されているような組成物の安定性を改善しうる材料のことである。安定性の改善には、例えば、相対的にバランスのとれた状態の維持が含まれ、例えば、崩壊、分解、劣化などに対する耐性の上昇が例となる。ベシクル、特にガス充填ベシクルに関する好ましい実施形態では、安定化化合物は、例えば、ベシクルの破裂及び／又は凝集により生じるような、ベシクル内に捕捉されているガスの脱出を最小化するか、実質的に防ぐ（完全に防ぐことを含む）ことによりベシクルの安定性を改善するために役立つ。捕捉されているガスの脱出を防ぐことに関して使用されるような「実質的」との用語は、約50%を上回るガスの捕捉が保持されることを意味する。好ましくは、約60%を上回るガスの捕捉が保持され、約70%を上回るのがより好ましい。いっそう好ましくは、約80%を上回るガスの捕捉が保持され、約90%を上回るのが、さらに好ましい。特に好ましい実施形態では、約95%を上回るガスの捕捉が保持される。所望の場合には、ガスの捕捉を完全に保持することができる（即ち、約100%のガスの捕捉が保持される）。安定化化合物は、離散している個々の化合物（モノマー）を含有してよい、ポリマーを含有してよい。脂質に関する好ましい実施形態では、安定化物質は、共有結合及び／又は非共有結合により、脂質化合物と会合してよい。一般的に、安定化化合物は例えば、界面活性剤、被膜形成物質、膜及び／又は膜形成物質を含有してよい。本発明の方法及び組成物で 사용할ことができる代表的な安定化化合物には、脂質、タンパク質及びポリマーが含まれる。一定の本生物活性剤も、「安定化物質」の定義に包含される。安定化物質は、中性であるか、正又は負に荷電されていてもよい。中性安定化材料のうちで、極性物質が好ましい。一定の実施形態では、安定化化合物は、実質的に（完全であってもよい）架橋されていてよい。ここで使用する場合、「架橋」、「架橋された」及び「架橋する」との用語は通常、1つ又は複数のブリッジによる、脂質、タンパク質及びポリマー安定化化合物を含む2個又はそれ以上の安定化化合物の架橋のことである。1個又は複数の元素、基又は化合物からなっていてよいブリッジは通常、第1の安定化化合物分子からの元素を第2の安定化分子の原子に結合させるために役立つ。架橋ブリッジは、共有結合性及び／又は非共有結合性会合を含む。様々な元素、基及び／又は化合物のいずれかが、架橋でブリッジを形成してよく、安定化化合物は、そのまま、又は合成手段によって架橋させることができる。例えば、架橋は、ケラチン、インスリン及び他のタンパク質中などのように、シスチン基のジスルフィド結合により結合されるペプチド鎖から処方された材料中では、自然に生じる。もしくは、例えば、安定化材料などの化合物と、例えば熱、高エネルギー放射線、超音波放射などに暴露することにより反応を惹起する架橋剤として役立つ化学物質とを組み合わせるなどの、適切な化学的変性により、架橋を生じさせることができる。例には例えば、システイン基中にスルフヒドリル基などとして存在しうるイオウを用いる、ジスルフィド結合が生じる架橋、有機ペルオキシドを用いる架橋、高エネルギー放射線を用いる、不飽和材料の架橋、カルバミン酸ジメチロールでの架橋などが含まれる。架橋された安定化化合物に関して使用される「実質的」との用語は、約50%を上回る安定化化合物が、架橋ブリッジを含有することを意味する。一定の実施形態では好ましくは、約60%を上回る安定化化合物が架橋ブリッジを含み、約70%を上回るのが、さらに好ましい。いっそう好ましくは、約80%を上回る架橋された安定化化合物が架橋ブリッジを含有し、約90%を上回るのが、特に好ましい。一定の特に好ましい実施形態では、約95%を上回る架橋された安定化化合物が、架橋ブリッジを含む。望ましい場合には、実質的に架橋されている安定化化合物は、完全に架橋されていてよい（即ち、架橋された安定剤化合物の約100%が、架橋ブリッジを含む）。最も好ましい実施形態では、安定化化合物は、実質的に（完全にであってもよい）架橋されていなくてもよい。架橋されていない安定化化合物に関して使用する場合の「実質的」との用語は、約50%を上回る安定化化合物に、架橋ブリッジが存在しないことを意味している。好ましくは、約60%を上回る安定化化合物に、架橋ブリッジが存在せず、約70%を上回るのが、特に好ましい。いっそう好ましくは、約80%を上回る安定化化合物に、架橋ブリッジが存在せず、約90%を上回るのが、特に好ましい。特に好ましい実施形態では、約95%を上回る安定化化合物に、

10

20

30

40

50

架橋ブリッジが存在しない。望ましい場合には、実質的に架橋されていない安定化化合物は、完全に架橋されていなくてもよい（即ち、安定化化合物の約100%に、架橋ブリッジが存在しない）。

【0052】

「ベシクル安定性」とは、Hg約300mmの圧力に約1分間さらした後に、ガス充填ベシクルが、その中に捕捉されているガスを保持する能力のことである。ベシクル安定性は、パーセント（%）で測定し、これは、ベシクル中にもともと捕捉されていたガスの量と、放圧後に保持されているガスの量との分数である。ベシクル安定性は、ベシクルが、放圧後にその元のサイズに回復する能力に関する「ベシクル回復性」にも関する。

【0053】

「共有結合性会合」とは、2個の原子の結合性軌道中での電子の共有を伴う分子間会合又は結合のことである。

【0054】

「非共有結合性会合」とは、共有結合を伴わない、2個又はそれ以上の別々の分子間の分子間相互作用のことである。分子間相互作用は、例えば、関連分子の極性、場合によっては関連分子の電荷（正又は負）などを含む様々なファクターに依存する。非共有結合性会合は好ましくは、イオン相互作用、双極子-双極子相互作用及びファンデルワールス力及びこれらの組合せからなる群から選択される。

【0055】

「イオン相互作用」又は「静電的相互作用」とは、それぞれが正又は負に荷電されている2個又はそれ以上の分子間の分子間相互作用のことである。したがって例えば、「イオン相互作用」又は「静電的相互作用」は、第1の正に荷電されている分子と第2の負に荷電されている分子との間の作用のことである。代表的なイオン又は静電的相互作用には例えば、負に荷電されている安定化材料、例えば遺伝物質と、正に荷電されている脂質、例えば、臭化ラウリルトリメチルアンモニウムなどのカチオン脂質との間の引力が含まれる。

【0056】

「双極子-双極子相互作用」とは通常、2個又はそれ以上の極性分子の間に生じる引力のことである。したがって「双極子-双極子相互作用」とは、一般的に δ^+ と記載される第1の極性分子の荷電されていない、部分的に正の末端と、一般的に δ^- と記載される第2の極性分子の荷電されていない、部分的に負の末端との引力のことである。双極子-双極子相互作用は例えば、ホスファチジルコリンの陽性頭部基、例えばコリン頭部基と、陰性原子、例えば多糖などの安定化材料中に存在する酸素、窒素又はイオウなどのヘテロ原子との間の引力により示される。「双極子-双極子相互作用」とは、分子間水素結合のことでもあり、この際、水素原子は、別々の分子の上の陰性原子間のブリッジとして役立ち、水素原子は、共有結合により第1の分子に、そして静電力により第2の分子に保持される。

【0057】

「ファンデルワールス力」とは、量子力学により説明される非極性分子間の引力のことである。ファンデルワールス力は通常、一時的な双極子モーメントを伴い、これは、隣接する分子により惹起され、電子分布の変化を伴う。

【0058】

「水素結合」とは、陰性原子、例えば酸素、イオウ、窒素などに共有結合している水素原子と他の陰性原子との間で生じる引力又はブリッジのことである。水素結合は、第1の分子中の水素原子と、第2の分子中の陰性原子との間で生じる（分子間水素結合）。したがって、水素結合は、いずれも単一分子中に含有されている水素原子と陰性原子との間で生じる（分子間水素結合）。

【0059】

「親水性相互作用」とは、水と実質的に結合しているか、水を吸収するか、かつ／又は水に溶解しうる分子又は分子部分のことである。これにより、可逆ゲルの膨潤及び／又は形成が生じる。

10

20

30

40

50

【0060】

「疎水性相互作用」とは、水と実質的に結合しないか、水を吸収しないか、かつ／又は水に溶解しない分子又は分子部分に関する。

【0061】

「生体適合性」とは、通常は生物学的機能を損なうことがなく、アレルギー応答及び疾患状態を含む、許容し得ない毒性規模をもたらすことのない物質に関する。

【0062】

「組み合わせる」とは、一定の実施形態では、ターゲッティングリガンドを、脂質組成物及びベシクル組成物を含む本発明の組成物に導入することに関する。「組み合わせる」は、生物活性剤を、脂質組成物及びベシクル組成物を含む本発明の組成物に導入することに関する。生物活性剤及び／又は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と組み合わせることができる。所望の場合には、生物活性剤及び／又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、ポリマー及び／又はベシクル又は他の付加的な安定化物質などの本発明の組成物の1種又は複数の成分と共有結合性会合をさせることもできる。さらに所望の場合には、生物活性剤及び／又はターゲッティングリガンドと脂質化合物、タンパク質、ポリマー及び／又はベシクル又は他の付加的な安定化剤などの本発明の組成物の他の成分との共有結合性会合は実質的に存在しなくてもよい。生物活性剤及び／又はターゲッティングリガンドと脂質化合物、タンパク質、ポリマー及び／又はベシクルなどの本発明の組成物の他の成分との共有結合性会合が存在しないことに関して使用される場合、「実質的にない」との用語は、約50%未満、例えば、約0%から約50%未満（この範囲内の特定のパーセンテージ及びパーセンテージ範囲の組合せ及び二次的組合せの全てを含む）の生物活性剤及び／又はターゲッティングリガンドが、組成物の他の成分と共有結合性会合をしていてよいことを意味している。好ましくは、約40%未満の生物活性剤及び／又はターゲッティングリガンドが、組成物の他の成分と共有結合性会合をしていてよく、約30%未満であるのが、さらに好ましい。いっそう好ましくは、約20%未満の生物活性剤及び／又はターゲッティングリガンドが、組成物の他の成分と共有結合性会合をしていてよく、約10%未満であるのが、さらに好ましい。さらに好ましい実施形態では、生物活性剤及び／又はターゲッティングリガンドと組成物の他の成分との共有結合性会合は、全く存在しない（即ち0%）。

【0063】

組成物の他の成分との共有結合性会合を実質的に有さない生物活性剤及び／又はターゲッティングリガンドは場合によっては、ここで、「非結合」又は「遊離」生物活性剤及び／又はターゲッティングリガンドと称される。このような組成物では、生物活性剤及び／又はターゲッティングリガンドは、所望の場合には、例えば脂質化合物、タンパク質、ポリマー及び／又はベシクル又は他の付加的な安定化剤などの組成物の他の成分と非共有結合性会合をしていてもよい。加えて、所望の場合には、非結合又は遊離生物活性剤及び／又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、ポリマー及び／又はベシクルなどの組成物の他の成分との非共有結合性会合が実質的に存在しなくてもよい。生物活性剤及び／又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、ポリマー及び／又はベシクルなどの組成物の他の成分との非共有結合性会合が存在しないことに関して使用する場合、「実質的にない」との用語は、約50%未満、例えば、約0%から約50%未満（この範囲内の特定のパーセンテージ及びパーセンテージ範囲の組合せ及び二次的組合せの全てを含む）の非結合又は遊離の生物活性剤及び／又はターゲッティングリガンドが、組成物の他の成分と非共有結合性会合をしていてよいことを意味している。好ましくは、約40%未満の非結合又は遊離の生物活性剤及び／又はターゲッティングリガンドが、組成物の他の成分と非共有結合性会合をしていてよく、約30%未満であるのが、さらに好ましい。いっそう好ましくは、約20%未満の非結合又は遊離の生物活性剤及び／又はターゲッティングリガンドが、組成物の他の成分と非共有結合性会合をしていてよく、約10%未満であるのが、さらに好ましい。さらに好ましい実施形態では、非結合又は遊離の生物活性剤及び／又はターゲッティングリガンドと組成物の他の成分との

非共有結合性会合は、完全に存在しなくてもよい（即ち 0 %）。

【0064】

ベシクル組成物では、生物活性剤及び／又はターゲッティングリガンドは、ベシクルの内部ボイド内に捕捉されていてよい。生物活性剤及び／又はターゲッティングリガンドは、例えばベシクル層又は壁内に含まれる脂質の間に散在させることにより、ベシクルの層又は壁の間に組み込むことができる。加えて、生物活性剤及び／又はターゲッティングリガンドを、ベシクルの表面上に位置させることも考えられる。いずれにせよ、生物活性剤及び／又はターゲッティングリガンドは、例えば、ベシクルの内及び／又は外表面を含むベシクルの壁と化学的に相互作用することができ、実質的にこれに付着しうる。このような相互作用は、例えば、共有結合性会合又は非共有結合性会合の形をとる。一定の実施形態では、相互作用により、ベシクルの安定化が生じる。

10

【0065】

「ターゲッティングリガンド」とは、本発明の組成物と共にインビボで、組織及び／又は受容体のターゲッティングを促進しうる材料又は物質のことである。ターゲッティングリガンドは、合成、半合成又は天然由来であってよい。ターゲッティングリガンドとして役立つ材料又は物質には例えば、抗体、糖タンパク質及びレクチンを含むタンパク質、ペプチド、ポリペプチド、単糖類及び多糖を含む糖類、ビタミン、ステロイド、ステロイド類似体、ホルモン、補因子、生物活性剤並びに、ヌクレオシド、ヌクレオチド及びポリヌクレオチドを含む遺伝物質が含まれる。

【0066】

ターゲッティングリガンドへの「前駆体」とは、ターゲッティングリガンドに変化しうる材料又は物質のことである。このような変化には、例えば、前駆体をターゲッティングリガンドに定着させることも含まれる。代表的なターゲッティング前駆体成分には、マレイミド基、オルトーピリジルジスルフィドのようなジスルフィド基、ビニルスルホン基、アジド基及び α -ヨードアセチル基が含まれる。

20

【0067】

「ペプチド」とは、約 2 から約 100 個のアミノ酸基を含有してよい窒素化合物のことである。一定の好ましい実施形態では、ここに記載されている組成物中に導入されうるペプチドは、スルフヒドリル基又はジスルフィド結合を含まない。

【0068】

「タンパク質」とは、約 100 個を上回るアミノ酸基を含有してよい窒素化合物のことである。一定の好ましい実施形態では、ここに記載されている組成物中に導入されうるタンパク質は、スルフヒドリル基又はジスルフィド結合を含まない。

30

【0069】

「コート」又は「コーティング」とは、安定化物質と脂質及び／又はベシクルとの相互作用のことであり、共有結合性及び／又は非共有結合性会合を伴ってよい。

【0070】

「組織」とは通常、特別な機能を果たす特殊細胞のことである。ここで使用する場合の「組織」との用語は、個々の細胞あるいは複数の細胞又は細胞の凝集体、例えば膜又は臓器のことであると理解すべきである。「組織」との用語にはさらに、異常細胞又は複数の異常細胞のことも含まれる。代表的な組織には例えば、心筋の細胞及び心筋細胞（cardiomyocytes）を含む心筋組織（心臓組織又は心筋層とも称される）、内皮及び上皮を含む膜組織、上皮、間質組織を含む結合組織並びに腫瘍が含まれる。

40

【0071】

「受容体」とは、特異的物質の選択的な結合により通常は特徴付けられる細胞内又は細胞表面上の分子構造のことである。代表的な受容体には例えば、ペプチドホルモン、神経伝達物質、抗原、補体断片及びイムノグロブリンのための細胞表面受容体並びにステロイドホルモンのための細胞質受容体が含まれる。本発明に関連する代表的な受容体は、血小板インテグリンである糖タンパク質 GPIIb/IIIa である。

【0072】

50

「内皮細胞」又は「内皮」とは、正常又は異常であってよく、縁部同士で、又は重なり合う形で接合して、膜を形成し得る扁平化した透明な内皮細胞の単一層を含む細胞の集合体及び／又は組織のことである。内皮細胞は、心臓の裏層膜の一部である漿膜、血管及びリンパ管の遊離表面上に、脳及び脊髄の表面上に、さらに眼の前眼房中に存在している。内皮は、胎芽の中胚葉に由来し、梗塞している心臓組織を含む心臓組織、心臓血管、動脈、静脈及び毛細血管などの末梢血管（位置が、心臓に対して末梢と記載される）、血餅及びアテローム斑の周辺領域を含む。

【0073】

「上皮細胞」又は「上皮」とは、正常又は異常であってよく、基底膜に支持されている間質セメント質物質により相互に結合されていてよい細胞からなる1つ又は複数の層を含む細胞及び／又は組織の凝集体のことである。内皮は、例えば細胞からなる単一層（単層上皮）；細胞からなる1つより多い単一層（重層上皮）；及び、実質的に層化の様相なしに相互に密着している細胞からなる約3又は4つの層を含む、様々な群に分類することができる。単層上皮の異なる形は通常、扁平、単層扁平、円柱、腺、球状及び／又は繊毛と称される。上皮は、胚の原外胚葉又は内胚葉に由来する。上皮は、梗塞している心臓組織を含む心臓組織、心臓血管、動脈、静脈及び毛細血管などの末梢血管、血餅及びアテローム斑の周辺領域を含む。

【0074】

「心筋性」とは通常、心筋細胞、心筋層、心内膜及び心外膜の細胞を含んだ心臓組織のことである。「心筋性」との用語には、梗塞している心臓組織、心臓血管、動脈、静脈及び毛細血管などの末梢血管（その部位を心臓に対して末梢と記載する）、血餅及びアテローム斑の周辺領域が含まれる。

【0075】

「心臓領域」とは通常、心臓及び周辺組織、構造及び冠動脈を含む血管のことである。

【0076】

「腫瘍細胞」又は「腫瘍」とは、無制御の細胞増殖により特徴付けられる疾患状態を伴う異常細胞及び／又は組織の凝集体のことである。疾患状態は、例えば、内皮、上皮及び心筋細胞を含む様々な細胞タイプに関わりうる。これらの疾患状態には、新生物、ガン、白血病及び再狭窄損傷が含まれる。

【0077】

「アルキル」とは、鎖中に1から約50個及びこの範囲内の全ての組合せ及び二次的組合せの炭素原子を有する直鎖、分枝鎖又は環式であってよい脂肪族炭化水素基のことである。「低級アルキル」とは、1から約8個の炭素原子を有するアルキル基のことであり、1から約4個の炭素からなる低級アルキルが好ましい。「高級アルキル」とは、約10から約20個の炭素原子を有するアルキル基のことである。アルキル基は場合によって、同じか又は異なってよい1個又は複数のアルキル基置換基で置換されていてよく、この際、「アルキル基置換基」には、ハロ、アリール、ヒドロキシ、アルコキシ、アリールオキシ、アルキルオキシ、アルキルチオ、アリールチオ、アラルキルオキシ、アラルキルチオ、カルボキシ、アルコキシカルボニル、オキソ及びシクロアルキルが含まれる。アルキル基に沿って、場合によって、1個又は複数の酸素、イオウあるいは置換又は非置換の窒素原子が挿入されていてよく、この際、窒素置換基は、低級アルキルである。「分枝鎖」とは、メチル、エチル又はプロピルなどの低級アルキル基が、直鎖アルキル鎖に結合しているアルキル基のことである。代表的なアルキル基には、メチル、エチル、i-プロピル、n-ブチル、t-ブチル、n-ペンチル、ヘプチル、オクチル、デシル、ドデシル、トリデシル、テトラデシル、ペンタデシル及びヘキサデシルが含まれる。好ましいアルキル基には、1から約4個の炭素原子からなる低級アルキル基及び約12から約16個の炭素原子からなる高級アルキル基が含まれる。好ましいアルキル基にはさらに、1個又は複数のハロ原子で置換されているアルキル基が含まれる。ハロ置換アルキル基のうちでは、フルオロアルキル基が好ましく、例えば、式： CF_3 （ CF_2 ） $_n$ （ CH_2 ） $_m$ - のフルオロアルキル基が含まれる（式中、m及びnはそれぞれ独立に、0から約22の整数である）。

代表的なフルオロアルキル基には、ペルフルオロメチル、ペルフルオロエチル、ペルフルオロプロピル、ペルフルオロブチル、ペルフルオロシクロブチル、ペルフルオロペンチル、ペルフルオロヘキシル、ペルフルオロヘプチル、ペルフルオロオクチル、ペルフルオロノニル、ペルフルオロデシル、ペルフルオロウンデシル及びペルフルオロドデシルが含まれる。代表的な環式炭化水素基（すなわち、シクロアルキル基）には例えば、シクロペンチル、シクロヘキシル及びシクロヘプチル基が含まれる。代表的な環式炭化水素基にはさらに、例えば、シクロペンテニル及びシクロヘキセニルなどのシクロアルケニル基、さらに、例えばコレステロールなどのステロイド基を含む、縮合したシクロアルキル及び／又はシクロアルケニル基を含有する炭化水素基が含まれる。

【0078】

10

「アルケニル」とは、少なくとも1個の炭素-炭素二重結合を含有するアルキル基のことである。代表的なアルケニル基には例えば、ビニル、アリル、ブテニル、ペンテニル、デセニル及びドデセニル基が含まれる。

【0079】

「アルコキシ」とは、アルキル-O-基のことであり、ここでアルキルは、前記と同様のものである。代表的なアルコキシ基には例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、ブトキシ及びヘプトキシが含まれる。

【0080】

「アルキレン」とは、1から約30個の炭素原子及びこの範囲内の全ての組合せ及び二次的組合せを含む直鎖又は分枝鎖の二価脂肪族炭化水素基のことである。「低級アルキレン」とは、1から約4個の炭素原子を有するアルキレン基のことである。アルキレン基は、直鎖、分枝鎖又は環式であってよい。アルキレン基は場合によって、不飽和であってよい。かつ／又は1個又は複数の「アルキル基置換基」で置換されていてよい。アルキレン基に、1個又は複数の酸素、イオウあるいは置換又は非置換の窒素原子が挿入されていてよく、この際、窒素置換基は、前記のようなアルキルである。代表的なアルキレン基には、メチレン ($-\text{CH}_2-$)、エチレン ($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$)、プロピレン ($-(\text{CH}_2)_3-$)、シクロヘキシレン ($-\text{C}_6\text{H}_{10}-$)、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$ 、 $-(\text{CF}_2)_n(\text{CH}_2)_m-$ (式中、 n は、約1から約22の整数であり、 m は、0から約22の整数である)、 $-(\text{CH}_2)_n-\text{N}(\text{R})-(\text{CH}_2)_m-$ (式中、各 m 及び n は独立に、0から約30の整数であり、 R は、水素又はアルキルである)、メチレンジオキシ ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-$) 及びエチレンジオキシ ($-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-$) が含まれる。アルキレン基が約1から約3個の炭素原子を有するのが好ましい。

20

30

【0081】

「アシル」とは、直鎖又は分枝鎖のアルキル-C=O基のことである。「チオアシル」とは、直鎖又は分枝鎖のアルキル-C=S基のことである。好ましいアシル及びチオアシル基は、約5から約30個の炭素原子（ここで、炭素原子の数は、 $-\text{C}(=\text{O})$ 基の炭素原子を含む）及びこの範囲内の全ての組合せ及び二次的組合せを有する。

【0082】

本発明は、一部では、脂質及び／又はベシクル組成物を対象とする。脂質、インビボで組織、細胞及び／又は受容体をターゲットとし、架橋基を介して脂質に結合しうるターゲットングリガンド及びガス又はガス前駆体を含有する脂質組成物を含む実施形態を提供する。水性キャリヤ中に、脂質、タンパク質又はポリマーを含有するベシクル、インビボで組織、細胞及び／又は受容体をターゲットとしうるターゲットングリガンド及びガス又はガス前駆体を含有するベシクル組成物を含む実施形態もここに提供する。これらの後者の実施形態では、ターゲットングリガンドは、ベシクルがそれらから処方される脂質、タンパク質又はポリマーを含むベシクルに、架橋基を介して結合してよい。脂質組成物、特に、ベシクル組成物の形の脂質組成物に関して、該当脂質のゲル-液晶相転移温度未満の温度で脂質組成物を調製するのが好ましい。この相転移温度は、脂質二分子層がゲル状態から液晶状態へと変換する温度のことである。例えば、Chapman et al

40

50

1. , J. Biol. Chem. 1974 249, 2512-2521 参照。

【0083】

比較的高いゲル状態－液晶状態相転移温度を有する脂質から調製されたベシクルは、所定の温度で高い不透過性を有する傾向があると、通常は考えられている。飽和ジアシル-sn-グリセロ-3-ホスホコリンの主鎖融解転移に関する、CRC Handbook of Lipid Bilayers (CRC Press、Boca Raton、FL 1990) の p. 139 参照。様々な脂質のゲル状態－液晶状態相転移温度は、当技術分野の専門家には容易に理解され、例えば、Gregoriadis, ed., Liposome Technology, Vol. I, 1-18 (CRC Press, 1984) に記載されている。次の表に、いくつかの代表的な脂質及びその相転移温度を挙げる。 10

【0084】

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

10

20

30

40

50

【0085】

例えば、Derek Marsh, CRC Handbook of Lipid Bilayers, p. 139 (CRC Press, Boca Raton, FL 1990) 参照。

【0086】

存在する脂質及び／又はベシクル組成物に、少なくとも少量、例えば使用される脂質の全

量に対して約1から約10モルパーセントの負に荷電している脂質を導入することにより、ベシクルの安定性を高めることもできる。適切な負に荷電している脂質には例えば、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸及び脂肪酸が含まれる。何らかの作動理論に結びつけることは意図していないが、このような負に荷電されている脂質は、相互に融合することによりベシクルが破裂する傾向を妨害することにより、付加的な安定性をもたらすと、考えられる。したがって、負に荷電されている脂質は、ベシクルの外側表面上に均一に負に荷電している層が生じるように作用し、これは、近接している他のベシクル上の同様に荷電している外側層と反発する。こうして、ベシクルは、相互に接触しにくくなるが、この相互接触は、各ベシクルの膜又はスキンの破裂をもたらす、接触しているベシクルの単一のより大きなベシクルへの合併をもたらす。合併のこのプロセスの連続により当然に、ベシクルの著しい劣化が生じる。 10

【0087】

特に、ベシクル組成物と組み合わされて使用される脂質物質は、好ましくは柔軟である。このことは、本発明との関連では、例えば、ベシクルの直径よりも小さい直径を有する開口部を通過することができるように、ベシクルが、その形を変えることができることを意味している。

【0088】

幅広い脂質が、脂質組成物に導入するために適していると考えられる。特にベシクル組成物に関しては、例えば、ミセル及び／又はリポソーム、当技術分野の専門家にその調製のために適していると知られている材料又はこれらの組合せを使用することができる。使用される脂質は、天然、合成又は半合成由来であってよい。前記のように、適切な脂質には通常、例えば脂肪酸、中性脂肪、リン脂質、糖脂質、脂肪族アルコール及びワックス、テルペン、セスキテルペン及びステロイドが含まれる。 20

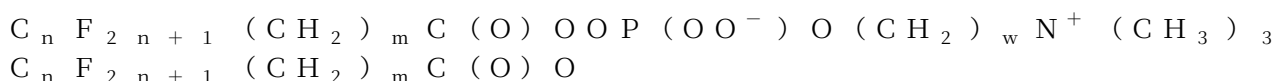
【0089】

本発明の脂質組成物を調製するために使用することができる代表的な脂質は例えば、脂肪酸、リゾリン脂質を含むリゾ脂質、血小板活性因子(PAF)(Avanti Polar Lipids、Alabaster、AL)に随伴するような、血餅をターゲットとする1-アルキル-2-アセトイル-sn-グリセロ 3-ホスホコリン及び1-アルキル-2-ヒドロキシ-sn-グリセロ 3-ホスホコリンを含むホスホコリン；ジオレオイルホスファチジルコリンを含む、飽和及び不飽和脂質を伴うホスファチジルコリン；ジミリストイルホスファチジルコリン；ジペンタデカノイルホスファチジルコリン；ジラウロイルホスファチジルコリン；ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)；ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)；及びジアラキドニルホスファチジルコリン(DAPC)；ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン(DPPE)及びジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(DSPE)などのホスファチジルエタノールアミン；ホスファチジルセリン；ジステアロイルホスファチジルグリセロール(DSPG)及びジパルミトイル-グリセロールスクシネート(DPGS)を含むホスファチジルグリセロール；ホスファチジイノシトール；スフィンゴミエリンなどのスフィンゴ脂質；スフィンゴシン；ガングリオシドGM1及びGM2などの糖脂質；グルコ脂質；硫脂質；スフィンゴ糖脂質；ジパルミトイルホスファチジン酸(DPPA)及びジステアロイルホスファチジン酸(DSPA)などのホスファチジン酸；パルミチン酸；ステアリン酸；アラキドン酸；オレイン酸；ポリマーを有する脂質であって、そのポリマーはキチン、ヒアルロン酸、ポリビニルピロリドン又はポリエチレングリコール(PEG)などであり、PEGを有する脂質は、ここで「ペグ化脂質(pegylated lipids)」とも称し、ポリマーを有する好ましい脂質としてDPPE-PEG(DPPE-PEG)を含み、これは、結合しているPEGポリマーを有する脂質DPPEのことであり、例えば、平均分子量約5000を有するPEGポリマーを結合しているDPPEのことであるDPPE-PEG5000を含むDPPE-PEGを含めた脂質；脂質支持スルホン化モノー、ジー、オリゴー又は多糖類；例えば、コレステロール、硫酸コレステロール、ヘミコハク酸コレステロール及びコレステロー 30 40 50

ルアミンなどのステロイド；ヘミコハク酸トコフェロール；エーテル及びエステル架橋脂肪酸を伴う脂質；重合脂質（この幅広いバリエーションは、当技術分野でよく知られている）；リン酸ジアセチル；リン酸ジセチル；ステアリルアミン；カルジオリピン；鎖長中に約6から約8個の炭素を有する短鎖脂肪酸を伴うリン脂質；例えば、約6個の炭素からなるアシル鎖及び約12個の炭素からなる別のアシル鎖などの不斉アシル鎖を伴う合成リン脂質；セラミド；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）脂肪族アルコール、ポリオキシアルキレン（例えば、ポリオキシエチレン）脂肪族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から市販されているTWEEN（登録商標）20、TWEEN（登録商標）40及びTWEEN（登録商標）80を含む、TWEEN（登録商標）と称されるような化合物の群）、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エート、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ーポリオキシプロピレンポリマー及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ニオソームを含む、非イオンリポソーム；硫酸コレステロール、酪酸コレステロール、イソ酪酸コレステロール、パルミチン酸コレステロール、ステアリン酸コレステロール、酢酸ラノステロール、パルミチン酸エルゴステロール及びn-酪酸フィトステロールを含む、ステロール脂肪酸エステル；コレステロールグルクロニド、ラノステロールグルクロニド、7-デヒドロコレステロールグルクロニド、エルゴステロールグルクロニド、グルコン酸コレステロール、グルコン酸ラノステロール及びグルコン酸エルゴステロールを含む、糖酸のステロールエステル；ラウリルグルクロニド、ステアロイルグルクロニド、ミリストイルグルクロニド、グルコン酸ラウリル、グルコン酸ミリストイル及びグルコン酸ステアロイルを含む、糖酸及びアルコールのエステル；ラウリン酸スクロース、ラウリン酸フルクトース、パルミチン酸スクロース、ステアリン酸スクロース、グルクロン酸、グルコン酸及びポリウロン酸を含む、糖及び脂肪酸のエステル；サルササポゲニン、スミラゲニン（smilagenin）、ヘデラゲニン（hederagenin）、オレアノール酸及びジギトキシゲニンを含む、サポニン；ジラウリン酸グリセロール、トリラウリン酸グリセロール、ジパルミチン酸グリセロール、グリセロール及び、トリパルミチン酸グリセロール、ジステアリン酸グリセロール、トリステアリン酸グリセロール、ジミリスチン酸グリセロール、トリミリスチン酸グリセロールを含む、グリセロールエステル；n-デシルアルコール、ラウリルアルコール、ミリスチルアルコール、セチルアルコール及びn-オクタデシルアルコールを含む、長鎖アルコール；6-（5-コレステレン-3β-イルオキシ）-1-チオ-β-D-ガラクトピラノシド；ジガラクトシルジグリセリド；6-（5-コレステレン-3β-イルオキシ）-ヘキシル-6-アミノ-6-デオキシ-1-チオ-β-D-ガラクトピラノシド；6-（5-コレステレン-3β-イルオキシ）-ヘキシル-6-アミノ-6-デオキシ-1-チオ-α-D-マンノピラノシド；12-（（（7'-ジエチルアミノ-クマリン-3-イル）-カルボニル）メチルアミノ）-オクタデカン酸；N-[12-（（（7'-ジエチルアミノ-クマリン-3-イル）-カルボニル）メチルアミノ）-オクタデカノイル]-2-アミノパルミチン酸；（4'-トリメチル-アンモニオ）ブタン酸コレステリル；N-スクシニルジオレオイルホスファチジルエタノールアミン；1,2-ジオレオイル-sn-グリセロール；1,2-ジパルミトイル-sn-3-スクシニルグリセロール；1,3-ジパルミトイル-2-スクシニルグリセロール；1-ヘキサデシル-2-パルミトイルグリセロホスホエタノールアミン及びパルミトイルホモシステイン及び／又はこれらの組合せが含まれる。好ましい実施形態では、安定化物質は、1種又は複数のDPPC、DPPE、DPPA、DSPC、DSPE、DSPG及びDAPCを含む、リン脂質を含む。

【0090】

適切なフッ素化脂質の例には、これらに限らないが、次式の化合物が含まれる：



[上式中、mは、0から約18であり、nは、1から約12であり；wは、1から約8である]。これらの例及び合成するための方法、さらに、本発明で 사용할ことができる他のフッ素化脂質は、Ungerの米国特許第5997898号、Reissらの米国特許第5344930号、Frezard, F. らのBiochem Biophys Acta, 1192:61-70 (1994) 及びFrezard, F. らのArt. Cells Blood Subs and Immob Biotech., 22:1403-1408 (1994) に記載されており、これらそれぞれの記載をここでは全て、参照して援用する。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特異的例は、下記の化合物Aにより示される。当技術分野の専門家には、他の通常のリン脂質の同様のフッ素化誘導体（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）、さらに、脂肪族アシルエステル及び遊離脂肪酸のフッ素化誘導体も、本発明の範囲に従い機能しうることは、理解されるであろう。加えて、脂質をベースとするフッ素化（過フッ素化を含む）界面活性剤を、本発明での安定化物質として使用することもできる。

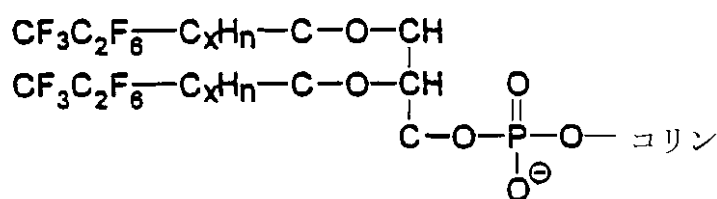
【 0 0 9 1 】

重合脂質の例には、約 50 個までの炭素原子を含有するアルケニル又はアルキニルなどの不飽和親油性鎖が含まれる。その他の例は、重合可能な基を担持する、ホスホグリセリド及びスフィンゴ脂質などのリン脂質；及び、ヒマシ油及び麦角油（ergot oil）を含む、例えば d-12-ヒドロキシオレイン酸のトリグリセリドなどの、ヒドロキシル基を伴う飽和及び不飽和脂肪酸誘導体である。分散性が高まって、生分解により生じる主鎖基が水溶性となるように、カルボキシル又はヒドロキシル基などの親水性置換基を含むように、重合をデザインすることができる。適切な重合可能な脂質は例えば、Klaveness らの米国特許第 5536490 号に記載されており、この記載をここでは全て、参照して援用する。

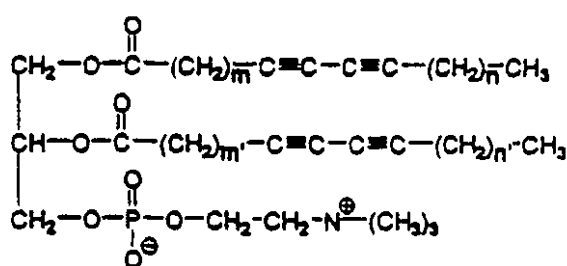
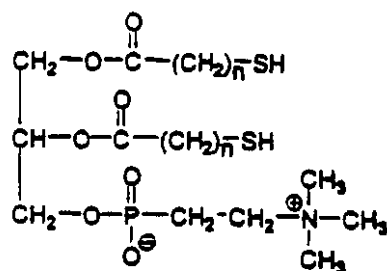
【 0 0 9 2 】

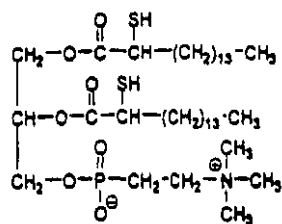
本発明の組成物中使用することができる代表的な重合可能な及び／又はフッ素化脂質化合物を、次に示す。

【化 4】

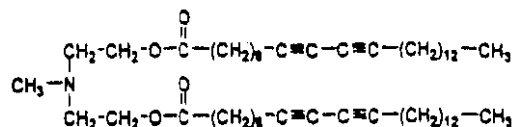


(A)



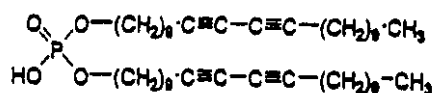


(D)

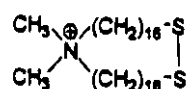


(E)

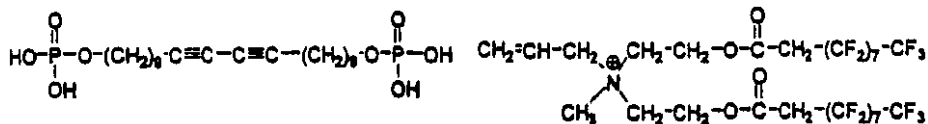
10



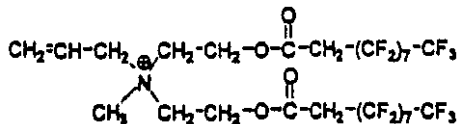
(F)



(G)

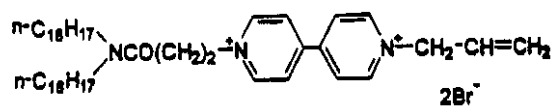


(H)

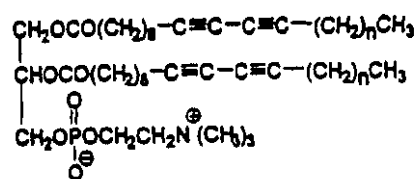


(I)

20

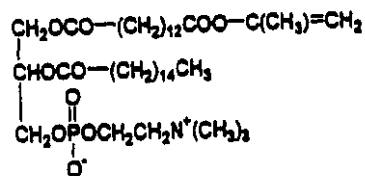


(J)

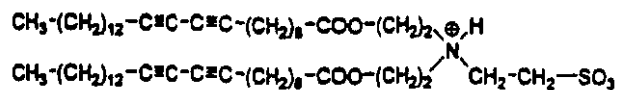


(K)

30

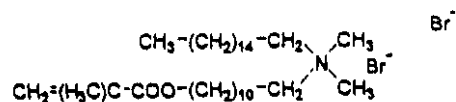
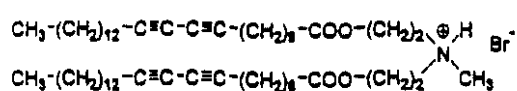


(L)



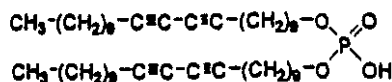
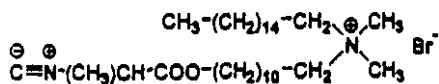
(M)

40



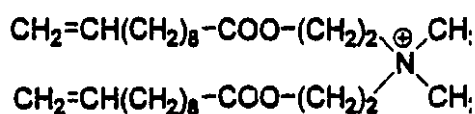
(N)

(0)

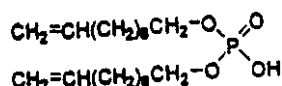
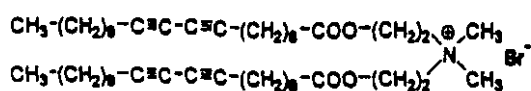


(P)

(Q)

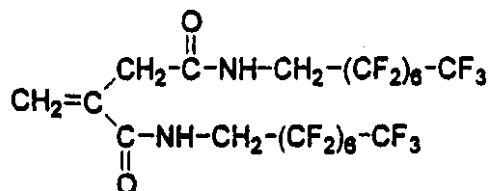


(R)

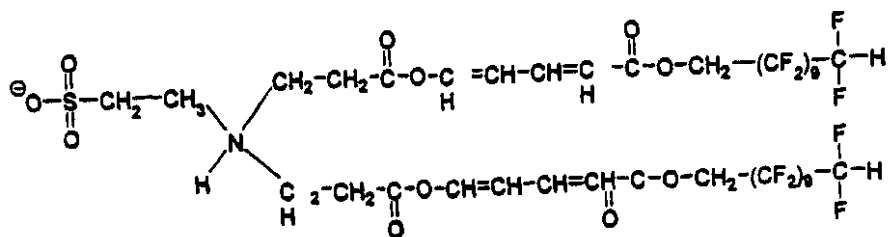


(S)

(T)



(U)



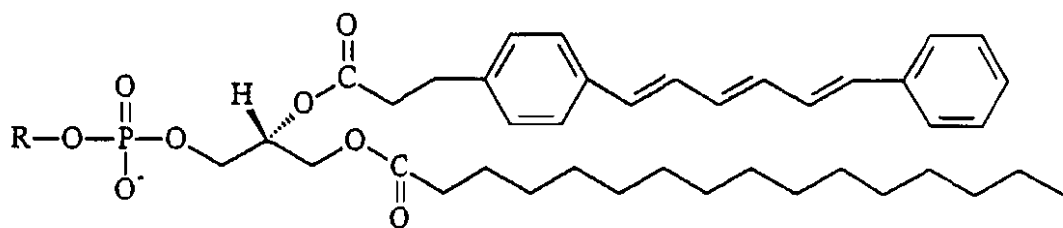
③

上式の式 A 中、 x は、約 8 から約 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。上式の式 B、C 及び K 中、 m 、 n 、 m' 及び n' は独立に、約 8 から約 18、好ましくは約 10 から約 14 の整数である。

【 0 0 9 3 】

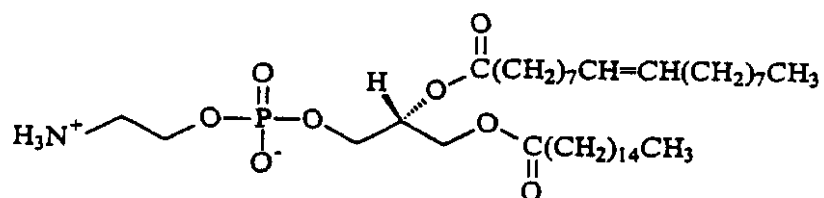
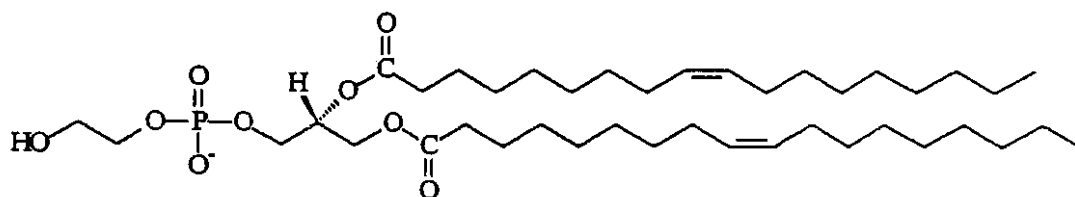
本発明の組成物中使用することができる他の脂質には例えば次式：

【化 5】

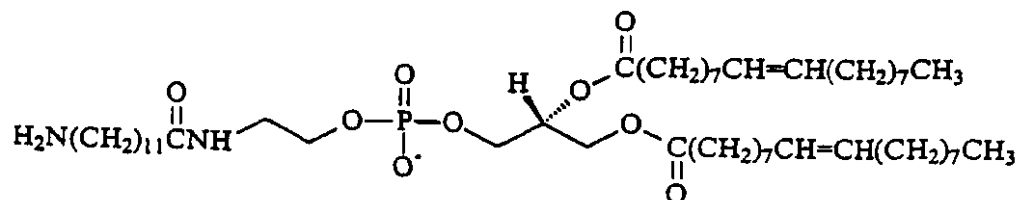
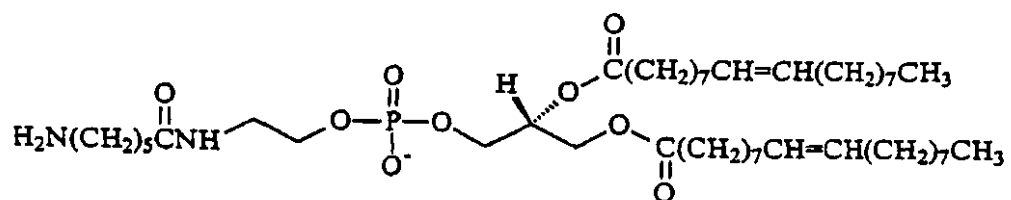


[上式中、Rは、コリンである]、
【化6】

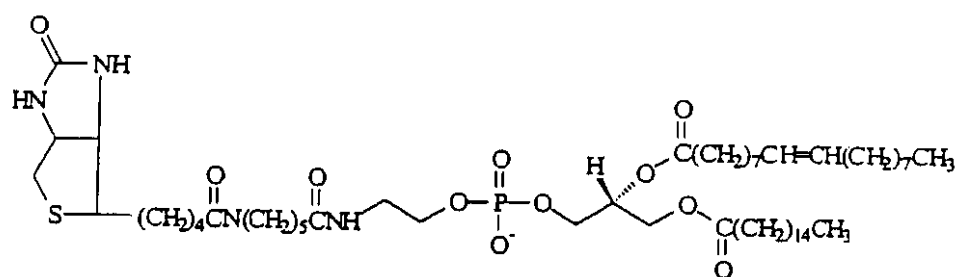
10



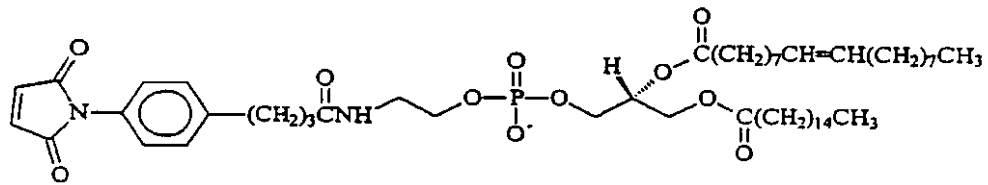
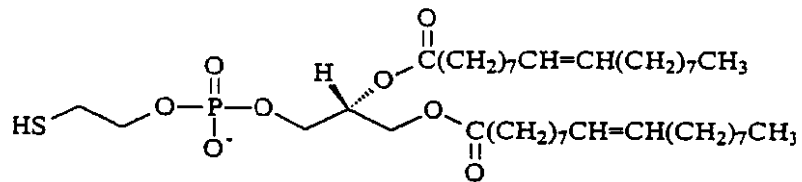
20



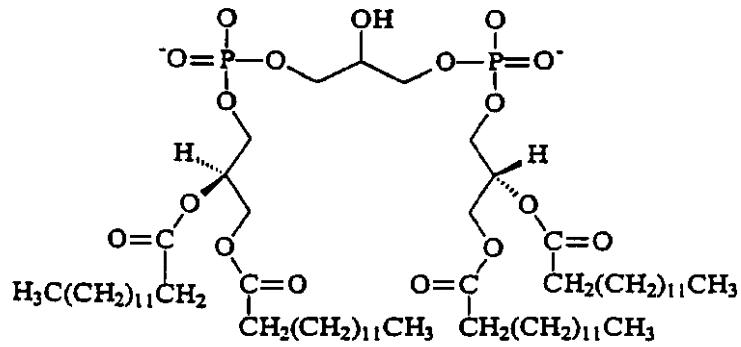
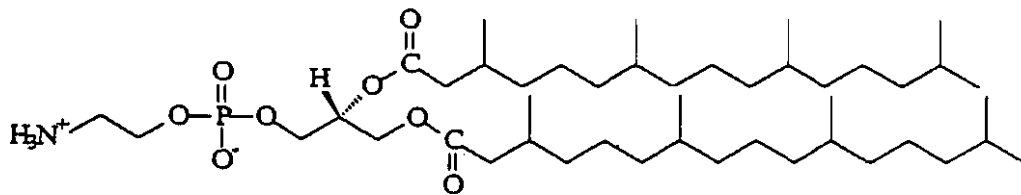
30



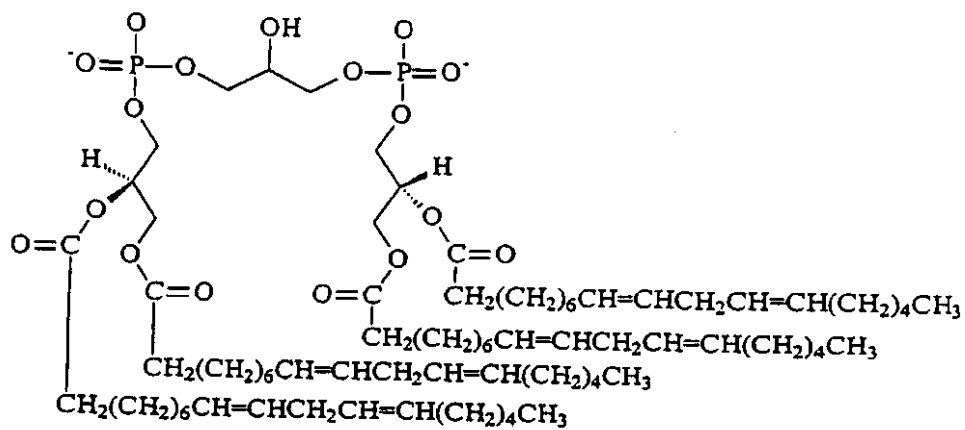
40



10



20

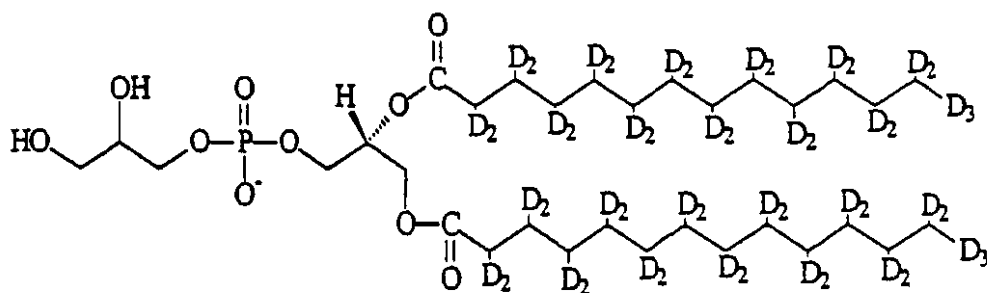


30

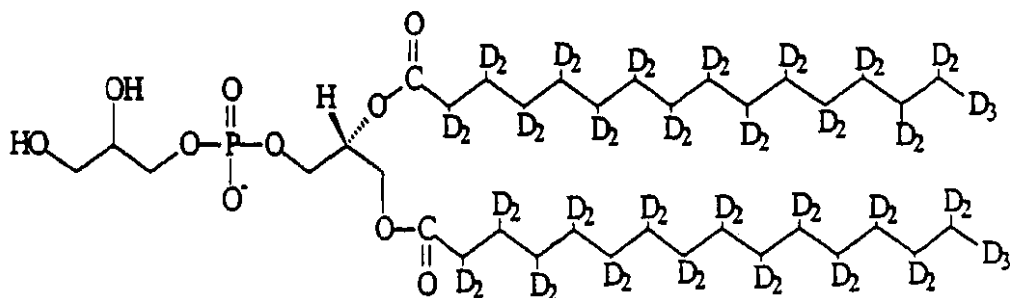
40

次式のような重水素化脂質

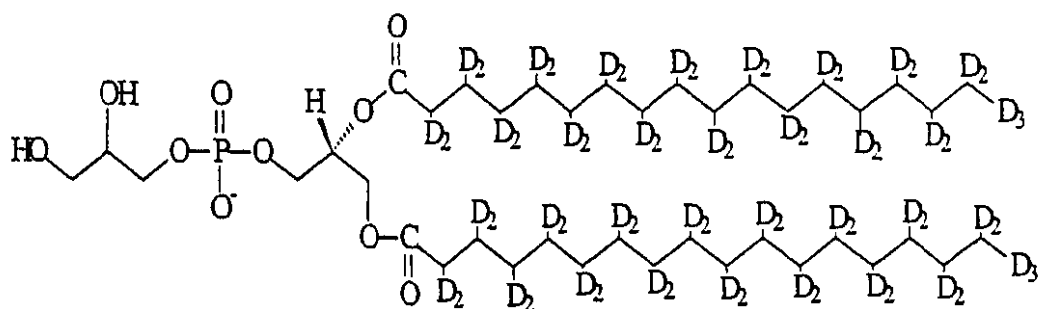
【化 7】



10



20



30

が含まれる。

【0094】

所望の場合には、例えば、塩化N-[1-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウム(DOTMA)、1,2-ジオレオイルオキシ-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン(DOTAP);及び1,2-ジオレオイル-3-(4'-トリメチルアンモニオ)-ブタノイル-sn-グリセロール(DOTB)などのカチオン脂質を使用することができる。脂質組成物中でカチオン脂質を使用する場合には、カチオン脂質と非カチオン脂質とのモル比は例えば、約1:1000から約1:100であってよい。好ましくは、カチオン脂質と非カチオン脂質とのモル比は、約1:2から約1:10であってよく、約1:1から約1:2.5の比が、好ましい。さらに好ましくは、カチオン脂質と非カチオン脂質とのモル比は、約1:1であってよい。

40

【0095】

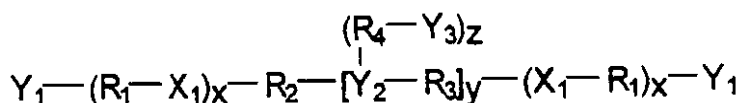
カチオン脂質と非カチオン脂質との両方を含有する脂質組成物の場合には、幅広い脂質を、非カチオン脂質として使用することができる。好ましくは、非カチオン脂質は、1種又は複数のDPPC、DPPG及びジオレオイルホスファチジルエタノールアミンを含む。前記で挙げたカチオン脂質の代わりに、ポリリジン又はポリアルギニンなどの脂質支持カチオンポリマー、さらにホスホン酸アルキル、ホスフィン酸アルキル、亜リン酸アルキルを、脂質組成物中で使用することができる。

50

【0096】

本発明の一定の好ましい実施形態では、脂質組成物は、次式を有する1種又は複数のカチオン脂質を含有してよい

【化8】



(I)

10

[上式中、

x、y及びzはそれぞれ独立に、0から約100の整数であり；

X₁はそれぞれ独立に、-O-、-S-、-NR₅-、-C(=X₂)-、-C(=X₂)-N(R₅)-、-N(R₅)-C(=X₂)-、-C(=X₂)-O-、-O-C(=X₂)-又は-X₂-(R₅X₂)P(=X₂)-X₂-であり；

X₂はそれぞれ独立に、O又はSであり；

Y₁はそれぞれ独立に、リン酸基、N(R₆)_a-、S(R₆)_a-、P(R₆)_a-又は-CO₂R₆であり、ここで、aは、1から3の整数であり；

Y₂はそれぞれ独立に、-N(R₆)_b-、-S(R₆)_b-又は-P(R₆)_b-であり、ここで、bは、0から2の整数であり； 20

Y₃はそれぞれ独立に、リン酸基、N(R₆)_a-、S(R₆)_a-、P(R₆)_a-又は-CO₂R₆であり、ここで、aは、1から3の整数であり；

R₁、R₂、R₃及びR₄はそれぞれ独立に、1から約20個の炭素からなるアルキレンであり；

R₅はそれぞれ独立に、水素又は1から約10個の炭素からなるアルキルであり；かつ

R₆はそれぞれ独立に、-[R₇-X₃]_c-R₈又は-R₉-[X₄-R₁₀]_d-Qであり、ここで：

c及びdはそれぞれ独立に、0から約100の整数であり；

Qはそれぞれ独立に、リン酸基、-N(R₁₁)_q、-S(R₁₁)_q、-P(R₁₁)_q又は-CO₂R₆であり、ここで、qは、1から3の整数であり； 30

X₃及びX₄はそれぞれ独立に、-O-、-S-、-NR₅-、-C(=X₂)-、-C(=X₂)-N(R₅)-、-N(R₅)-C(=X₂)-、-C(=X₂)-O-、-O-C(=X₂)-又は-X₂-(R₅X₂)P(=X₂)-X₂-であり；

R₇はそれぞれ独立に、1から約20個の炭素からなるアルキレンであり；

R₈はそれぞれ独立に、水素又は炭素1から約60個からなるアルキルであり；

R₉及びR₁₀はそれぞれ独立に、1から約20個の炭素からなるアルキレンであり；かつ

R₁₁はそれぞれ独立に、-[R₇-X₃]_c-R₈又は-R₉-[X₄-R₁₀]_d-Wであり、ここで： 40

Wはそれぞれ独立に、リン酸基、-N(R₁₂)_w、-S(R₁₂)_w、-P(R₁₂)_w又は-CO₂R₆であり、ここで、wは、1から3の整数であり；

R₁₂は、-[R₇-X₃]_c-R₈であるが、ただし、式(I)の化合物は、少なくとも1個、好ましくは少なくとも2個の四級塩を含む]。

【0097】

本発明の組成物中に導入することができる他のカチオン脂質化合物は、次式の化合物である

【化9】



(II)

[上式中、

Y_1 はそれぞれ独立に、リン酸基、 $N(R_2)_a-$ 、 $S(R_2)_a-$ 、 $P(R_2)_a-$ 又は $-CO_2R_2$ であり、ここで、 a は、1 から 3 の整数であり；

R_1 は、0 から約 30 個の $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NR_3-$ 又は $-X_2-(R_3X_2)P(=X_2)-X_2-$ ヘテロ原子又はヘテロ原子基を含有する 1 から約 60 個の炭素からなるアルキレンであり；

10

R_2 は、式： $-R_4-[(X_1-R_5)_x-Y_2]_y-R_6$ の基であり、ここで：

x 及び y はそれぞれ独立に、0 から約 100 の整数であり；

X_1 はそれぞれ独立に、直接結合、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NR_3-$ 、 $-C(=X_2)-$ 、 $-C(=X_2)-N(R_3)-$ 、 $-N(R_3)-C(=X_2)-$ 、 $-C(=X_2)-O-$ 、 $-O-C(=X_2)-$ 又は $-X_2-(R_3X_2)P(=X_2)-X_2-$ であり；

X_2 はそれぞれ独立に、O 又は S であり；

Y_2 はそれぞれ独立に、 $-S(R_2)_b-$ 、 $-N(R_2)_b-$ 又は $P(R_2)_b-$ であり、ここで、 b は、0 から 2 の整数であり；

R_3 はそれぞれ独立に、水素又は 1 から約 10 個の炭素からなるアルキルであり；

R_4 及び R_5 はそれぞれ独立に、直接結合又は 0 から約 15 個の $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NR_3-$ 又は $-X_2-(R_3X_2)P(=X_2)-X_2-$ ヘテロ原子又はヘテロ原子基を含有する 1 から約 30 個の炭素からなるアルキレンであり；かつ

20

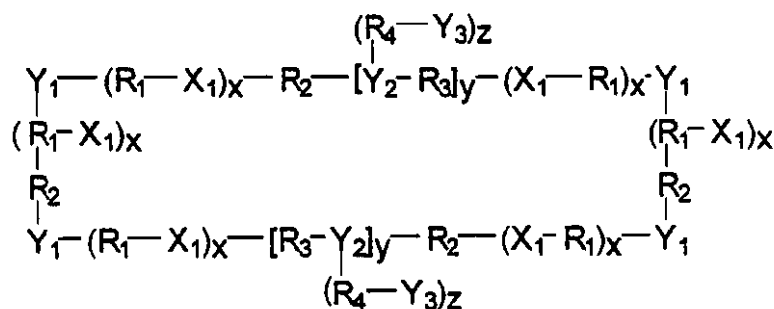
R_6 はそれぞれ独立に、水素又は 0 から約 30 個の $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NR_3-$ 又は $-X_2-(R_3X_2)P(=X_2)-X_2-$ ヘテロ原子又はヘテロ原子基を含有する 1 から約 60 個の炭素からなるアルキルであり；但し、式 (I I) の化合物は、少なくとも 1 個、好ましくは少なくとも 2 個の 4 級塩を含有する]。

【0098】

さらに他の実施形態では、本発明の脂質組成物は、次式のカチオン脂質化合物を含有してもよい

【化10】

30



40

(III)

[上式中、

x 、 y 及び z はそれぞれ独立に、0 から約 100 の整数であり；

X_1 はそれぞれ独立に、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NR_5-$ 、 $-C(=X_2)-$ 、 $-C(=X_2)-N(R_5)-$ 、 $-N(R_5)-C(=X_2)-$ 、 $-C(=X_2)-O-$ 、 $-O-C(=X_2)-$ 又は $-X_2-(R_5X_2)P(=X_2)-X_2-$ であり；

X_2 はそれぞれ独立に、O 又は S であり；

各 Y_1 はそれぞれ独立に、 $-O-$ 、 $-N(R_6)_a-$ 、 $-S(R_6)_a-$ 又は $P(R_6)_a-$ であり、ここで、 a は、0 から 2 の整数であり；

50

Y_2 はそれぞれ独立に、 $-N(R_6)_a-$ 、 $-S(R_6)_a-$ 又は $P(R_6)_a-$ であり、ここで、 a は、0 から 2 の整数であり；

Y_3 はそれぞれ独立に、リン酸基、 $N(R_6)_b-$ 、 $S(R_6)_b-$ 、 $P(R_6)_b-$ 又は $-CO_2R_6$ であり、ここで、 b は、1 から 3 の整数であり；

R_1 、 R_2 、 R_3 及び R_4 はそれぞれ独立に、1 から約 20 個の炭素からなるアルキレンであり；

R_5 はそれぞれ独立に、水素又は 1 から約 10 個の炭素からなるアルキルであり；かつ

R_6 はそれぞれ独立に、 $-[R_7-X_3]_c-R_8$ 又は $-R_9-[X_4-R_{10}]_d-Q$ であり、ここで：

c 及び d はそれぞれ独立に、0 から約 100 の整数であり；

Q はそれぞれ独立に、リン酸基、 $-N(R_{11})_q$ 、 $-S(R_{11})_q$ 、 $-P(R_{11})_q$ 又は $-CO_2R_{11}$ であり、ここで、 q は、1 から 3 の整数であり；

X_3 及び X_4 はそれぞれ独立に、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NR_5-$ 、 $-C(=X_2)-$ 、 $-C(=X_2)-N(R_5)-$ 、 $-N(R_5)-C(=X_2)-$ 、 $-C(=X_2)-O-$ 、 $-O-C(=X_2)-$ 又は $-X_2-(R_5X_2)P(=X_2)-X_2-$ であり；

R_7 はそれぞれ独立に、1 から約 20 個の炭素からなるアルキレンであり；

R_8 はそれぞれ独立に、水素又は 1 から約 60 個の炭素からなるアルキルであり；

R_9 及び R_{10} はそれぞれ独立に、1 から約 20 個の炭素からなるアルキレンであり；かつ

R_{11} はそれぞれ独立に、 $-[R_7-X_3]_c-R_8$ 又は $-R_9-[X_4-R_{10}]_d-W$ であり、ここで：

W はそれぞれ独立に、リン酸基、 $-N(R_{12})_w$ 、 $-S(R_{12})_w$ 、 $-P(R_{12})_w$ 又は $-CO_2R_{12}$ であり、ここで、 w は、1 から 3 の整数であり；かつ

R_{12} は、 $-[R_7-X_3]_c-R_8$ であり；ただし、式 (III) の化合物は、少なくとも 1 個、好ましくは少なくとも 2 個の四級塩を含む。前記で一般的に記載したカチオン脂質化合物は、米国特許第 5830430 号に記載されており、その記載をここでは全て、参照して援用する。

【0099】

一定の好ましい実施形態では、脂質組成物は、リン脂質、特に 1 種又は複数の DPPC、DPPE、DPPA、DSPC、DSPE、DSPG 及び DAPC（炭素 20 個）を含有する。

【0100】

加えて、本脂質組成物で 사용할ことができる飽和及び不飽和脂肪酸は、直鎖又は分枝鎖の形で約 12 個の炭素から約 22 個の炭素を好ましくは含有する分子を含む。イソプレノイド単位及び／又はプレニル基からなる炭化水素基を使用することもできる。適切な飽和脂肪酸の例には例えば、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸及びステアリン酸が含まれる。使用することができる適切な不飽和脂肪酸には例えば、ラウロレイン酸 (lauric)、フィセト酸 (physeteric)、ミリストレイン酸、パルミトレイン酸、ペトロセリン酸及びオレイン酸が含まれる。使用することができる分枝鎖脂肪酸の例には例えば、イソラウリン酸、イソミリスチン酸、イソパルミチン酸及びイソステアリン酸が含まれる。本発明の組成物中使用することができる他の脂質には、Unger らの米国特許第 6090800 号及び Unger の米国特許第 6028066 号に記載されているようなものが含まれ、これらの記載をここでは全て、参照して援用する。

【0101】

脂質組成物及び／又は脂質から処方されるベシクル組成物に加えて、本発明の実施形態は、タンパク質又はその誘導体から処方されるベシクルにも関する。本発明のターゲット化ベシクルを調製するために使用することができるタンパク質から処方されるベシクルは例えば、Feinstein の米国特許第 4572203 号、同 4718433 号及び同 4774958 号及び Cerny らの米国特許第 4957656 号に記載されている。前記の特許に記載されているものに加えて、他のタンパク質ベースのベシクルも、本記載が得

10

20

30

40

50

られれば、当技術分野の専門家には明らかである。

【0102】

脂質組成物及び／又は脂質及び／又はタンパク質から処方されたベシクル組成物に加えて、本発明の実施形態は、天然、半合成（変性された天然）又は合成由来であってよいポリマーから処方されたベシクルにも関する。ここで使用する場合、ポリマーとの用語は、2個又はそれ以上の繰り返しモノマー単位、好ましくは10個又はそれ以上の繰り返しモノマー単位からなる化合物を示している。ここで使用する場合、半合成ポリマー（又は変性天然ポリマー）との句は、何らかの方法で化学的に変性されている天然ポリマーを示している。本発明で使用するために適した代表的な天然ポリマーには、天然由来の多糖類が含まれる。このような多糖類には例えば、アラビナン、フルクタン、フカン（fucan）、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、イヌリンなど）、レバン、フコイダン（fucoidan）、カラギナン、ガラトカロロース（galatocarlolose）、ペクチン酸、アミロースを含むペクチン、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、プスツラン（pustulan）、キチン、アガロース、ケラタン、コンドロイタン（chondroitin）、デルマタン、ヒアルロン酸、アルギン酸、キサンタンガム、デンプン及び、1種又は複数の次のアルドース、ケトース、酸又はアミンを含むようなものなどの様々な他の天然ホモポリマー又はヘテロポリマー：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、ガラクトサミン及びノイラミン酸及びこれらの天然由来の誘導体。したがって、適切なポリマーには例えば、アルブミンなどのタンパク質が含まれる。代表的な半合成ポリマーには、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース及びメトキシセルロースが含まれる。本発明で使用するために適している代表的な合成ポリマーには、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及びポリエチレンテレフタレートなど）、ポリプロピレン（例えば、ポリプロピレングリコールなど）、ポリウレタン（例えば、ポリビニルアルコール（PVA）、塩化ポリビニル及びポリビニルピロリドンなど）、ナイロンを含むポリアミド、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など）及びポリメチルメタクリレート及びこれらの誘導体が含まれる。アクリル酸、メタクリル酸、エチレンイミン、クロトン酸、アクリルアミド、アクリル酸エチル、メタクリル酸メチル、メタクリル酸2-ヒドロキシエチル（HEMA）、乳酸、グリコール酸、ε-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、エピクロロヒドリン、ヒドロキシアルキルアクリレート、シロキサン、ジメチルシロキサン、酸化エチレン、エチレングリコール、ヒドロキシアルキルメタクリレート、N-置換アクリルアミド、N-置換メタクリルアミド、N-ビニル-2-ピロリドン、2, 4-ペンタジエン-1-オール、酢酸ビニル、アクリロニトリル、スチレン、p-アミノースチレン、p-アミノベンジルスチレン、スチレンスルホン酸ナトリウム、2-スルホキシエチルメタクリル酸ナトリウム、ビニルピリジン、メタクリル酸アミノエチル、塩化2-メタクリロイルオキシトリメチルアンモニウム及びポリビニリデンなどのモノマー、さらにN, N'-メチレンビスアクリルアミド、エチレングリコールジメタクリレート、2, 2'-(p-フェニレンジオキシ)-ジエチルジメタクリレート、ジビニルベンゼン、トリアリルアミン及びメチレンビス-(4-フェニル-イソシアネート)などの多官能性架橋モノマー及びこれらの組合せから調製された生体適合性合成ポリマー又はコポリマーが好ましい。好ましいポリマーには、ポリアクリル酸、ポリエチレンイミ

10

20

30

40

50

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(ε-カプロラクトン)、エポキシ樹脂、ポリ(エチレンオキシド)、ポリ(エチレングリコール)及びポリアミド(ナイロン)ポリマーが含まれる。好ましいコポリマーには、次が含まれる：ポリビニリデン-ポリアクリロニトリル、ポリビニリデン-ポリアクリロニトリル-ポリメチルメタクリレート、ポリスチレン-ポリアクリロニトリル及びポリd-1、ラクチドコグリコリド(lactide co-glycolide)ポリマー。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。本記載を得れば、他の適切な生体適合性モノマー及びポリマーは、当技術分野の専門家には容易に分かるであろう。

【0103】

10

前記のように、本脂質組成物は好ましくは、不活性ガスのようなガスを含有する。ガスは、特に、ベシクルの内部にガスが捕捉されているベシクル組成物と組み合わせると、高い反射率を有する脂質組成物をもたらす。これにより、造影剤としてのその有効性が高まる。

【0104】

好ましいガスは、不活性で、生体適合性であるガス、即ち、生体機能を害さないガスである。好ましいガスには、空気、ヘリウム、ルビジウム、過分極キセノン、過分極アルゴン、過分極ヘリウム、ネオン、アルゴン及びキセノンなどの希ガス、二酸化炭素、窒素、フッ素、酸素、六フッ化イオウ及び四フッ化イオウなどのイオウ系ガス、部分的にフッ素化されたガス又は完全にフッ素化されたガスを含む、フッ素化ガスからなる群から選択されるものが含まれる。代表的なフッ素化ガスには、ペルフルオロ炭化水素などのフルオロ炭化水素及びこれらの混合物が含まれる。¹⁷O₂などの常磁性ガスを、脂質組成物中使用することもできる。

20

【0105】

好ましい実施形態では、ガスは、フッ素化ガスを含む。このようなフッ素化ガスには、1種又はそれ以上のフッ素原子を含有する物質が含まれる。1個より多いフッ素原子を含有するガスが好ましく、ペルフルオロ炭化水素(即ち、十分にフッ素化されたフッ素化炭化水素)がより好ましい。好ましくは、ペルフルオロ炭化水素ガスは、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、ペルフルオロペンタン、ペルフルオロシクロブタン及びこれらの混合物からなる群から選択される。さらに好ましくは、ペルフルオロ炭化水素は、ペルフルオロプロパン又はペルフルオロブタンであり、ペルフルオロブタンが特に好ましい。他の好ましいガスは、六フッ化イオウである。他の好ましいガスは、1, 1, 1, 2, 3, 3, 3-ヘプタフルオロプロパン及びその異性体、1, 1, 2, 2, 3, 3, 3-ヘプタフルオロプロパンを含む、ヘプタフルオロプロパンである。ペルフルオロ炭化水素ガスと、空気などの別のタイプのガスからなる混合物などの様々なタイプのガスからなる混合物を、本発明の組成物中使用できると、考えられる。本発明の記載に基づき、当技術分野の専門家には、前記のようなガスを含む他のガスは、容易に分かるであろう。

30

【0106】

一定の好ましい実施形態では、ガス、例えば、空気又はペルフルオロ炭化水素ガスは、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、臭化ペルフルオロオクチル(PFOB)、ペルフルオロデカリン、ペルフルオロドデカリン、ヨウ化ペルフルオロオクチル、ペルフルオロトリプロピルアミン及びペルフルオロトリブチルアミンなどの液体過フッ化炭化水素との組合わせである。

40

【0107】

脂質組成物に、ガス物質への前駆体を導入することも、望ましい。このような前駆体には、インビボでガスに変わりうる物質が含まれる。好ましくは、ガス前駆体は、生体適合性で、インビボで製造されるガスも、生体適合性である。

【0108】

50

ここに記載されている組成物中で使用するために適しているガス前駆体には、pHに対して感受性のある物質が含まれる。これらの物質には例えば、中性又は酸性であるpHにさらされると、ガスを発生しうる物質が含まれる。このようなpH感受性物質の例には、無機酸、有機酸及びこれらの混合物からなる群から選択される酸の塩が含まれる。炭酸(H_2CO_3)は、適切な無機酸の例であり、アミノマロン酸は、適切な有機酸の例である。本記載をもとにすれば、当技術分野の専門家には、無機酸及び有機酸を含む他の酸は、直ちに分かるであろう。

【0109】

塩から誘導されるガス前駆体は好ましくは、アルカリ金属塩、アンモニウム塩及びこれらの混合物からなる群から選択される。さらに好ましくは、塩は、炭酸塩、重炭酸塩、セスキ炭酸塩(*sesqu carbonate*)、アミノマロン酸塩及びこれらの混合物からなる群から選択される。

【0110】

塩から誘導される適切なガス前駆体物質の例には例えば、炭酸リチウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、重炭酸リチウム、重炭酸ナトリウム、重炭酸カリウム、炭酸マグネシウム、炭酸カルシウム、重炭酸マグネシウム、炭酸アンモニウム、重炭酸アンモニウム、セスキ炭酸アンモニウム、セスキ炭酸ナトリウム、アミノマロン酸ナトリウム、アミノマロン酸アンモニウムが含まれる。アミノマロン酸塩は当技術分野でよく知られており、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); 及び Stelmashok et al., Koordinatsionnaya Khimiya, Vol. 3, no. 4, pp. 524-527 (1977)に記載されている。これらの文献の記載をここでは、参照して援用する。

【0111】

pH変化に対して感受性があるだけでなく、又はその代わりに、ガス前駆体物質は、温度変化に対して感受性のある化合物を含んでよい。温度変化に対して感受性のある適切なガス前駆体の例は、ペルフルオロ炭化水素である。専門家には分かるように、特定のペルフルオロ炭化水素は、脂質組成物が製造された当初には、液体状態で存在してよく、したがって、ガス前駆体として使用することができる。もしくは、ペルフルオロ炭化水素は、脂質組成物が製造される際には気体状態で存在してよく、したがって、ガスとしてそのまま使用される。ペルフルオロ炭化水素が液体又はガスのどちらとして使用されるかは通常、その液-ガス相転移温度又は沸点に依ずる。例えば、好ましいペルフルオロ炭化水素、ペルフルオロペンタンは、29.5℃の液-ガス相転移温度(沸点)を有する。このことは、ペルフルオロペンタンは通常、室温(約25℃)では液体であるが、ペルフルオロペンタンの転移温度を上回る、平温が約37℃であるヒトの体内ではガスに変わることを意味している。したがって、正常な環境下では、ペルフルオロペンタンはガス前駆体である。もう1つの例として、ペルフルオロペンタンの同族体、即ち、ペルフルオロブタン及びペルフルオロヘキサンが存在する。ペルフルオロブタンの液-ガス転移は、4℃であり、ペルフルオロヘキサンでは、57℃である。したがって、ペルフルオロブタンは、ガス前駆体として使用することができるが、ガスに近く、一方で、ペルフルオロヘキサンは、その比較的高い沸点により、ガス前駆体として使用することができる。当技術分野の専門家には知られているように、物質の有効沸点は、物質がさらされている圧力に関連する。この関係は、理想気体の法則： $PV = nRT$ により示され、ここで、Pは、圧力であり、Vは、容量であり、nは、物質のモルであり、Rは、気体定数であり、かつTは、温度である。理想気体の法則は、圧力が高まるにつれて、有効沸点も高まることを示している。逆に、圧力が低下するにつれて、有効沸点が低下する。

【0112】

幅広い物質を、本発明の組成物中でガス前駆体として使用することができる。物質は、適切な温度になると、気相へと相転移しうることだけが必要である。適切なガス前駆体には

例えば、ヘキサフルオロアセトン、イソプロピルアセチレン、アレン、テトラフルオロアレン、三フッ化ホウ素、1, 2-ブタジエン、2, 3-ブタジエン、1, 3-ブタジエン、1, 2, 3-トリクロロ-2-フルオロ-1, 3-ブタジエン、2-メチル-1, 3-ブタジエン、ヘキサフルオロ-1, 3-ブタジエン、ブタジイン、1-フルオロブタン、2-メチルブタン、ペルフルオロブタン、1-ブテン、2-ブテン、2-メチル-1-ブテン、3-メチル-1-ブテン、ペルフルオロ-1-ブテン、ペルフルオロ-2-ブテン、4-フェニル-3-ブテン-2-オン、2-メチル-1-ブテン-3-イン、硝酸ブチル、1-ブチン、2-ブチン、2-クロロ-1, 1, 1, 4, 4, 4-ヘキサフルオロブチン、3-メチル-1-ブチン、ペルフルオロ-2-ブチン、2-ブromo-ブチルアルデヒド、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、ペルフルオロヘプタン、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、塩化ジメチルオキソニウム、1, 3-ジオキソラン-2-オン、4-メチル-1, 1, 1, 2-テトラフルオロエタン、1, 1, 1-トリフルオロエタン、1, 1, 2, 2-テトラフルオロエタン、1, 1, 2-トリクロロ-1, 2, 2-トリフルオロエタン、1, 1-ジクロロエタン、1, 1-ジクロロ-1, 2, 2, 2-テトラフルオロエタン、1, 2-ジフルオロエタン、1-クロロ-1, 1, 2, 2, 2-ペンタフルオロエタン、2-クロロ-1, 1-ジフルオロエタン、1, 1-ジクロロ-2-フルオロエタン、1-クロロ-1, 1, 2, 2-テトラフルオロエタン、2-クロロ-1, 1-ジフルオロエタン、クロロエタン、クロロペンタフルオロエタン、ジクロロトリフルオロエタン、フルオロエタン、ペルフルオロエタン、ニトロペンタフルオロエタン、ニトロソペンタフルオロエタン、ペルフルオロエチルアミン、エチルビニルエーテル、1, 1-ジクロロエタン、1, 1-ジクロロ-1, 2-ジフルオロエタン、1, 2-ジフルオロエタン、メタン、塩化トリフルオロメタンスルホニル、フッ化トリフルオロメタンスルホニル、ブromोजフルオロニトロソメタン、ブromoフルオロメタン、ブromoクロロフルオロメタン、ブromot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、ジブromोजフルオロメタン、ジクロロジフルオロメタン、ジクロロフルオロメタン、ジフルオロメタン、ジフルオロヨードメタン、ジシラノメタン、フルオロメタン、ヨードメタン、ヨードトリフルオロメタン、ニトロトリフルオロメタン、ニトロソトリフルオロメタン、テトラフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、トリフルオロメタン、2-メチルブタン、メチルエーテル、メチルイソプロピルエーテル、乳酸メチル、亜硝酸メチル、硫化メチル、メチルビニルエーテル、ネオペンタン、亜酸化窒素、1, 2, 3-ノナデカントリカルボン酸2-ヒドロキシトリメチルエステル、1-ノネン-3-イン、1, 4-ペンタジエン、n-ペンタン、ペルフルオロペンタン、4-アミノ-4-メチルペンタン-2-オン、1-ペンテン、2-ペンテン(シス及びトランス)、3-ブromoペンテ-1-エン、ペルフルオロペンテ-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、十フッ化イオウ(二) (S_2F_{10})、2, 4-ジアミノトルエン

10

20

30

40

50

、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、硫化トリフルオロメチル、六フッ化タングステン、ビニルアセチレン及びビニルエーテル。

【0113】

ペルフルオロ炭化水素は、本発明の方法で使用される組成物に関連して使用するための、好ましいガス及び好ましいガス前駆体の両方である。このようなペルフルオロ炭化水素には、飽和ペルフルオロ炭化水素、不飽和ペルフルオロ炭化水素及び環式過フッ化炭化水素が含まれる。通常は好ましい飽和ペルフルオロ炭化水素は、式： $C_n F_{2n+2}$ を有し、ここでnは、1から約12、好ましくは約2から約10、さらに好ましくは約3から約8であり、特に好ましくは、約3から約6である。適切なペルフルオロ炭化水素には例えば、ペルフルオロメタン、ペルフルオロエタン、ペルフルオロプロパン、ペルフルオロブタン、ペルフルオロシクロブタン、ペルフルオロペンタン、ペルフルオロヘキサン、ペルフルオロヘプタン、ペルフルオロオクタン及びペルフルオロノナンが含まれる。好ましくは、ペルフルオロ炭化水素は、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及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： $C_n F_{2n}$ を有し、ここでnは、3から8、好ましくは、3から6である環式ペルフルオロ炭化水素が好ましく、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及びデカフルオロシクロペンタンが含まれる。

10

【0114】

ペルフルオロ炭化水素に加えて、完全にはフッ素化されていない安定なフルオロ炭化水素を使用することも望ましい。このようなフルオロ炭化水素には、ヘプタフルオロプロパン、例えば、1, 1, 1, 2, 3, 3, 3-ヘプタフルオロプロパン及びその異性体、1, 1, 2, 2, 3, 3, 3-ヘプタフルオロプロパンが含まれる。

20

【0115】

ガス前駆体物質は、ジアゾニウムイオン及びアミノマロン酸塩などの光活性化物質であってもよい。下記で詳細に検討するように、一定の脂質及び／又はベシクル組成物、特にベシクル組成物は、ターゲット組織で、又は脂質組成物への音波の作用により、ガスが生じるように処方することができる。ガス前駆体の例は例えば、米国特許第5088499号及び第5149319号に記載されており、これらの記載をここでは全て、参照して援用する。前記のもの他に、他のガス前駆体は、本記載をベースにすれば、当技術分野の専門家には明らかであろう。

30

【0116】

ガス物質及び／又はガス前駆体を好ましくは、組成物の物理的性質に関わらず、脂質及び／又はベシクル組成物中に導入する。したがって、ガス物質及び／又はその前駆体を例えば、脂質がランダムに凝集している脂質組成物に、さらに、ミセル及びリポソームなどの脂質から処方されているベシクル組成物を含むベシクル組成物中に導入することができる。ガス物質及び／又はその前駆体の脂質及び／又はベシクル組成物への導入は、数多くの方法のうちのいずれかを使用することにより達成することができる。例えば、脂質をベースとするベシクルでは、ガス充填ベシクルの処方は、ガス又はガス前駆体及び1種又は複数の脂質を含有する水性混合物を振盪又は攪拌することにより達成することができる。これにより、ガス又はガス前駆体が封入されている安定なベシクルの形成が促進される。

40

【0117】

加えて、ガスを、脂質及び／又はベシクル形成化合物の水性混合物中で気泡にすることもできる。もしくは、ガス点滴注入法を、例えば、米国特許第5352435号及び同第5228446号に記載されているように使用することができ、これらの記載をここで、全て参照して援用する。カチオン脂質組成物にガス又はガス前駆体を導入するための適切な方法は、米国特許第4865836号に開示されており、この記載をここで、全て参照して援用する。本記載を元にすれば、当技術分野の専門家には、他の方法は明らかであろう。好ましくは、安定化物質を加えた後、又はその間、かつ／又はベシクルの形成の間に、脂質及び／又はベシクル組成物にガスを点滴注入する。

50

【0118】

好ましい実施形態では、ガス物質及び／又はガス前駆体物質を、ベシクル組成物に導入するが、ミセル及びリポソームが好ましい。後記で詳述するように、ガス又はガス前駆体又はその両方が封入されているベシクルが有利であり、これらは、インビボで反射率の改善をもたらす。

【0119】

後記で詳述するように、脂質組成物、特にベシクル組成物を、脂質及び、安定なベシクルの形成を促進する付加的な安定化化合物から処方するのが好ましい。加えて、脂質及び／又はベシクル組成物が高度に安定なガスも含有するのが好ましい。「高度に安定なガス」との句は、水性媒体中で限られた可溶性及び拡散性を有するガスのことである。代表的な高度に安定なガスには、水性媒体中で通常は低い拡散性を有し、比較的不溶性であるペルフルオロ炭化水素が含まれる。したがって、これらの使用により、高度に安定なベシクルの形成を促進することができる。

10

【0120】

一定の実施形態では、例えばヒトの体のインビボ温度を含む脂質及び／又はベシクル組成物の使用温度で、液体状態であり、脂質及び／又はベシクル組成物、特にガス充填ベシクルの安定性を助けるか、強化しうるフッ素化合物、特にペルフルオロ炭化水素化合物を使用することが望ましい。適切なフッ素化合物には例えば、ZONYL（登録商標）界面活性剤（DuPont Company, Wilmington, DE）として市販されているフッ素化界面活性剤などのフッ素化界面活性剤、例えば臭化ペルフルオロオクチル（PFOB）、ペルフルオロデカリン、ペルフルオロドデカリン、ヨウ化ペルフルオロオクチル、ペルフルオロトリプロピルアミン及びペルフルオロトリブチルアミンなどの液体ペルフルオロ炭化水素が含まれる。通常、約6又はそれ以上の炭素原子を含有するペルフルオロ炭化水素は、正常なヒト体温で液体である。これらのペルフルオロ炭化水素のうち、室温で液体である臭化ペルフルオロオクチル及びペルフルオロヘキサンが好ましい。存在するガスは例えば、窒素又はペルフルオロプロパンであってよいが、又はペルフルオロ炭化水素、例えばペルフルオロペンタンであってよいガス前駆体から誘導されてもよい。後者の場合、脂質及び／又はベシクル組成物は、ペルフルオロ炭化水素の混合物から調製することができ、この例は、ペルフルオロプロパン（ガス）又はペルフルオロペンタン（ガス前駆体）及び臭化ペルフルオロオクチル（液体）である。何らかの作動理論に結びつけることは意図しないが、ベシクル組成物の場合、液体のフッ素化合物は、ガスと、ベシクルの膜又は壁表面との間の界面に位置すると考えられる。したがって、安定化化合物、例えばベシクルを形成するために使用される生体適合性脂質の内部表面上に、液体フッ素化合物のもう1つの安定化層が生じ、このペルフルオロ炭化水素層は、ガスが、ベシクル膜を通して拡散することを防ぐ。本発明に関して、ガス前駆体は、製造及び／又は貯蔵温度では液体であるが、少なくとも使用時、又はその間は、ガスになる。

20

30

【0121】

したがって、ペルフルオロ炭化水素などの液体フッ素化合物は、ここに記載されている脂質及び／又はベシクル組成物を製造するために通常使用されるガス又はガス前駆体と組み合わせられると、ガス又はガス前駆体単独では得られない、付加的な安定性をもたらすことが判明した。したがって、ペルフルオロ炭化水素ガス前駆体、例えばペルフルオロペンタンなどのガス又はガス前駆体を、患者に投与された後も液体なままであるペルフルオロ炭化水素、即ちその液-ガス相転移温度が、患者の体温を上回る、例えば臭化ペルフルオロオクチルと共に使用することは、本発明の範囲に該当する。ZONYL（登録商標）フッ素化界面活性剤などの過フッ素化界面活性剤は、脂質及び／又はベシクル組成物を安定化させ、例えば、ベシクルのためのコーティングとして作用させるために使用することができる。好ましい過フッ素化界面活性剤は、部分的にフッ素化されたホスホコリン界面活性剤である。これらの好ましいフッ素化界面活性剤では、二重アルキル化合物が、末端アルキル鎖のところでフッ素化されていてよく、中央炭素は、水素化されていてよい。これらのフッ素化ホスホコリン界面活性剤は、本発明のターゲット化脂質及び／又はベシク

40

50

ル組成物を製造するために使用することができる。

【0122】

ベシクル組成物に関する実施形態では、ベシクルのサイズを、例えば診断及び／又は治療用途を含む特別な所定の最終使用に合わせることができる。ベシクルのサイズは好ましくは、直径約30ナノメートル（nm）から約100マイクロメートル（μm）及びこの範囲内の全ての組合せ及び二次的組合せであってよい。さらに好ましくは、ベシクルは、約100nmから約10μmの直径を有し、約200nmから約7μmの直径がいっそう好ましい。特別な使用、例えば、血管系の磁気共鳴映像法を含む血管内使用では、ベシクルは約30μm以下の直径であるのが好ましく、より小さいベシクル、例えば、直径約12μm以下のベシクルが好ましい。一定の好ましい実施形態では、ベシクルの直径は約7μm又はそれ未満であってよく、平均直径約5μm又はそれ未満を有するベシクルがさらに好ましく、平均直径約3μm又はそれ未満を有するベシクルがいっそう好ましい。これらの比較的小さいベシクルは、微小血管のような小さい血管チャンネルに灌流し、同時に、赤血球細胞がベシクルを通り過ぎることができるように十分なスペース又は余地を、血管チャンネルにもたらす。

10

【0123】

所望の場合には、例えば、振盪、マイクロエマルジョン化、渦流発生、押出し、濾過、音波処理、均一化、繰り返し凍結及び解凍サイクル、規定のサイズの空孔を介しての圧力下での押出しなどを含む様々な手順により、ガス充填ベシクルのサイズを調整することができる。

20

【0124】

前記のように、ここで使用される組成物はさらに、その調製、処方及び使用に関して、温度、pH、光及びエネルギー（超音波など）によって、液体又は固体状態からガスへと変化させることができるガス前駆体を含んでよい。ガス前駆体は、前駆体を減圧下に貯蔵することにより、ガスにすることができる。

【0125】

例えば、減圧下に貯蔵されているバイアルは、注入前に所定のガスを生じさせるために使用することができる、ペルフルオロペンタン又はペルフルオロヘキサンガスのヘッドスペースをもたらしうる。好ましくは、ガス前駆体は、温度により活性化させることができる。後記は、正常な体温（37℃）の比較的近くか、又はそれ未満で、液体からガス状態へと相転移しうる一連のガス前駆体及び、最大サイズ10μmのベシクルを生じさせるために必要な乳化液滴のサイズを挙げている表である。

30

表 2

ガス前駆体の物理的特性および10 μm ベシクルを生じさせるための
乳化液滴の直径

化合物	分子量	沸点	密度	10ミクロンベシクルを 製造するための 乳化液滴の直径 (μm)
ペルフルオ 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- ブテン	68.12	29.5	0.6660	2.5
オクタフルオ シクロヘキサン	200.04	-5.8	1.48	2.8
デカフルオ ヘキサン	238.04	-2	1.517	3.0
ヘキサフルオ 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, eds., CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida (1989-1990).

【0126】

既に記載したように、ペルフルオロ炭化水素は、ガス又はガス前駆体、さらに付加的な安定化成分として使用するために好ましい。

【0127】

前記のように、限られた可溶性を有するガスを使用することにより、脂質及び／又はベシクル組成物、特に脂質から処方されたベシクル組成物の便利性を最適化することが好ましい。「限られた可溶性」との句は、周囲の水性媒体中へのその可溶性によって、ベシクルの外へとガスが拡散する能力のことである。水性媒体中への比較的高い可溶性は、ベシクルの外へとガスが拡散する傾向を有するように、ガスに勾配をもたらす。他方で、水性環境中への比較的低い可溶性は、ベシクルからのガスの拡散を妨げるように、ベシクルと界面との間の勾配を低減するか、除去しうる。好ましくは、ベシクル中に捕捉されているガ

10

20

30

40

50

スは、酸素の可溶性よりも低い可溶性—即ち、水約32部にガス約1部—を有する。Matheson Gas Data Book, 1966, Matheson Company Inc. 参照。さらに好ましくは、ベシクルに捕捉されているガスは、空気の可溶性よりも低い、水への可溶性を有し、いっそう好ましくは、ベシクルに捕捉されているガスは、窒素の可溶性よりも低い、水への可溶性を有する。

【0128】

一定の実施形態では、実質的に不透過性のポリマー物質からベシクルを処方することが望ましい。これらの実施形態では、高度に不溶性のガスを使用することは通常、不要である。例えば、実質的に不透過性のポリマー物質を含む安定なベシクル組成物は、比較的高い可溶性を有するガス、例えば、空気又は窒素と共に処方することができる。

10

【0129】

前記の脂質、タンパク質及び／又はポリマー化合物に加えて、又はこれらに代えて、ここに記載されている組成物は、1種又は複数の安定化物質を含んでよい。このような安定化物質の例は例えば、生体適合性ポリマーである。ベシクルの形成を所望に助けるか、かつ／又はガス又はガス前駆体の実質的な封入を保証するために、安定化物質を使用することができる。ガス及びガス前駆体充填ベシクルの形成で、1種又は複数の安定化材料を使用すると、ペルフルオロプロパン又は六フッ化イオウなどの比較的不溶性で、非拡散性のガスでも、改善されたベシクル組成物を得ることができる。これらの化合物は、そのサイズ、形及び／又は他の属性に関してベシクルの安定性及び完全性の改善を助けうる。

【0130】

「安定な」又は「安定化」との用語は、ここで使用する場合、ベシクルが、例えば、ベシクル構造又は封入されているガス又はガス前駆体の損失を含む劣化に対して、試用期間を通して、実質的に耐性があることを意味している。通常、本発明で使用されるベシクルは、望ましい貯蔵寿命を有し、往々にして、正常な環境条件下に少なくとも約2から3週間、本来の構造の少なくとも約90容量%を保持する。好ましい形態では、ベシクルは望ましくは、少なくとも約1カ月の期間、さらに好ましくは少なくとも約2カ月、いっそう好ましくは少なくとも約6カ月、特に好ましくは約18カ月、極めて好ましくは約3年までの期間、安定である。ガス及びガス前駆体充填ベシクルを含むここに記載されているベシクルは、正常な環境条件下でさらされる温度及び圧力を上回るか、下回る温度及び圧力のような不利な条件下でも安定である。

20

30

【0131】

ここに記載されているベシクルの安定性は、少なくとも部分的に、例えば、前記の脂質、ポリマー及び／又はタンパク質を含む、ベシクルがそれから作られる物質に基づき、往々にして、付加的で、そうするのが好ましいが、付加的な安定化物質を使用する必要はない。このような付加的な安定化物質及びその特性に関しては、後記でさらに詳述する。

【0132】

ベシクルがそれから構成される物質は好ましくは、生体適合性の脂質、タンパク質又はポリマー物質であり、これらの内、生体適合性の脂質が好ましい。加えて、投与の直前にベシクルを調製することができることを含む、その処方の簡単さにより、これらのベシクルは、その位置で便利に作ることができる。

40

【0133】

ガス及びガス前駆体充填ベシクルを調製するために安定化物質として使用することができる生体適合性ポリマーは、天然、半合成（変性天然）又は合成由来であってよい。ここで使用する場合、ポリマーとの用語は、2個又はそれ以上の繰り返しモノマー単位、好ましくは10個又はそれ以上の繰り返しモノマー単位からなる化合物を示している。ここで使用する場合、半合成ポリマー（又は変性天然ポリマー）との句は、何らかの方法で化学的に変性されている天然ポリマーを示している。本発明で使用するために適している代表的な天然ポリマーには、天然由来の多糖類が含まれる。このような多糖類には例えば、アラビナン、フルクタン、フカン（fucan）、ガラクタン、ガラクトツロナン、グルカン、マンナン、キシラン（例えば、イヌリンなど）、レバン、フコイダン（fucoidan

50

)、カラギナン、ガラトカロロース (galatocaro lose)、ペクチン酸、アミロースを含むペクチン、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、プスツラン (pustulan)、キチン、アガロース、ケラタン、コンドロイタン (chondroitan)、デルマタン、ヒアルロン酸、アルギン酸、キサンタンガム、デンプン及び、1種又は複数の次のアルドース、ケトース、酸又はアミンを含むもののような様々な他の天然ホモポリマー又はヘテロポリマー：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、ガラクトサミン及びノイラミン酸及びこれらの天然由来の誘導体が含まれる。したがって、適切なポリマーには例えば、アルブミンなどのタンパク質が含まれる。代表的な半合成ポリマーには、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース及びメトキシセルロースが含まれる。本発明で使用するために適している代表的な合成ポリマーには、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及びポリエチレンテレフタレートなど)、ポリプロピレン (例えば、ポリプロピレングリコールなど)、ポリウレタン (例えば、ポリビニルアルコール (PVA)、塩化ポリビニル及びポリビニルピロリドンなど)、ナイロンを含むポリアミド、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など) 及びポリメチルメタクリレート及びこれらの誘導体が含まれる。安定化化合物としてポリマーを使用するベシクルを調製するための方法は、本記載と、Ungerの米国特許第5205290号 (その記載を全て、参照して援用する) に記載されているような当技術分野で知られている情報とを組み合わせることにより、本記載が得られれば、当技術分野の専門家には、容易に分かるであろう。

【0134】

本発明の特に好ましい実施形態は、3種の成分を含むベシクルに関する：(1) 中性脂質、例えば、非イオン又は両性イオン脂質、(2) 負に荷電している脂質及び(3) 安定化物質、例えば親水性ポリマーを支持する脂質。好ましくは、負に荷電している脂質の量は、存在している全脂質に対して約1モルパーセントより多く、親水性ポリマーを支持する脂質の量は、存在している全脂質に対して約1モルパーセントより多い。代表的で、好ましい負に荷電している脂質には、ホスファチジン酸が含まれる。親水性ポリマーを支持する脂質は望ましくは、ポリマーに共有結合により架橋されている脂質であり、ポリマーは好ましくは、重量平均分子量約400から約100000を有する。適切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及びポリビニルピロリドン及びこれら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、分子量約1000から約7500を有し、分子量約2000から約5000がさらに好ましい。PEG又は他のポリマーは、脂質、例えばDPPCに、アミド、カルバメート又はアミン結合などの共有結合を介して結合しうる。加えて、PEG又は他のポリマーは、例えば、アミド、エステル、エーテル、チオエステル、チオアミド又はジスルフィド結合を含む共有結合により、ターゲッティングリガンド又は他のリン脂質に結合しうる。親水性ポリマーがPEGである場合、このようなポリマーを支持する脂質は、「ペグ化 (pegylated) されている」と言われる。好ましい形態では、親水性ポリマーを支持する脂質は、例えば、重量平均分子量約5000のポリエチレングリコールポリマーを有するDPPC-PEG5000 (DPPC-PEG5000) のことであるDPPC-PEG5000を含むDPPC-PEGであってよい。他の適切なペグ化脂質には例えば、DSPC-PEG5000を含むジステア

【 0 1 3 5 】

【 0 1 3 6 】

【 0 1 3 7 】

【 0 1 3 8 】

付加的な補足的及び基本的安定化物質には、落花生油、キャノーラ油（c a n o l a o i l）、オリーブ油、ベニバナ油、トウモロコシ油又は、ここでの教示に従い安定化化合 50

物として使用するために適していて、摂取可能と一般的に知られている他の油などの物質が含まれる。様々な補足的及び基本的安定化物質は、例えばU n g e rの米国特許第5736121号に記載されていて、その記載をここでは全て、参照して援用する。

【0139】

加えて、混合ミセル系を製造するために使用される化合物が、基本的又は補足的安定化物質としての使用に適し、これらには例えば、臭化ラウリルトリメチルアンモニウム（ドデシルー）、臭化セチルトリメチルアンモニウム（ヘキサデシルー）、臭化ミリスチルトリメチルアンモニウム（テトラデシルー）、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム（ここで、アルキルは、 C_{12} 、 C_{14} 又は C_{16} ）、臭化／塩化ベンジルジメチルドデシルアンモニウム、臭化／塩化ベンジルジメチルヘキサデシルアンモニウム、臭化／塩化ベンジルジメチルテトラデシルアンモニウム、臭化／塩化セチルジメチルエチルアンモニウム又は臭化／塩化セチルピリジニウムが含まれる。

10

【0140】

ここに記載の様々な付加的又は補足的安定化物質を選択することにより、本発明で使用されるガス及びガス前駆体充填ベシクルを、サイズ、可溶性及び熱安定性に応じて調整することができる。これらの物質は、膜とのその物理的相互作用によるだけでなく、ガス及びガス前駆体充填ベシクルの表面の粘度及び界面張力を改質するその能力によって、ベシクル、特に脂質から処方されたベシクルのこれらのパラメーターに影響を及ぼすことができる。したがって、例えば、（a）例えば、炭水化物及びそのリン酸化及びスルホン化誘導体；好ましくは400から100000の分子量範囲を有するポリエーテル；及び好ましくは、200から50000の分子量範囲を有するジー及びトリヒドロキシアリカン及びそのポリマーを含む、粘度調整剤；（b）例えば、アラビアゴム、コレステロール、ジェタノールアミン、モノステアリン酸グリセリルを含むステアリン酸エステル類、ラノリンアルコール、レシチン、モノー及びジーグリセリド、モノーエタノールアミン、オレイン酸、オレイルアルコール、ポロキサマー、例えばポロキサマー188、ポロキサマー184及びポロキサマー181、ステアリン酸ポリオキシエチレン50、ポリオキシシル35ヒマシ油、ポリオキシ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、ステアリン酸ポリオキシ40、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、二酢酸プロピレングリコール、モノステアリン酸プロピレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、モノラウリン酸ソルビタン、モノオレイン酸ソルビタン、モノパルミチン酸ソルビタン、モノステアリン酸ソルビタン、ステアリン酸、トロラミン、パルミタテスル（*p a l m i t a t e s l*）及び乳化ワックスを含む乳化及び／又は可溶化剤；（c）例えば、アラビアゴム、寒天、アルギン酸、モノステアリン酸アルミニウム、ベントナイト、マグマ、カルボマー934P、カルボキシメチルセルロース、カルシウム及びナトリウム及びナトリウム12、カラギナン、セルロース、デキストラン、ゼラチン、ガーゴム、イナゴマメゴム、ヴィーガム（*v e e g u m*）、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、ケイ酸マグネシウム－アルミニウム、*Z e o l i t e s*（登録商標）、メチルセルロース、ペクチン、酸化ポリエチレン、ポビドン、アルギン酸プロピレングリコール、二酸化ケイ素、アルギン酸ナトリウム、トラガカント、キサンタンガム、 α -D-グルコノラクトン、グリセロール及びマンニトールを含む懸濁剤及び／又は粘度上昇剤；（d）ポリエチレングリコール（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）及びポリソルベートなどの合成懸濁剤；並びに（e）例えば、ソルビトール、マンニトール、トレハロース、スクロース、プロピレングリコール及びグリセロールを含む、安定化させ、張性を加える張性上昇剤からなる幅広いバリエーションのうちの1種又は複数を加えることにより、本発明で使用されるガス及びガス前駆体充填ベシクルは、好適に改質及びさらに安定化することができる。

20

30

40

【0141】

前記のように、本発明の組成物はさらに、ターゲッティングリガンドを含有する。一般的には、ターゲッティングリガンドとして使用することができる物質には例えば、抗体、糖

50

タンパク質及びレクチンを含むタンパク質、ペプチド、ポリペプチド、単糖類及び多糖類を含む糖類、ビタミン、ステロイド、ステロイド類似体、ホルモン、補因子、生物活性剤並びにヌクレオシド、ヌクレオチド及びポリヌクレオチドを含む遺伝物質が含まれる。

【0142】

本発明の組成物中に導入されるターゲッティングリガンドは好ましくは、インビボで受容体及び／又は組織をターゲットとしうる物質である。前記のように、組織をターゲットとすることに関して、ターゲッティングリガンドは望ましくは、心筋細胞並びに内皮細胞及び上皮細胞を含む膜組織を含む心臓組織をターゲットとしうる。受容体の場合には、ターゲッティングリガンドは望ましくは、G P I I b I I I a受容体をターゲットとしうる。前記の組織及び受容体を含む組織及び／又は受容体をターゲットとする際に使用するために好ましいターゲッティングリガンドは、タンパク質、ペプチド、糖類、ステロイド、ステロイド類似体、生物活性剤並びに例えば抗体を含む遺伝物質、糖タンパク質及びレクチンからなる群から選択され、ペプチドが好ましい。ターゲッティングリガンドとして使用するために好ましいタンパク質の例は、*Staphylococcus aureus*の多くの株により産生されるタンパク質であるプロテインAである。プロテインAは、例えば、*Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO) から市販されている。プロテインAは、様々なIgG抗体を結合するために使用することができる。一般的には、ターゲッティングリガンドとして特に有効なペプチドには、天然の、変性された天然の、又は合成ペプチドが含まれ、これらは、血管に循環しているエステラーゼ、アミダーゼ又はペプチダーゼによる劣化に対する付加的なモードの耐性をもたらし、ペプチド成分を安定化する非常に有効な方法の1つは、環化技術を使用することを伴う。例としては、カルボキシ末端が、アミド結合を介してアミン末端に共有結合する末端-末端環化は、ペプチド劣化を阻害し、循環寿命を増加するために役立つ。さらに、側鎖-側鎖環化も、安定性をもたらし際に特に役立つ。加えて、末端-側鎖環化も、変性に役立つ。加えて、ペプチドの戦略的 (s t r a t e g i c) 領域中のD-アミノ酸をL-アミノ酸に置換することは、生物分解に対する耐性をもたらし。適切なターゲッティングリガンド及びその調製方法は、この記載を得れば、当技術分野の専門家には、容易に分かるであろう。

【0143】

内皮細胞をターゲットとすることに関連して、適切なターゲッティングリガンドには例えば、1種又は複数の次のものが含まれる：例えば、塩基性繊維芽細胞成長因子 (b F G F)、酸性繊維芽細胞成長因子 (a F G F)、 α 型形質転換成長因子 (T G F - α)、 β 型形質転換成長因子 (T G F - β)、血小板由来内皮細胞成長因子 (P D - E C G F)、血管内皮成長因子 (V E G F) 及びヒト成長因子 (H G F) を含む成長因子；アンジオジェニン； α 型腫瘍壊死因子 (T N F - α) 及び β 型腫瘍壊死因子 (T N F - β) を含む腫瘍壊死因子；約4500の分子量を有する銅含有ポリリボヌクレオチドアンギオトロピン (a n g i o t r o p i n)、さらに、1-ブチリルグリセロールなどの低分子量の非ペプチド血管由来因子；例えば、プロスタグランジンE₁ (P G E₁) 及びプロスタグランジンE₂ (P G E₂) を含む、プロスタグランジン；ニコチンアミド；アデノシン；ジピリダモール；ドブタミン；例えば、ヒアロビウロン酸を含む、 β 結合の加水分解により生じる分解産物などのヒアルロン酸分解産物；例えば、コラゲナーゼ阻害剤を含む、血管形成阻害剤；ミノサイクリン；メドロキシプロゲステロン；6-O-硫酸及び6-O-カルボキシメチル基で化学的に改質されているキチン；テトラヒドロコルチゾルなどの血管新生抑制 (a n g i o s t a t i c) ステロイド；並びに例えば、コルチゾン又はヒドロコルチゾンなどのステロイドと混合されている、分子量約6000を有する断片などのヘパリンの断片を含む、ヘパリン；アンギオインヒビン (a n g i o i n h i b i n、A G M - 1470：血管新生抑制抗生物質) を含む、血管形成阻害剤；血小板第4因子；プロタミン；*Arthobacter*種の細菌膜に由来する硫酸化多糖類ペプチドグリカン錯体；*Aspergillus fumigatus*に由来するフマギリンなどのカビ由来血管形成阻害剤；D-ペニシラミン；チオリンゴ酸金；トロンボスポンジン (t h r o m b o s p o n d i n)；例えば、1- α 、25-ジヒドロキシビタミンD₃ 及び合成類似体の

22-オキサー1- α 、25-ジヒドロキシビタミンD₃を含む、ビタミンD₃類似体； α -インターフェロン；例えば、インターロイキン-1（IL-1）、インターロイキン-2（IL-2）及びインターロイキン-8（IL-8）を含む、インターロイキンなどのサイトカイン；顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）；ヘパリンの低分子量断片又はヘパリンの類似体を含む、ヘパリン； α -、 β -及び γ -シクロデキストリンを含む、シクロデキストリンなどの簡単な硫酸化多糖類；テトラデカ硫酸塩；トランスフェリン；フェリチン；血小板第4因子；プロタミン；銅と錯化しているGly-His-Lys；セルロプラスミン；（12R）-ヒドロキシエイコサトリエン酸；オカダ酸；レクチン；抗体；CD11a/CD18；及びVLAインテグリン-4（VLA-4）

10

【0144】

内皮性白血球付着分子（ELAM）は、ストレス条件下に内皮細胞により発現され、血管系をライニングしている内皮を介して、周囲組織へと白血球が移動するのを容易にする抗原である。これらの同じ内皮性白血球付着分子を有利に、ベシクルのターゲッティングのための受容体として利用することができることは意外な発見である。これらの内皮細胞付着分子は、セレクトインとして知られているファミリーに属し、このファミリーでは、GMP-140などの知られているメンバーは全て、内皮性白血球付着に関係し、ELAM-1、LAM-1及び、血小板活性-依存性顆粒外膜タンパク質（PADGEM）としても知られている顆粒膜タンパク質140（GMP-140）、VCAM-1/INCAM-110（血管付着分子/誘導性付着分子）及びICAM-1（細胞内付着分子）が含まれる。細胞付着分子のカドヘリンファミリーも、ターゲッティングリガンドとして使用することができ、例えば、E-、N-及びP-カドヘリン、カドヘリン-4、カドヘリン-5、カドヘリン-6、カドヘリン-7、カドヘリン-8、カドヘリン-9、カドヘリン-10及びカドヘリン-11が含まれ、カドヘリンC-5が最も好ましい。さらに、例えば、モノクローナル抗体Ec6C10などのカドヘリンを対象とする抗体を、特異的内皮細胞により局所的に発現されるカドヘリンを認識するために使用することもできる。

20

【0145】

幅広い異なるターゲッティングリガンドを、ELAM分子の細胞質ドメインに結合するために選択することができる。該当するターゲッティングリガンドには、レクチン、幅広い炭水化物又は糖成分、抗体、抗体断片、例えばFab'2などのFab断片並びに、創傷治癒を対象としうる例えばアルギニン-グリシン-アスパラギン酸（R-G-D）を含む合成ペプチドが含まれる。これらの物質の多くは、天然源に由来しうるが、いくつかは、分子生物学的組換え技術により合成することができ、他は、元から合成であってよい。当技術分野で現在知られている様々な組合せ化学技術により、ペプチドを調製することができる。CD11a/CD18などのヒト白血球源に由来するか、それから変性されているターゲッティングリガンド及び白血球細胞表面糖タンパク質（LFA-1）は、内皮細胞受容体ICAM-1に結合すると知られているようなものと同様に使用することができる。免疫グロブリンスーパーファミリーのサイトカイン誘導メンバーである単核白血球選択的なVCAM-1を、ターゲッティングリガンドとして使用することもできる。ヒト単球に由来するVLA-4は、VCAM-1をターゲットとするために使用することができる。抗体及び他のターゲッティングリガンドは、内皮細胞増殖マーカーであるエンドグリン（endoglin）をターゲットとするために使用することができる。エンドグリンは、多種多発性充実性腫瘍中の内皮細胞にアップレギュレーションされる。エンドグリンをターゲットとするために使用することができるターゲッティングリガンドは、抗体TEC-11である。R. E. Thorpe and F. J. Burrows, Breast Cancer Research and Treatment, Vol. 36, pp. 237-51 (1995)。

30

40

【0146】

本発明では、アテローム硬化の環境での内皮細胞活性を、例えばアテローム斑を含む、アテローム硬化の領域に対して組成物をターゲット化するために使用する。使用することが

50

できるこのようなターゲットの1つは、A T H E R O - E L A MとしてのR b 1 / 9により認識される誘導性単核白血球内皮付着分子である。モノクローナル抗体のH 4 / 1 8及びH 1 8 / 7を、サイトカイン化学伝達物質により惹起される内皮細胞表面抗原をターゲットとするために使用することができる。本発明の好ましい実施形態では、深刻な損傷が生じる前に、例えば、脳卒中又は心筋梗塞の前に、疾患血管を非観血に検出して、適切な医学的又は外科的干渉を実施することができるように、ガス充填ベシクルを、アテローム斑に対してターゲット化する。A T H E R O - E L A Mは、好ましいターゲットであり、アテローム硬化の際に内皮細胞上に発現されるこの細胞表面エピトープをターゲットとするために、抗体、ペプチド又はレクチンあるいはこれらの組合せ等のリガンドを、使用することができる。もしくは、低密度又は高密度リポタンパク質から誘導されるリポタンパク質又はリポタンパク質断片を、ターゲッティングリガンドとして使用することができる。加えて、内皮細胞をターゲットとし、脂質、ベシクルなどをアテローム斑の領域に局在させるために、コレステロールを使用することができる。ターゲッティングリガンドとしてコレステロールを使用する実施形態では、コレステロールは好ましくは、他の化学的基、成分、リガンドなどで修飾（非誘導体化）しない。

10

【0147】

斑中の血栓性物質を対象とするターゲッティングリガンドを、アテローム斑の活性領域と非活性領域とを区別するために使用することができる。血栓の発生プロセスでの活性斑はより危険である。それというのも、これらの斑は最終的に、血管を詰まらせるか、塞栓をもたらすためである。これに関して、低分子量のヘパリン断片に加えて、例えば、血小板活性化因子を対象とする抗線維抗体、組織プラスミノゲン活性化因子（t - P A）、抗トロンビン抗体及びフィブリン抗体などの他のターゲッティングリガンドを、血餅の発生を伴う活性斑をターゲットとするために使用することができる。最も好ましいターゲッティングリガンドは、P - セレクチンをターゲットとすることに加えて、活性化血小板中の形質膜随伴G P I I b I I I a及び、G P I I b I I I aを対象とする抗体又は随伴抗体断片をターゲットとするものである。本発明は、急性心筋梗塞の領域を検出するためにも使用することができる。通常、抗ミオシン（特に、心筋ミオシン）抗体又は抗アクチン抗体を、脂質、ポリマー又は安定化物質に結合することにより、梗塞心筋を、本発明の方法により検出することができる。肉芽組織をターゲットとするためには（創傷治癒）、前記のターゲッティングリガンドの多くを使用することができる。創傷治癒トリペプチド、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸（R G D）を、これに関連するターゲッティングリガンドとして使用することもできる。

20

30

【0148】

前記の内皮細胞と同様に、幅広いペプチド、タンパク質及び抗体を、上皮細胞をターゲットとするためのターゲッティングリガンドとして使用することができる。好ましくは、上皮細胞ターゲット受容体に対して高い親和性を有する合成、半合成又は天然由来のペプチドを含むペプチドを選択することができるが、合成ペプチドが、より好ましい。これらの好ましい実施形態では、約5から約15個のアミノ酸基を有するペプチドが好ましい。抗体は、天然由来又は組換え由来の全抗体又は抗体断片、例えばF a b又はF a b ' 2として使用することができる。天然由来の抗体は、動物又はヒト由来であってよいが、キメラであってよい（マウス／ヒト）。ヒト組換え又はキメラ抗体が好ましく、断片が、全抗体よりも好ましい。

40

【0149】

本発明でターゲッティングリガンドとして使用することができるモノクローナル抗体の例には、舌の全ヒト扁平上皮癌でB A L B / cマウスを免疫化し、抽出された脾臓細胞とN S 1同系骨髄腫細胞系のものとを交叉させてハイブリドーマを生じさせることによるC A L A M 2 7が含まれる。G i o a n n i , J . e t a l . , C a n c e r R e s e a r c h , V o l . 4 7 , p p . 4 4 1 7 - 4 4 2 4 (1 9 8 7) 。 C A L A M 2 7は、正常及び悪性上皮細胞の両方の表面エピトープを対象としている。正常なリンパ節は通常、これらのエピトープを発現する細胞は含有しない。C a n c e r R e s e a r c h , V

50

ol. 47, pp. 4417-4424 (1987) 参照。したがって、この抗体を含有する脂質及び／又はベシクル組成物は、リンパ節への転移をターゲットとするために使用することができる。モノクローナル抗体 3C2 は、重症の卵巣ガン及び子宮内膜ガンの悪性上皮細胞をターゲットとするためのターゲットティングリガンドとして使用することができる。他の代表的なターゲットティングリガンドは、Mab 4C7 であり (Cancer Research, Vol. 45, 2358-2362, 1985 参照)、これは、粘液性ガン、子宮内膜及び中腎ガンをターゲットとするために使用することができる。頭部及び頸部のガンでの扁平上皮癌をターゲットとするためには、Mab E48 (Biological Abstract, Vol. 099 Issue. 066 Ref. 082748) を、ターゲットティングリガンドとして使用することができる。悪性黒色腫をターゲットとするためには、モノクローナル抗体 225.28s (Pahol. Biol., Vol. 38 (8), pp. 866-869, 1990) を使用することができる。

【0150】

上皮成長因子受容体 (EGFR)、繊維芽細胞成長因子受容体、erbB2/HER-2 及び腫瘍随伴炭水化物抗原などの乳ガンに随伴する抗原を含む、抗原をターゲットとするために、ターゲットティングリガンドを選択することができる (Cancer, Vol. 74 (3) pp. 1006-12 (1994))。サイトケラチン (cytokeratin) 8、18 及び 19 に相似している CTA16.88 は、結腸、すい臓、乳房、卵巣及び肺のガンを含む、多くの内皮由来腫瘍により発現される。したがって、CTA16.88 上の異なるエピトープを認識する 16.88 (IgM) 及び 88BV59 (IgG3k) などの、これらのサイトケラチンを対象とする抗体を (Semin. Nucl. Med., Vol. 23 (2), pp. 165-79 (1993))、ターゲットティングリガンドとして使用することができる。結腸ガンをターゲットとするためには、抗-CEA IgG Fab' 断片を、ターゲットティングリガンドとして使用することができる。化学的に共役な二重特異性抗細胞表面抗原、抗-ハプテン Fab'-Fab 抗体を、ターゲットティングリガンドとして使用することもできる。MG 系モノクローナル抗体を、例えば、胃ガンをターゲットとするために選択することができる (Chin. Med. Sci. J., Vol. 6 (1), pp. 56-59 (1991))。

【0151】

ターゲットティングリガンドをそのために選択することができる、様々な内皮細胞上の細胞表面エピトープが存在する。例えば、タンパク質ヒトパピローマウイルス (HPV) は、皮膚及び粘膜中の良性及び悪性上皮増殖に随伴している。2 種の HPV オンコジンタンパク質、E6 及び E7 をターゲットとすることができる。それというのも、これらは、子宮頸癌などの特定の上皮由来ガンで発現されうるためである。Curr. Opin. Immunol. Vol. 6 (5), pp. 746-54 (1994) 参照。ガン細胞増殖に関わるペプチド成長因子 (PGF-R) のための膜受容体を、腫瘍抗原として選択することもできる。Anticancer Drugs, Vol. 5 (4), pp. 379-93 (1994)。さらに、上皮成長因子 (EGF) 及びインターロイキン-2 を、これらの受容体に結合するペプチドを含む適切なターゲットティングリガンドのターゲットとすることができる。悪性黒色腫細胞により発現される上皮成長因子受容体 (EGFR) 及び付着分子などの一定の黒色腫随伴抗原 (MAA) を、ここで提供されている組成物のターゲットとすることができる (Tumor Biol., Vol. 15 (4), pp. 188-202 (1994))。ガン細胞の表面に位置する腫瘍随伴抗原 FAB-72 を、ターゲットとして選択することもできる。

【0152】

心筋細胞をターゲットとするために、幅広いターゲットティングリガンドを選択することができる。代表的なターゲットティングリガンドには例えば、ポリクローナル抗体、Fab' 2 断片を含有するか、ヒト由来、動物由来、例えばマウス由来又はキメラ由来であってよい抗カルジオミオシン (anticardiomysin) 抗体が含まれる。付加的なターゲットティングリガンドには、ジピリダモール；ジギタリス；ニフェジピン；アポリポ

タンパク質； α -LDL、VLDL及びメチルLDLを含む低密度リポタンパク質（LDL）；リアノジン（リアノジン）；エンドセリン；補体レセプター1型；IgG Fc； β 型1-アドレナリン性；ジヒドロピリジン；アデノシン；鉍質コルチコイド；ニコチン様アセチルコリン及びムスカリン様アセチルコリン；ヒト α 1A-アドレナリン受容体に対する抗体； α 1-アンタゴニストプラゾシンを含む薬剤などの生物活性剤；抗 β -受容体に対する抗体；抗 β 受容体に結合する薬剤；抗心RyR抗体；心組織上に強力な陽性変力効果を及ぼす内皮細胞由来血管収縮ペプチドであるエンドセリン-1（エンドセリン-1は、心筋細胞膜ベシクルに結合する）；T細胞受容体 α - β 受容体に対して生じるので、ターゲッティングリガンドを生じさせるために使用することができるモノクローナル抗体；補体阻害剤sCR1；ジヒドロピリジン受容体に対して生じる薬剤、ペプチド又は抗体；抗インターロイキン2受容体を対象とするモノクローナル抗体を、本組成物の対象を心筋組織の領域とするためのターゲッティングリガンドとして使用することができ、その際、心筋組織が、この受容体を発現し、炎症の状態でアップレギュレーションされる；同様に、組成物の対象を炎症心筋組織の領域とするためにシクロスポリン；メチルイソブチルイソニトリル；心筋細胞及び心内皮細胞の膜上で特定の糖類に結合するレクチン；内在低血圧及び血管緊張性ペプチドであるアドレノメデュリン（adrenomedullin；ADM）；心房性ナトリウム排泄増加性ペプチド（ANP）；内皮細胞由来の22アミノ酸ペプチドであり、構造的に、心房性ナトリウムペプチドに類似しているが、遺伝子的に異なり、血管作動性及び抗分裂促進活性を有するC型心房性ナトリウムペプチド（CNP）；心房性ナトリウム排泄増加性ペプチド（ANP）及びC型心房性ナトリウム排泄増加性ペプチド（CNP）のキメラであり、27個のアミノ酸を含むバソナトリン（vasonatriin）ペプチド（VNP）；トロンビン；内皮由来弛緩因子（EDRF）；天然エンドペプチダーゼ1（NEP-1）；例えば、NG-モノメチル-L-アルギニン（L-NMMA）を含むEDRFに対する補体阻害剤；カリブドトキシン（charybdotoxin）及びグリベンクラミドなどのカリウムチャネルアンタゴニスト；患者では、特発性拡張型心筋症とみなされるが、好ましいことに、心筋中の細胞融解を惹起することはない抗心臓抗体；アデニンヌクレオチドトランスロケーター、分枝鎖ケト酸デヒドロゲナーゼ又は心ミオシンを対象とする抗体；BQ-123とも称されるエンドセリン-A受容体のための特異的アンタゴニスト；及びアンギオテンシンII受容体に対する抗体が含まれる。

【0153】

心筋細胞膜の主な抗原のうちの2種は、ジヒドロピリジン受容体と共に同時浄化（copurify）されるカルシウム結合糖タンパク質である。ポリクローナル又はモノクローナル抗体を含む抗血清は、精製筋細胞膜に対して上昇しうる。これらの抗体は、ターゲッティングリガンドとして使用することができる。カルシウム結合糖タンパク質の精製分率は、筋細胞膜の形質膜から単離して、抗体を生じさせるために使用することができる。前記のように、ターゲッティングリガンドとして使用することができるANPは、ヒト大動脈内皮細胞の培養から得ることができる。ANPは通常、内皮に局在するが、内皮又は心筋組織にも局在しうる。例えば、組換え技術を使用して、さらに、当技術分野の専門家によく知られているペプチド合成技術を使用するペプチド合成により、ANPは調製することができる。ANPを対象とするポリクローナル又はモノクローナルの抗体を使用することもできる。同様に、ANPを対象とするペプチドを、内皮及び／又は心筋細胞をターゲットとするために使用することもできる。心房性ナトリウム排泄増加性因子の β 型及び α 型の両方を、本組成物の対象を心筋組織にするための強力なターゲッティングリガンドとして使用することができる。

【0154】

本脂質組成物、特にベシクル組成物の対象をGP11bIIIa受容体とするために、幅広いターゲッティングリガンドを使用することができる。好ましい形態では、ターゲッティングリガンドは、約 10^{-3} モル以下の、GP11bIIIa受容体に対する結合親和性（Kd）を示す。さらに好ましくは、ターゲッティングリガンドは、例えば、約 10^{-

⁹ モルから約 10^{-3} モル未満の範囲の結合親和性及びこの範囲内の結合親和性の全ての組合せ及び二次的組合せなどの、約 10^{-3} モル未満の GPIIb/IIIa 受容体に対する結合親和性 (Kd) を示す。いっそう好ましくは、ターゲッティングリガンドは、約 10^{-7} モルから約 10^{-5} モルの GPIIb/IIIa 受容体に対する結合親和性 (Kd) を示し、約 10^{-6} モルの結合親和性が特に好ましい。

【0155】

GPIIb/IIIa 受容体を対象とする組成物は、血管血栓又は血餅をターゲットとするために非常に有効であり、診断、さらにこのような血餅を治療するために有効である。一定の好ましい実施形態では、ターゲッティングリガンドは、例えば Arg-Gly-Asp (RGD) などの配列 Gly-Asp (GD) を含有するペプチドである。他の好ましい実施形態では、ターゲッティングリガンドは、例えば、フィブリノゲンの γ -カルボキシ配列である配列 Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val (KQAGDV) を含有するペプチドなどの、配列 Ala-Gly-Asp (AGD) を含有するペプチドである。 10

【0156】

本発明の組成物及び方法で使用するために適しているターゲッティングリガンドには、Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS)、Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro (GRGDSP) 及び Gly-Pro-Arg-Pro (GPRP) などのペプチドが含まれる。例えば、アミノ酸配列 Arg-Gly-Asp (RGD) を含有する環式ペプチドである G4120 を含む、配列 Arg-Gly-Asp (RGD) を含有する 20 ペンタペプチドも使用することができる。例えば、

NKLIVRRGQS F Y V Q I D F S R P Y D P R R D L F R V E Y V I G R Y P Q E
NKGTYIPVP I V S E L Q S G K W G A K I V M R E D R S V R L S I Q S S P K
C I V G K F R M Y V A V W T P Y G V L R T S R N P E T D T Y I L F N P W C E D D
A V Y L D N E K E R E E Y V L N D I G V I F Y G E V N D I K T R S W S Y G Q F -
R' (ここで、R' は、-CONH₂ 又は -NH₂ である)

などの断片を含む、ヒト凝固因子 XIIIa に由来するペプチドも使用することができる。加えて、XIIIa 因子の断片であるペプチドは、その配列中に、配列

NKLIVRRGOS F Y V Q I D F S R P Y D P R R D 又は
DDAVYLDNEKERE E Y V L N D I G V I F Y G E V N D I K T R S W S Y G Q 30
F

を含む断片である。

【0157】

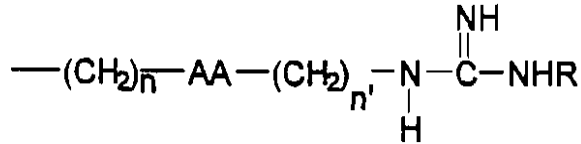
GPIIb/IIIa 受容体をターゲットとするターゲッティングリガンドとして使用することができる付加的なペプチドには例えば、アミノカルボキシ末端から結合していて、活性化血小板上の GPIIb/IIIa 結合領域に結合しうる、アルギニン-チロシン-アスパラギン酸 (Arg-Tyr-Asp; 略称 RGD) のトリペプチド配列を有するペプチドが含まれる。このようなペプチドの例には例えば、一般式: $R^1 - (X^1)_n - Arg - Tyr - Asp - (Y)_o - (X^2)_m - R^2$ のペプチドが含まれる [式中、 X^1 、 X^2 及び Y はそれぞれ独立に、1 個又は複数のアミノ酸基であるが、一定のケースでは、 40 Y は、セリン又はアラニン基以外であるのが好ましく、m、n 及び o はそれぞれ独立に、0 又は 1 であり、ただし、一定のケースでは、m が 1 である場合には、o は 1 であり、 R^1 は、保護されているか、保護されていない末端アミノ基であり、 R^2 は、保護されているか、保護されていない末端カルボキシ基である]。好ましい実施形態では、 X^1 は、ペプチド Ala-Arg-Arg-Ser-Ser-Pro-Ser-Tyr-Tyr であり、 X^2 は、ペプチド Gly-Ala-Gly-Pro-Tyr-Tyr-Ala-Met-Asp-Tyr である。使用することができるペプチドには、Arg-Ser-Pro-Ser-Tyr-Tyr-Arg-Tyr-Asp-Gly-Ala-Gly-Pro-Tyr-Tyr-Ala-Met-Asp-Tyr 及び Ala-Arg-Arg-Ser-Pro-Ser-Tyr-Tyr-Arg-Tyr-Asp-Gly-Ala-G 50

l y - P r o - T y r - T y r - A l a - M e t - A s p - T y r が含まれる。

【0158】

配列 X X - G l y - A s p (ここで、X X は、直鎖の側鎖を有する合成 α - アミノ酸である) を含むフィブリノゲン受容体アンタゴニスト化合物などの、天然アミノ酸配列と合成アミノ酸とを組み合わせた合成化合物、例えば、

【化11】



10

[上式中、 $n + n'$ は、3であり；AAは、単結合であり；Rは、フェニル又はベンジルである]

又は



[上式中、 n は、1から4の整数であり； n' は、2から4の整数であり；AAは、酸素、イオウ又は単結合であり；Rは、H、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいアリールメチル又は置換されていてもよいシクロアルキルであり、一定のケースでは、AAが、単結合であり、Rが、Hである場合には、 $n + n'$ は、3又は4以外である]

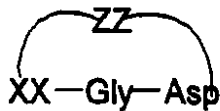
20

を、ターゲッティングリガンドとして使用することもできる。

【0159】

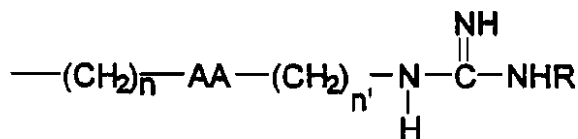
他のこのような化合物は、次式のフィブリノゲン受容体アンタゴニストを含有する

【化12】



[上式中、X X は、次式の直鎖の側鎖を含有する合成 α - アミノ酸であり

【化13】



(上式中、 $n + n'$ は、3であり；AAは、単結合であり；Rは、フェニル又はベンジルである) 又は



(上式中、 n は、1から4の整数であり； n' は、2から4の整数であり；AAは、酸素、イオウ又は単結合であり；Rは、H、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキル、置換されていてもよいシクロアルキルであり、一定のケースでは、AAが、単結合であり、Rが、Hである場合には、 $n + n'$ は、3又は4以外である)、Z Z は、置換されていてもよいアミノ酸1から4個からなる配列である]。

40

【0160】

ターゲッティングリガンドとして使用するための他の有効なペプチドには例えば、次の配列を有する「エレガンチン (Elegantin)」:

G l y - G l u - G l u - C y s - A s p - C y s - G l y - S e r - P r o - G l u -
A s n - P r o - C y s - C y s - A s p - A l a - A l a - T h r - C y s - L y s -
L e u - A r g - P r o - G l y - A l a - G l n - C y s - A l a - A s p - G l y -
L e u - C y s - C y s - A s p - G l n - C y s - A r g - P h e - L y s - R - R '

50

−Arg−Thr−Ile−Cys−Arg−Arg−Ala−Arg−Gly−Asp
 −Asn−Pro−Asp−Asp−Arg−Cys−Thr−Gly−Gln−Ser
 −Ala−Asp−Cys−Pro−Arg−Asn−Gly−Tyr（ここで、R及び
 R'はそれぞれ独立に、アミノ酸である）；次の配列を有する「アルボラブリン（Alb
 olabrin）」：

Glu−Ala−Gly−Glu−Asp−Cys−Asp−Cys−Gly−Ser−
 Pro−Ala−Asn−Pro−Cys−Cys−Asp−Ala−Ala−Thr−
 Cys−Lys−Leu−Leu−Pro−Gly−Ala−Gln−Cys−Gly−
 Glu−Gly−Leu−Cys−Cys−Asp−Gln−Cys−Ser−Phe−
 Met−Lys−Lys−Gly−Thr−Ile−Cys−Arg−Arg−Ala−
 Arg−Gly−Asp−Asp−Leu−Asp−Asp−Tyr−Cys−Asn−
 Gly−Ile−Ser−Ala−Gly−Cys−Pro−Arg−Asn−Pro−
 Leu−His−Ala；次の配列を有する「バトロキソスタチン（Batroxost
 atin）」：

Glu−Ala−Gly−Glu−Glu−Cys−Asp−Cys−Gly−Thr−
 Pro−Glu−Asn−Pro−Cys−Cys−Asp−Ala−Ala−Thr−
 Cys−Lys−Leu−Arg−Pro−Gly−Ala−Gln−Cys−Ala−
 Glu−Gly−Leu−Cys−Cys−Asp−Gln−Cys−Arg−Phe−
 Lys−Gly−Ala−Gly−Lys−Ile−Cys−Arg−Arg−Ala−
 Arg−Gly−Asp−Asn−Pro−Asp−Asp−Cys−Thr−Gly−
 Gln−Ser−Ala−Asp−Cys−Pro−Arg−Phe；次の配列を有する
 「フラボリジン（Flavoridin）」：

Gly−Gly−Glu−Cys−Asp−Cys−Gly−Ser−Pro−Glu−
 Asn−Pro−Cys−Cys−Asp−Ala−Ala−Thr−Cys−Lys−
 Leu−Arg−Pro−Gly−Ala−Gln−Cys−Ala−Asp−Gly−
 Leu−Cys−Cys−Asp−Gln−Cys−Arg−Phe−Lys−R−R'
 −Arg−Thr−Ile−Cys−Arg−Ile−Ala−Arg−Gly−Asp
 −Phe−Pro−Asp−Asp−Arg−Cys−Thr−Gly−Leu−Ser
 −Ala−Asp−Cys−Pro−Arg−R−Asn−Asp−Leu（ここで、R
 及びR'はそれぞれ独立に、アミノ酸である）が含まれる。

【0161】

GP11bIIIIa受容体をターゲットとするために有効な他のリガンドには、Ac（D）
 Phe−Pro−ボロArg及び環式ペプチド様シクロ（D−2−アミノブチレート
 N−メチル−L−アルギニル−グリシル−L−アスパルチル−3−アミノ−メチル安息香
 酸）メタンスルホン酸塩などの合成化合物が含まれる。使用することができるペプチドに
 は、システイン基が横に位置するヘキサペプチド（環式ジスルフィドを形成しうる）及び
 配列Arg−Gly−Asp又はLys−Gly−Aspを有する環式のジスルフィド結
 合した形のペプチド、さらに、カルボキシル末端由来ペプチドREYVVMWKのライブ
 ラリが含まれる。トロンボスポンジン（Thrombospondin）などの一定のマ
 トリックス糖タンパク質も、これに関して使用することができる。プラスミノゲン活性化
 因子阻害剤1（PAI−1）などのセリンプロテアーゼ阻害剤のセルピンファミリーのメ
 ンバーは、別の有効なリガンドである。GP11bIIIIa受容体をターゲットとするた
 めに有効な他の合成化合物には例えば、チクロピジン、クロピドグレル（clopidog
 rel）、チロフィبران（tirofiban）及びアブシキシマブ（abcix
 imab）及びこれらの類似体及び誘導体が含まれる。

【0162】

一般的には、GP11bIIIIa受容体のためのターゲッティングリガンドとして、約3
 から約20個のアミノ酸を有するペプチドを使用するのが好ましいが、約4個から約15
 個のアミノ酸を有するペプチドが、さらに好ましい。いっそう好ましくは、GP11bI
 IIIa受容体のためのターゲッティングリガンドは、アミノ酸約4個から約8個を有する

ペプチドを含有するが、約 4 個から約 6 個又は約 5 個のアミノ酸を有するペプチドが、特に好ましい。

【0163】

望ましい場合には、(1) 例えば、システイン又はペニシラミンを含む、チオールを含有するアミノ酸又はその同族体を、酸化を介してジスルフィド結合させることを含む、側鎖-側鎖共有結合により；(2) 例えば、アミノ酸配列のアミノ末端及び例えば、非臨界グルタミン酸又はアスパラギン酸基などの側鎖カルボキシル酸基を使用することを含む、末端-側鎖共有結合により、ペプチドを環化することができる。もしくは、末端-側鎖共有結合は、アミノ酸のカルボキシレート末端及び側鎖アミン、アミジン、グアニジン又は、例えば、リシン、アルギニン、ホモアルギニン、ホモリシンなどを含む側鎖基などの、求核窒素原子を含有する側鎖中の他の基に関する；(3) 共有アミド結合である末端-末端共有結合など。このようなプロセスは、当技術分野の専門家にはよく知られている。ペプチドは、フランキング (flanking) アミノ酸を付加することにより環化することもできる。例えば、トリペプチド RGD を含むターゲッティングリガンドの場合には、フランキングアミノ酸の付加によって、 $(X)_n - RGD - (Y)_n$ の形にし (ここで、 n は、約 1 から約 100 の整数であり、 X 及び Y は、天然又は合成アミノ酸である)、ただし、該当するアミノ酸の少なくとも 1 個は、システイン又はペニシラミンなどの同族体である。これらのターゲッティングリガンドは、システイン側鎖を介して環化することもでき、環化は、ジスルフィド結合を介して生じる。環化の他の形態は、アミノ-カルボキシレートペプチド結合を伴う末端-末端共有結合に関する。加えて、 X は、リシン及び/又はアルギニンであってよく、 Y は、アスパルテート又はグルタメートであってよく、側鎖成分の縮合により環式アミドが生じる。付加的な置換には、末端アミノ又はカルボキシル基との側鎖基反応が含まれる。

【0164】

加えて、「偽環化 (pseudocyclization)」を使用することもでき、この際、環化は、二次構造をフォールディングして、環式成分の 1 タイプを生じさせる静電的相互作用などの非共有相互作用を介して生じる。金属イオンが、「偽環」形成の誘導を促進すると考えられる。このタイプの偽環化形成は、「ジンクフィンガー」に類似している。当技術分野の専門家には知られているように、ジンクフィンガーは、ループ (フィンガー) の形の領域での、亜鉛イオン (Zn_{2+}) 及びシステイン、ペニシラミン及び/又はホモシステインとの間の静電的相互作用による形成に関する。ホモシステインの場合には、RGD 配列は、フィンガーの先端に位置する。もちろん、本発明の関連では、例えば RGD などの認識及び結合ペプチドリガンドが、適当なミカエリス-メンテン定数 (k_m) 又は結合定数を有する血餅中の適切な受容体に結合するために適した配座及び/又はトポグラフィーを保持しているならば、いずれの安定化環化も適切であると、理解される。ここで使用する場合、「配座」との用語は、ペプチド、ペプトイド (peptoid) 又は偽ペプチドのバックボーンの三次元的構成のことであり、「トポグラフィー」との用語はここで使用する場合、ペプチド、ペプトイド又は偽ペプチドの側鎖の三次元的構成のことである。

【0165】

ターゲッティングリガンドを、本出願の教示を得れば、専門家には分かるであろう様々な方法で、本組成物に導入することができる。脂質化合物、タンパク質、ポリマー及び/又はベシクルを含有する組成物に関する実施形態を含む、一定の好ましい実施形態では、ターゲッティングリガンドは共有結合により、脂質化合物、タンパク質、ポリマー及び/又はベシクルに会合している。脂質化合物、タンパク質、ポリマー及び/又はベシクルを含有する組成物に関する実施形態を含む、一定の別の好ましい実施形態では、ターゲッティングリガンドと組成物の他の成分との間に共有結合性会合は、実質的に存在しない (即ち、ターゲッティングリガンドは、遊離又は未結合である)。例えば、脂質化合物、タンパク質、ポリマー及び/又はベシクルに関する実施形態では、ターゲッティングリガンドは非共有結合により、脂質化合物、タンパク質、ポリマー及び/又はベシクルと会合してい

てよい。ターゲッティングリガンドが遊離又は非結合である他の好ましい実施形態では、ターゲッティングリガンドを、ターゲッティングリガンドが、共有結合によっても、非共有結合によっても、例えば脂質化合物、タンパク質、ポリマー及び／又はベシクルを含む組成物の他の成分と会合していないような組成物と組み合わせることができる。

【0166】

予測されていなかったが意外にも、遊離又は非結合ターゲッティングリガンドも、ガス充填ベシクルを含むベシクル組成物などの本発明の組成物が、例えば血餅を含む所望のターゲットをターゲッティングすることを促進しうるということが、判明した。作動の何らかの理論に結びつけることは意図していないが、このような結合は、例えば、ファンデルワールス相互作用、静電的相互作用又はいくつかの他の会合プロセスを介して、ターゲッティングリガンドと、ベシクル表面に存在する脂質を含む脂質などの組成物の他の成分との会合により生じると、考えられる。未結合のターゲッティングリガンドを含有する脂質組成物に関する好ましい実施形態の場合には、例えば、アミノ基などのターゲッティングリガンド中の官能基は自然に、例えばホスファチジン酸成分などの脂質上の基の1個と直接会合又は結合して、ホスホロアミデート (phosphoramidate) 結合を生じることが可能であると、理論化される。

【0167】

したがって、脂質組成物の場合には、望ましくは、ターゲッティングリガンドは、例えば共有又は非共有結合を介して、組成物中に導入されている少なくとも1種の脂質に結合してよい。脂質以外、例えばクラスレート、エーロゲル及びアルブミンベシクル以外の物質から処方されているベシクルの場合には、ターゲッティングリガンドは、共有結合又は非共有結合により、ベシクル壁に導入されている1種又は複数の物質に結合してよい。例えば、ターゲッティングリガンドは、例えば、親水性ポリマーに共有結合により結合し、これが今度は、疎水性化合物に共有結合して、ベシクル壁に導入されうる生体複合体を生じてよい。好ましくは、コレステロールを含む脂質組成物の場合には、ターゲッティングリガンドは、コレステロールに実質的に非共有結合のみによって結合しているか、かつ／又はターゲッティングリガンドは、組成物の成分、例えばコレステロール以外の、リン脂質などの他の脂質に共有結合している。所望の場合には、ターゲッティングリガンドは共有結合により、かつ／又は非共有結合により、他の安定化物質、例えば、組成物中に存在しうる生体適合性ポリマーに結合してよい。

【0168】

例えば、脂質、ポリマー、タンパク質及び／又はベシクルを含む本発明の組成物の他の成分、さらに他の安定化物質に共有結合してよいターゲッティングリガンドでは、ターゲッティングリガンドは好ましくは、その遠位端に、例えば、そのような共有結合を生じさせるために役立つ官能基を含有してよい。このような遠位官能基の例には例えば、アミノ ($-NH_2$)、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、スルフェート及びスルフィネートが含まれる。環化ターゲッティングリガンドの場合には、リガンドは好ましくは、アミノ、ヒドロキシ、カルボキシ、チオール、ホスフェート、ホスフィネート、スルフェート又はスルフィネートなどの官能基を含み、これらを介して、共有結合が生じるが、これらは通常、所望の受容体、例えば GPIIb/IIIa 受容体に結合するためには不可欠ではない。環化ターゲッティングリガンドの場合には、環化により好ましくは、例えば KQAGDV などの配列 RGD 又は AGD などのターゲッティングリガンドのバックボーン配座及び側鎖トポグラフィーは、GPIIb/IIIa 受容体などの受容体へのリガンドの結合が可能になる。

【0169】

他の適切なターゲッティングリガンドには、次の化合物が含まれる：

Ac-Cys-Arg-Gly-Asp-Met-Phe-Gly-Cys-CONH₂ ; Ac-Cys-Arg-Gly-Asp-Met-Leu-Arg-Cys-CONH₂ ; Ac-Cys-Arg-Gly-Asp-Phe-Leu-Asn-Cys-CONH₂ ; Ac-Cys-Asn-Thr-Leu-Lys-Gly-Asp-Cys-CO

10

20

30

40

50

NH_2 ; $\text{Ac}-\text{Cys}-\text{Asn}-\text{Trp}-\text{Lys}-\text{Arg}-\text{Gly}-\text{Asp}-\text{Cys}-\text{CONH}_2$; 及び $\text{Ac}-\text{Cys}-\text{N-メチル}-\text{Arg}-\text{Gly}-\text{Asp}-\text{Pen}-\text{CONH}_2$ (ここで、Penは、ペニシラミン (β , β -ジメチルシステイン) のことである)。

【0170】

ターゲッティングリガンドとして使用することができる他の化合物には、次式で示されるペプチド又は誘導体が含まれる

【化14】

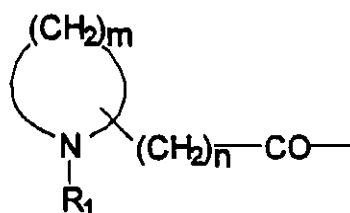
A-B-Arg-Gly-Asp-C-D

[上式中、

10

Aは、プロリン、チオプロリン、ヒドロキシプロリン、デヒドロプロリン、2-オキソ-4-チアゾリジンカルボン酸、N-アルキルグリシン又は次式のアミノ酸誘導体

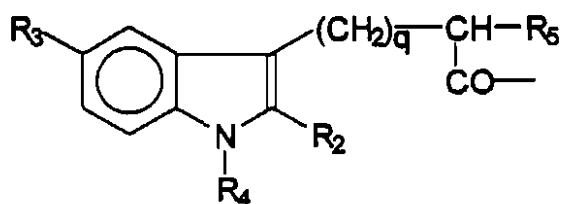
【化15】



20

、トリプトファン又は次式のトリプトファン誘導体

【化16】



、ピログルタミン酸又は2-アゼチジノン-4-カルボン酸であり、

30

Bは、セリン、グリシン、バリン、アラニン、トレオニン又は β -アラニンであり；

Cは、疎水性官能基を有するアミノ酸基であり、かつ

Dは、ヒドロキシ又はアミノであり、

ここで、

R_1 は、水素、 $-(\text{CH}_2)_p\text{CH}_3$ 又は $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_p\text{CH}_3$ であり、

R_2 は、水素又はアルキルであり；

R_3 は、水素又はアルコキシであり；

R_4 は、水素又はアルキルであり；

R_5 は、水素、アミノ又はアシルアミノであり；

mは、2から5の整数であり、

40

nは、0から2の整数であり、

pは、0から5の整数であり、

qは、0から3の整数である】。

【0171】

本発明の組成物で使用するために適している他のターゲッティングリガンドは、次式を有するペプチド、そのペプチド誘導体又は塩である

【化17】

A-B-Arg-Gly-Asp-C-D

50

[上式中、

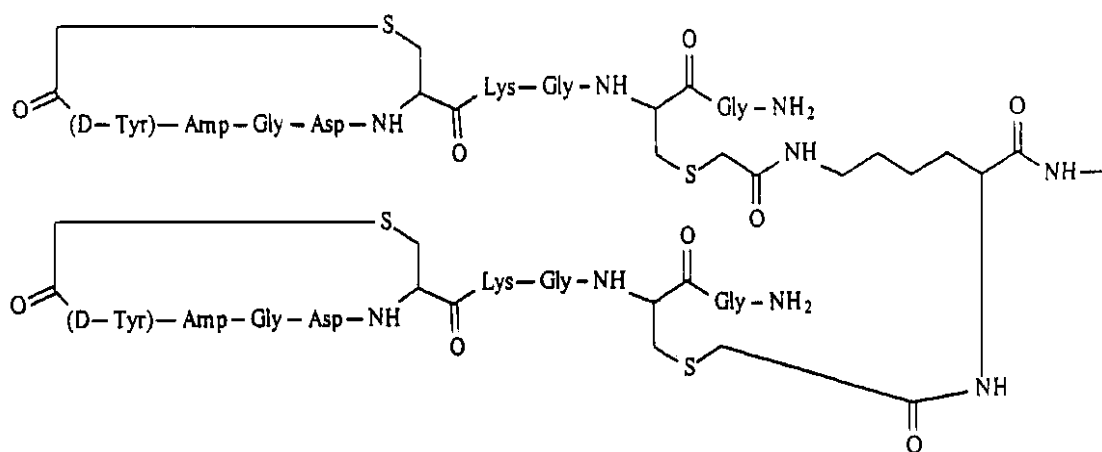
Aは、アロチン酸 (arotic acid) 又はヒドロオロチン酸であり；

Bは、アミノ酸であり；

Cは、疎水性官能基を有するアミノ酸であり；かつ

Dは、ヒドロキシ又はアミノである]。上式の化合物で、「C」の定義中の疎水性官能基を有するアミノ酸の例は、トリプトファン及びフェニルアラニンである。本発明の組成物中で使用するために適しているさらに別のターゲッティングリガンドは、次式を有するペプチド誘導体である

【化18】



10

20

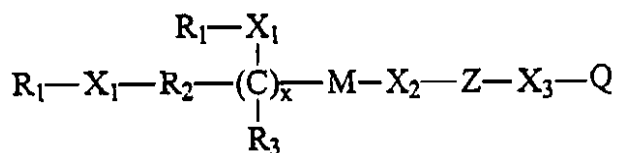
[上式中、上式の構造中の「Amp」は、アミノメチルフェニル酢酸である]。本発明で、特に、GP11b111aをターゲットとするためのターゲッティングリガンドとして使用するために適している様々なペプチドが例えば、Satohらの米国特許第5498601号及び次の公開されているヨーロッパ特許出願：第0368486A2、同第0382451A2及び同第0422938B1号に記載されており、これらの記載を全て、参照して援用する。前記のものに加えて、本発明の組成物中で使用することができる他のターゲッティングリガンドは、本記載を得れば、当技術分野の専門家には明らかであろう。他の適切なターゲッティングリガンドには例えば、糖成分に結合しているペプチドである複合多糖及びレクチンなどの複合ペプチドが含まれる。組成物は、単一ターゲッティングリガンド、さらに、2種又はそれ以上の異なるターゲッティングリガンドを含有してもよい。

30

【0172】

本発明では、次式を有する化合物も提供する

【化19】



40

[上式中、

xは、0又は1であり；

X₁はそれぞれ独立に、-O-、-S-、-SO-、-SO₂-、-NR₄-、-X₄-C(=X₅)-、-C(=X₅)-X₄-又は-C(=X₅)-であり；

X₂及びX₃はそれぞれ独立に、直接結合、-R₅-X₄-C(=X₅)-、-R₅-C(=X₅)-X₄-、-X₄-C(=X₅)-R₅-、-C(=X₅)-X₄-R₅-、-X₄-R₅-C(=X₅)-X₄-、-R₅-X₄-C(=X₅)-R₅-C(=X₅)-X₄-又は-R₅-C(=X₅)-X₄-R₅-X₄-C(=X₅)-であり；

50

X_4 はそれぞれ独立に、 $-O-$ 、 $-NR_4-$ 又は $-S-$ であり；

X_5 はそれぞれ独立に、 O 又は S であり；

M は、直接結合、 $-R_5-X_4-C(=X_5)-$ 、 $-R_5-C(=X_5)-X_4-$ 、 $-R_5-X_4-(YX_5)P(=X_5)-X_4-$ 又は $-X_4-(YX_5)P(=X_5)-X_4-R_5-$ であり；

Y は、水素又は薬剤として許容される対イオンであり；

Z は、直接結合又は親水性ポリマーであり；

Q は、ターゲッティングリガンド又はその前駆体であり；

R_1 はそれぞれ独立に、1 から約 50 個の炭素からなるアルキルであり；

R_2 はそれぞれ独立に、直接結合又は 1 から約 30 個の炭素からなるアルキレンであり； 10

R_3 及び R_4 はそれぞれ独立に、水素又は 1 から約 10 個の炭素からなるアルキルであり；
かつ

R_5 はそれぞれ独立に、直接結合又は 1 から約 30 個の炭素からなるアルキレンであり；
ただし、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 R_2 及び M のうち 3 個又はそれ以上が、直接結合である場合には、 Z は、親水性ポリマーであり、 Z が直接結合である場合には、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 R_2 及び M のうち 3 個又はそれ以上が、直接結合以外である】。

【0173】

上式中、特定の式又は置換基中に、記号が 1 回より多く現れる場合、その意味は、それぞれの場合で、相互に独立している。

【0174】

さらに、上式中で、2 個又はそれ以上の隣接する記号のそれぞれが、「直接結合」と定義されていて、複数の隣接する直接結合が生じている場合、複数の隣接する直接結合は、単一の直接結合に変わる。加えて、上式中の x が 0 である場合、基 R_2 及び M は相互に架橋し、「 C 」（即ち、 X_1-R_1 及び R_3 ）に直接結合している置換基は、定義されている化合物には存在しない。

【0175】

上式中、 X_1 はそれぞれ独立に、 $-O$ 、 $-S-$ 、 $-SO-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-NR_4-$ 、 $-X_4-C(=X_5)-$ 、 $-C(=X_5)-X_4-$ 又は $-C(=X_5)-$ である。好ましい実施形態では、 X_1 はそれぞれ独立に、 $-X_4-C(=X_5)-$ 、 $-C(=X_5)-X_4-$ 又は $-C(=X_5)-$ である。さらに好ましくは、 X_1 はそれぞれ独立に、 $-X_4-C(=X_5)-$ 又は $-C(=X_5)-X_4-$ である。特に好ましくは、 X_1 は、 $-C(=X_5)-X_4-$ 、例えば $-C(=O)-O$ 又は $-C(=O)-NH$ である。 30

【0176】

上式中、 X_2 及び X_3 はそれぞれ独立に、直接結合、 $-R_5-X_4-C(=X_5)-$ 、 $-R_5-C(=X_5)-X_4$ 、 $-X_4-C(=X_5)-R_5-$ 、 $-C(=X_5)-X_4-R_5-$ 、 $-X_4-R_5-C(=X_5)-X_4-$ 、 $-R_5-X_4-C(=X_5)-R_5-C(=X_5)-X_4-$ 又は $-R_5-C(=X_5)-X_4-R_5-X_4-C(=X_5)-$ である。好ましい実施形態では、 X_2 及び X_3 は独立に、直接結合、 $-R_5-X_4-C(=X_5)-$ 、 $-R_5-C(=X_5)-X_4$ 、 $-X_4-C(=X_5)-R_5-$ 、 $-C(=X_5)-X_4-R_5-$ 、 $-X_4-R_5-C(=X_5)-X_4-$ 又は $-R_5-X_4-C(=X_5)-R_5-C(=X_5)-X_4-$ であるが、 $-R_5-C(=X_5)-X_4$ がさらに好ましい。 40
特に好ましくは、 X_2 は、直接結合、 $-CH_2CH_2-C(=O)-NH-$ 又は $-CH_2CH_2NH-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-$ であり、 X_3 は、直接結合、 $-C(=O)-NH-$ 、 $-NH-C(=O)-$ 、 $-NH-C(=O)-CH_2$ 、 $-NHCH_2-C(=O)-NH-$ 、 $-NH-C(=O)-CH_2CH_2-$ 又は $-(CH_2)_n-C(=O)-NH-$ であり、ここで、 n は、約 1 から約 20（この範囲内の全ての組合せ及び二次的組合せを含む）、好ましくは約 1 から約 15、さらに好ましくは約 1 から約 10 の整数である。

【0177】

上式中、 X_4 はそれぞれ独立に、 $-O-$ 、 $-NR_4-$ 又は $-S-$ である。好ましくは、 X 50

$_4$ はそれぞれ独立に、 $-O-$ 又は $-NR_4-$ である。

【0178】

上式中、 X_5 はそれぞれ独立に、 O 又は S である。好ましくは、 X_5 は、 O である。

【0179】

上式中、 M は、直接結合、 $-R_5-X_4-C(=X_5)-$ 、 $-R_5-C(=X_5)-X_4-$ 、 $-R_5-X_4-(YX_5)P(=X_5)-X_4-$ 又は $-X_4-(YX_5)P(=X_5)-X_4-R_5-$ である。一定の好ましい実施形態では、 M は、 $-R_5-X_4-C(=X_5)-$ 又は $-R_5-X_4-(YX_5)P(=X_5)-X_4-$ であるが、さらに好ましくは M は、 $-CH_2O-C(=O)$ 又は $-CH_2O-(HO)P(=O)-O-$ である。一定の他の好ましい実施形態では、 M は、 $-R_5-X_4-C(=X_5)-$ 又は $-R_5-C(=X_5)-X_4-$ である。さらに他の好ましい実施形態では、 M は、 $-R_5-X_4-(YX_5)P(=X_5)-X_4-$ 又は $-X_4-(YX_5)P(=X_5)-X_4-R_5-$ であり、ここで、 X_4 又は X_5 の少なくとも 1 個は、 S である。さらに他の好ましい実施形態では、 M は、直接結合である。

【0180】

上式中、 Z は、直接結合又は親水性ポリマーである。好ましい親水性ポリマーは、ポリアルキレンオキシド、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリホスファゼン、ポリ(ヒドロキシアルキルカルボン酸)及びポリオキサゾリジンからなる群から選択される。さらに好ましくは、 Z は、ポリアルキレンオキシドからなる。特に好ましくは、 Z は、ポリエチレングリコール及びポリプロピレングリコールからなる群から選択されるポリアルキレンオキシドであるが、ポリエチレングリコールが、さらに好ましい。一定の他の好ましい実施形態では、 Z は、ポリエチレングリコール及びポリプロピレングリコールを含むポリアルキレンオキシド以外の親水性ポリマーである。 Z の分子量は、例えば、化合物の特定の最終使用に応じて変動してよい。好ましくは、 Z は、約 100 から約 10000 の範囲及びこの範囲内の全ての組合せ及び二次的組合せの分子量を有するポリマーである。さらに好ましくは、 Z は、約 1000 から約 5000 の分子量を有するポリマーである。約 1 から約 3、及びこの範囲内の全ての組合せ及び二次的組合せの範囲の多分散性を示すポリマーも好ましい。さらに好ましくは、 Z は、約 1 より大きく、2 までの多分散性を有するポリマーであるが、約 1 より大きく、約 1.5 までの多分散性が特に好ましく、約 1 より大きく、約 1.2 までの多分散性が、さらに好ましい。別の好ましい実施形態では、 Z は、直接結合である。

【0181】

上式中、 Q は、ターゲッティングリガンド又はその前駆体である。 Q が、ターゲッティングリガンドである実施形態では、 Q は好ましくは、前記で詳述した様々なターゲッティングリガンドから選択される。したがって、例えば、 Q は好ましくは、心筋細胞、内皮細胞、上皮細胞、腫瘍細胞及び糖タンパク質 GPIIb/IIIa 受容体からなる群から選択される細胞又は受容体をターゲットとする。一定の好ましい実施形態では、 Q は、心筋細胞、内皮細胞、上皮細胞及び糖タンパク質 GPIIb/IIIa 受容体からなる群から選択される細胞又は受容体をターゲットとする。加えて、 Q が、ターゲッティングリガンドである実施形態では、 Q は好ましくは、タンパク質、ペプチド、糖類、ステロイド、ステロイド類似体、生物活性剤及び遺伝物質からなる群から選択される。これら後者の実施形態では、 Q は好ましくは、タンパク質、ペプチド及び糖類からなる群から選択される。 Q がペプチドからなる実施形態では、 Q は好ましくは、配列 $Arg-Gly-Asp(RGD)$ 又は、 $Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val(KQAGDV)$ などの $Ala-Gly-Asp(AGD)$ を含むか、 Q は、例えば、DMP728 などの環式ペプチドであってよい (例えば、Mousa et al., Thrombosis Research, Vol. 76 (2), pp. 109-119 (1994) 参照、この記載を全て、ここで参照して援用する)。 Q が、タンパク質を含む実施形態では、 Q は好ましくは、プロテイン A である。 Q が糖類である実施形態では、 Q は好ましくは、単糖類であり、マンノース及びグルコースが特に好ましい。 Q が、ターゲッティングリガンドの前駆体であ

る実施形態では、Qは好ましくは、1個又は2個のN、O又はS原子を含有する、部分的に不飽和又は芳香族の5員又は7員の単環を含み、マレイミド成分又はピリジル成分がさらに好ましい。

【0182】

上式中、 R_1 はそれぞれ独立に、1から約50個及びこの範囲内の全ての組合せ及び二次的組合せの炭素からなるアルキル又は、2から約50個及びこの範囲内の全ての組合せ及び二次的組合せの炭素からなるアルケニルである。好ましくは、 R_1 はそれぞれ独立に、1個より多く、約40個までの炭素からなるアルキルである。さらに好ましくは、 R_1 はそれぞれ独立に、約5から約30個の炭素からなるアルキルである。特に好ましくは、 R_1 はそれぞれ独立に、約10から約30個の炭素からなるアルキルであり、約15から約28個の炭素からなるアルキルが、さらに好ましい。一定の好ましい実施形態では、 R_1 は、約15から約17個の炭素からなる直鎖アルキルである。さらに、 R_1 は好ましくは、縮合したシクロアルキル及び／又はシクロアルケニルである。これら後者の実施形態では、 R_1 は好ましくは、約10から約40個の炭素からなる一定の縮合したシクロアルキル及び／又はアルケニルであり、約20から30個の炭素からなる縮合したシクロアルキル及び／又はアルケニルがさらに好ましい。特に好ましい縮合したシクロアルキル及び／又はアルケニル基は、コレステロールである。

10

【0183】

上式中、 R_2 はそれぞれ独立に、直接結合又は1から約30個の炭素及びこの範囲内の全ての組合せ及び二次的組合せからなるアルキレンである。好ましくは、 R_2 はそれぞれ独立に、1から約20個の炭素からなるアルキレンである。さらに好ましくは、 R_2 はそれぞれ独立に、1から約10個の炭素からなるアルキレンである。特に好ましくは、 R_2 はそれぞれ独立に、1から約5個の炭素からなるアルキレンであり、メチレンが特に好ましい。別の好ましい実施形態では、 R_2 は、直接結合である。

20

【0184】

上式中、 R_3 及び R_4 はそれぞれ独立に、水素又は1から約10個の炭素及びこの範囲内の全ての組合せ及び二次的組合せからなるアルキルである。好ましくは、 R_3 及び R_4 はそれぞれ、水素又は1から約5個の炭素からなるアルキルであり、さらに好ましくは、 R_3 及び R_4 はそれぞれ、水素である。

【0185】

上式中、 R_5 はそれぞれ独立に、直接結合又は又は1から約30個の炭素及びこの範囲内の全ての組合せ及び二次的組合せからなるアルキレンである。好ましくは、 R_5 はそれぞれ独立に、直接結合又は1から約20個の炭素からなるアルキレンである。さらに好ましくは、 R_5 はそれぞれ独立に、直接結合又は1から約10個の炭素からなるアルキレンである。特に好ましくは、 R_5 はそれぞれ独立に、直接結合又は1から約5個の炭素からなるアルキレンである。さらに好ましくは、 R_5 はそれぞれ、直接結合又は $-(CH_2)_y-$ であり、ここで、 x は、1又は2である。

30

【0186】

上式の化合物中、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 R_2 及びMのうちの3個又はそれ以上が直接結合である場合には、Zは、親水性ポリマーである。好ましくは、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 R_2 及びMのうちの2個又はそれ以上が直接結合である場合には、Zは、親水性ポリマーである。さらに好ましくは、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 R_2 及びMのうちの1個又はそれ以上が直接結合である場合には、Zは、親水性ポリマーである。

40

【0187】

上式の化合物中、Zが直接結合である場合には、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 R_2 及びMのうちの3個又はそれ以上は、直接結合以外である。好ましくは、Zが直接結合である場合には、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 R_2 及びMのうちの4個又はそれ以上は、直接結合以外である。さらに好ましくは、Zが直接結合である場合には、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 R_2 及びMは全て、直接結合以外である。

【0188】

50

ここでは、次式の化合物も提供する

【化 20】

L-P-T

〔上式中、

L は、疎水性化合物であり；

P は、架橋基であり；かつ

T は、ターゲッティングリガンドである〕。一般に、L は、前記の脂質を含む、生体適合性脂質などの様々な適切な疎水性化合物のいずれかから選択することができる。好ましい実施形態では、L は、レシチン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、カルジオリピン、コレステロールアミン、リゾホスファチド、エリスロースフィンゴシン、スフィンゴミエリン、セラミド、セレブロシド、飽和リン脂質、不飽和リン脂質、クリーリン脂質、脂肪酸及びステロイドからなる群から選択される脂質である。さらに好ましくは、L は、レシチン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、脂肪酸及びステロイドからなる群から選択される脂質である。特に好ましくは、L は、1, 2-ジアシル-s n-グリセロール-3-ホスホコリン、1, 2-ジアシル-s n-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン、1, 2-ジアシル-s n-グリセロール-3-[ホスホ-r a c-(1-グリセロール)]、1, 2-ジアシル-s n-グリセロール-3-ホスフェート、1, 2-ジアシル-s n-グリセロール-3-[ホスホ-セリン]、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルグリセロール、1, 2-ジアシル-s n-グリセロール、例えば、1, 2-ジオクタノイルエチレングリコール、1, 2-ジカプロイルエチレングリコール、1, 2-ジラウロイルエチレングリコール、1, 2-ジミリストイルエチレングリコール、1, 2-ジパルミトイルエチレングリコール及び1, 2-ジオレオイルエチレングリコールなどの1, 2-ジアシルエチレングリコール、N-(n-カプロイルアミン)-1, 2-ジアシル-s n-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン、N-ドデカニルアミン-1, 2-ジアシル-s n-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン、N-スクシニル-1, 2-ジアシル-s n-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン、N-グルタリル-1, 2-ジアシル-s n-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン、N-ドデカニル-1, 2-ジアシル-s n-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン、ステアリン酸などの脂肪酸及びコレステロールなどのステロイドからなる群から選択される脂質である。

【0189】

他の好ましい実施形態では、L は、アルブミンを含むタンパク質である。さらに他の好ましい実施形態では、L は、アクリル酸、メタクリル酸、エチレンイミン、クロトン酸、アクリルアミド、アクリル酸エチル、メタクリル酸メチル、メタクリル酸2-ヒドロキシエチル、乳酸、グリコール酸、ε-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、エピクロロヒドリン、アクリル酸ヒドロキシアルキル、シロキサン、ジメチルシロキサン、酸化エチレン、酸化プロピレン、エチレングリコール、酸化プロピレン、エチレングリコール、メタクリル酸ヒドロキシアルキル、N-置換アクリルアミド、N-置換メタクリルアミド、N-ビニル-2-ピロリドン、2, 4-ペンタジエン-1-オール、酢酸ビニル、アクリロニトリル、スチレン、p-アミノースチレン、p-アミノベンジルスチレン、スチレンスルホン酸ナトリウム、2-スルホキシエチルメタクリル酸ナトリウム、ビニルピリジン、メタクリル酸アミノエチル及び塩化2-メタクリロイルオキシトリメチルアンモニウムからなる群から選択されるモノマーから調製された合成ポリマー又はコポリマーを含むポリマーである。さらに、L が、ポリアクリル酸、ポリエチレンイミン、ポリメタクリル酸、ポリメチルメタクリレート、ポリシロキサン、ポリジメチルシロキサン、ポリ乳酸、ポリ(ε-カプロラクトン)、エポキシ樹脂、ポリ(酸化エチレン)、ポリ(酸化プロピレン)、ポリ(エチレングリコール)、ポリアミド、ポリビニリデン-ポリアクリロニトリル、ポリビニリデン-ポリアクリロニトリル-ポリメチルメタクリレート及びポリスチレン-ポリアクリロニトリルからなる群から選択される合

成ポリマー又はコポリマーを含むポリマーである化合物も好ましい。これらのポリマーのうち、ポリビニリデンーポリアクリロニトリルコポリマーが、好ましい。

【0190】

上式の化合物中、Pは、様々な長さの架橋基である。好ましい実施形態では、Pは、親水性ポリマーである。さらに好ましい実施形態では、Pは、ポリアルキレンオキシド、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリホスファゼン、ポリ（ヒドロキシアルキルカルボン酸）及びポリオキサゾリジンからなる群から選択される親水性ポリマーである。さらに好ましくは、Pは、ポリアルキレンオキシドポリマーであり、ポリエチレングリコール及びポリプロピレングリコールが、さらに好ましく、ポリエチレングリコールが、特に好ましい。

10

【0191】

上式中、Tは、ターゲッティングリガンドである。好ましい実施形態では、Tは、前記で詳述した様々なターゲッティングリガンドから選択することができる。したがって例えば、Tは好ましくは、心筋細胞、内皮細胞、上皮細胞、腫瘍細胞及び糖タンパク質GP11b111a受容体からなる群から選択される細胞又は受容体をターゲットとする。一定の好ましい実施形態では、Tは好ましくは、心筋細胞、内皮細胞、上皮細胞及び糖タンパク質GP11b111a受容体からなる群から選択される細胞又は受容体をターゲットとする。加えて、Tは好ましくは、タンパク質、ペプチド、糖類、ステロイド、ステロイド類似体、生物活性剤及び遺伝物質からなる群から選択される。これら後者の実施形態では、Tは好ましくは、タンパク質、ペプチド及び糖類からなる群から選択される。Tがペプチドからなる実施形態では、Tは好ましくは、例えば、Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val (KQAGDV) などの配列Arg-Gly-Asp (RGD) 又はAla-Gly-Asp (AGD) を含む配列Gly-Asp (GD) を含むか、又はTは、DMP728などの環式ペプチドである（例えば、Mousa et al., Thrombosis Research, Vol. 76 (2), pp. 109-119 (1994) 参照、この記載を全て、ここで参照して援用する）。さらに、アテローム硬化、特にアテローム斑をターゲットとするターゲッティングリガンドも好ましい。

20

【0192】

糖類基を含むターゲッティングリガンドの場合には、適切な糖類成分には例えば、単糖類、二糖類及び多糖類が含まれる。代表的な単糖類は、6個の炭素を含み、これらの単糖類には、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、フルクトース、プシコース、ヴェルボース (verbosé) 及びタガトースが含まれる。5炭素糖類には、リボース、アラビノース、キシロース、リキソース、リブロース及びキシルロースが含まれる。4炭素糖類には、エリトロース、トレオース及びエリトルロースが含まれる。二糖類には、スクロース、ラクトース、マルトース、イソマルトース及びセロビオースが含まれる。糖類支持ターゲッティング脂質は、後記で詳述するマルチステップの有機合成アプローチにより合成することができる。例えば、脂質支持ターゲッティンググルコース成分を例えば、 α -グルコピラノシルプロミドテトラベンジルと、 ω -トリフルオロアセチルアミノポリエチレングリコールと反応させて、 ω -グルコピラノシルテトラベンジル- ω' -トリフルオロアセチルアミノポリエチレングリコールを得ることにより調製することができる。次いでこれを、炭酸ナトリウム又は炭酸カリウム溶液中で加水分解し、次いで、水素化すると、 ω -グルコピラノシル- ω' -アミノポリエチレングリコールが得られる。アミノグリコピラノシル末端ポリエチレングリコールを次いで、N-DPGS-スクシンイミドと反応させると、脂質支持糖類DPGS-NH-PEG-グルコースが生じる。梗塞した心筋をターゲットとするターゲッティングリガンドも好ましい。一定の実施形態では、ターゲッティングリガンドは、ガン細胞をターゲットとする。

30

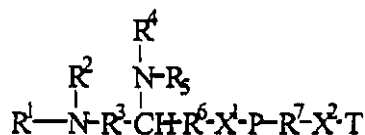
40

【0193】

本発明の特に好ましい実施形態では、次式を有する化合物を提供する

【化21】

50



(IV)

[上式中、

X^1 及び X^2 は独立に、直接結合あるいは $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^8)-$ 、 $-\text{C}(=\text{X}^3)-$ 、 $-\text{C}(=\text{X}^3)-\text{N}(\text{R}^8)-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^8)-\text{C}(=\text{X}^3)-$ 及び $-\text{C}(=\text{X}^3)-\text{N}(\text{R}^8)-\text{C}(=\text{X}^3)-$ からなる群から選択される架橋原子又は基であり；

X^3 は、 $-\text{O}-$ 又は $-\text{S}-$ であり；

R^1 は、約 7 個から約 23 個の炭素からなるアシルであり；

R^2 は、水素又は低級アルキルであり；

R^3 は、直接結合又は 1 から約 10 個の炭素からなるアルキレンであり；

R^4 は、約 7 個から約 23 個の炭素からなるアシルであり；

R^5 は、水素又は低級アルキルであり；

R^6 及び R^7 は独立に、直接結合又は 1 から約 10 個の炭素からなるアルキレンであり；

R^8 は、水素又は低級アルキルであり；

P は、親水性ポリマーの基であり；かつ

T は、心筋細胞、内皮細胞、上皮細胞、腫瘍細胞及び糖タンパク質 GPIIb/IIIa 受容体からなる群から選択される細胞又は受容体をターゲットとするターゲッティングリガンドである]。

【0194】

上式 (IV) 中、特定の式又は置換基中に、記号が 1 回より多く現れる場合、その意味は、それぞれの場合で、相互に独立している。

【0195】

さらに、上式 (IV) 中で、2 個又はそれ以上の隣接する記号のそれぞれが、「直接結合」と定義されていて、複数の隣接する直接結合が生じている場合、複数の隣接する直接結合は、単一の直接結合に変わる。

【0196】

上式 (IV) 中で、 X^1 及び X^2 は独立に、直接結合あるいは $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^8)-$ 、 $-\text{C}(=\text{X}^3)-$ 、 $-\text{C}(=\text{X}^3)-\text{N}(\text{R}^8)-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^8)-\text{C}(=\text{X}^3)-$ 及び $-\text{C}(=\text{X}^3)-\text{N}(\text{R}^8)-\text{C}(=\text{X}^3)-$ からなる群から選択される架橋原子又は基である。好ましい実施形態では、 X^1 及び X^2 は独立に、 $-\text{C}(=\text{X}^3)-$ 、 $-\text{C}(=\text{X}^3)-\text{N}(\text{R}^8)-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^8)-\text{C}(=\text{X}^3)-$ 及び $-\text{C}(=\text{X}^3)-\text{N}(\text{R}^8)-\text{C}(=\text{X}^3)-$ から選択される架橋基である。さらに好ましい実施形態では、 X^1 は、 $-\text{C}(=\text{X}^3)-\text{N}(\text{R}^8)-\text{C}(=\text{X}^3)-$ であり、 X^2 は、 $-\text{C}(=\text{X}^3)-$ である。

【0197】

X^1 及び X^2 の定義中、 X^3 は、 $-\text{O}-$ 又は $-\text{S}-$ である。好ましい実施形態では、 X^3 は、 $-\text{O}-$ である。

【0198】

上式 (IV) 中で、 R^1 は、約 7 個から約 23 個の炭素からなるアシルである。好ましい実施形態では、 R^1 は、約 10 個から約 22 個の炭素からなるアシルであり、約 15 個から約 20 個の炭素が、さらに好ましい。特に好ましい実施形態では、 R^1 は、約 17 個から約 19 個の炭素からなるアシルであり、約 18 個の炭素が、さらに好ましい。

【0199】

上式 (IV) 中で、 R^2 は、水素又は低級アルキルである。好ましい実施形態では、 R^2

は、水素である。

【0200】

上式（I V）中で、 R^3 は、直接結合又は1個から約10個の炭素からなるアルキレンである。好ましくは、 R^3 は、1個から約3個の炭素からなるアルキレンであり、メチレンが、さらに好ましい。

【0201】

上式（I V）中で、 R^4 は、約7個から約23個の炭素からなるアシルである。好ましい実施形態では、 R^4 は、約10個から約22個の炭素からなるアシルであり、約15個から約20個の炭素が、さらに好ましい。特に好ましい実施形態では、 R^4 は、約17個から約19個の炭素からなるアシルであり、約18個の炭素が、特に好ましい。

10

【0202】

上式（I V）中で、 R^5 は、水素又は低級アルキルである。好ましい実施形態では、 R^5 は、水素である。

【0203】

上式（I V）中で、 R^6 及び R^7 は独立に、直接結合又は1から約10個の炭素からなるアルキレンである。好ましくは、 R^6 及び R^7 は独立に、直接結合又は低級アルキレンである。さらに好ましくは、 R^6 は、直接結合であり、 R^7 は、低級アルキレンである。特に好ましくは、 R^7 は、エチレンである。

【0204】

上式（I V）中で、 R^8 は、水素又は低級アルキルである。好ましい実施形態では、 R^8 は、水素である。

20

【0205】

上式（I V）中で、Pは、親水性ポリマーである。親水性ポリマーは、架橋基に関する前記の検討に関連して同定された親水性ポリマーのいずれかであってよい。好ましい実施形態では、Pは、ポリアルキレンオキシド、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリホスファゼン、ポリ（ヒドロキシアルキルカルボン酸）及びポリオキサゾリジンからなる群から選択される親水性ポリマーである。さらに好ましくは、Pは、ポリアルキレンオキシドポリマーであり、ポリエチレングリコール（PEG）及びポリプロピレングリコールがさらに好ましく、ポリエチレングリコールが、特に好ましい。好ましくは、PEGポリマーは、約1000から約7500及びこの範囲内の全ての組合せ及び二次的組合せの分子量及び特定分子量を有する。さらに好ましくは、PEGポリマーは、約2000から約5000の分子量を有し、約3000から約4000の分子量がさらに好ましい。特に好ましい実施形態では、PEGポリマーは、約3400の分子量を有する。

30

【0206】

上式（I V）中で、Tは、心筋細胞、内皮細胞、上皮細胞、腫瘍細胞及び糖タンパク質 GPIIb/IIIa 受容体からなる群から選択される細胞又は受容体をターゲットとするターゲットングリガンドである。ターゲットングリガンドは、ターゲットングリガンドに関する前記の検討に関連して前記で同定されたターゲットングリガンドのいずれかであってよい。好ましい形態では、ターゲットングリガンドは、次式のペプチドを含む：

40

【化22】



【0207】

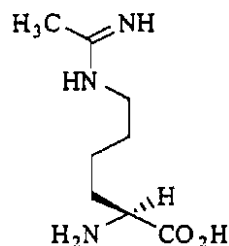
上式中、m及びnは独立に、1から約100の整数及びこの範囲内の全ての組合せ及び二次的組合せである。好ましい実施形態では、m及びnは独立に、1から約50の整数であり、1から約20の整数が、さらに好ましい。特に好ましくは、m及びnは独立に、1から約10の整数であり、1から約5の整数が、さらに好ましい。特に好ましい実施形態では、nは、1、2又は3であるのが、特に好ましく、mは、1である。

50

【0208】

上式中、Yaaは、アルギニン、ホモアルギニン及びリシン-N-アセトイミデートから選択され、後者は、次式を有する

【化23】



10

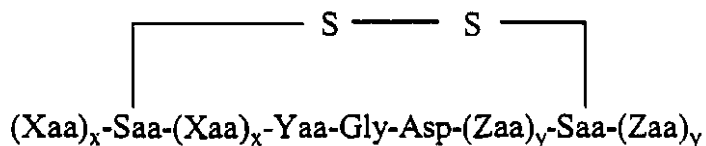
【0209】

前記のターゲッティングリガンド式中、Xaa及びZaaは独立に、天然アミノ酸及び合成アミノ酸からなる群から選択される。特定の式又は置換基中に、記号が1回より多く現れる場合、その意味は、それぞれの場合で、相互に独立していることが、意図されている。したがって、例えば、nが3である場合、Xaaはそれぞれ、同一であるか、それぞれ、異なるアミノ酸である。一定の好ましい実施形態では、Xaaはそれぞれ、グリシンであり、Zaaは、セリンである。

【0210】

他の好ましい実施形態では、Xaa及びZaaは独立に、イオウ含有アミノ酸から選択される。適切なイオウ含有アミノ酸には例えば、D-システイン、L-システイン、D-ペニシラミン及びL-ペニシラミンが含まれる。このような実施形態では、イオウ含有アミノ酸は、次式で示されるようなジスルフィドブリッジを介して相互に結合してよい

【化24】



30

[上式中、

Saaはそれぞれ独立に、イオウ含有アミノ酸である]。上式中、x及びyはそれぞれ独立に、0から約100の整数及びこの範囲内の全ての組合せ及び二次的組合せであってよく、0から約20の整数がさらに好ましい。特に好ましくは、x及びyは独立に、0から約10の整数であり、0から約5の整数が、さらに好ましい。

【0211】

式(IV)の化合物は、例えば、下記のように合成の容易さ、診断的有効性、高い生体適合性及び／又は改善されたターゲッティング有効性を含む、望ましい利点を提供する。

【0212】

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導入することができる。一般には、例えば脂質、タンパク質又はポリマー、さらに補足的安定化物質を含む生体複合体の疎水性部分が例えば含まれる、組成物中に含まれる1種又は複数の物質と共有結合により、又は非共有結合により会合させることにより、ターゲッティングリガンドを本組成物に導入することができる。好ましい形態では、ターゲッティングリガンドは、本発明の組成物中に含まれる1種又は複数の前記の物質と共有結合により会合している。前記のように、本発明の好ましい組成物は、脂質、タンパク質又はポリマー化合物を含む。これらの組成物中で、ターゲッティングリガンドは好ましくは、脂質、タンパク質又はポリマー化合物と共有結合により会合する。

40

【0213】

ターゲッティングリガンドが脂質、タンパク質、ポリマー及び／又はベシクルがそれによ

50

って会合する代表的な共有結合には例えば、アミド ($-CONH-$) ; チオアミド ($-CSNH-$) ; エーテル ($RO R'$ 、ここで、 R 及び R' は、同じか、又は異なり、水素以外である) ; エステル ($-COO-$) ; チオエステル ($-COS-$) ; $-O-$; $-S-$; $-S_n-$ 、ここで、 n は、1 よりも大きく、好ましくは約 2 から約 8、さらに好ましくは約 2 ; カルバメート ; $-NH-$; $-NR-$ 、ここで R は、アルキル、例えば 1 から約 4 個の炭素からなるアルキル ; ウレタン ; 及び置換されたイミデート ; 及びこれらの 2 つ又はそれ以上の組合せが含まれる。ターゲッティングリガンドと例えば脂質との間の共有結合は、リガンドの配座的及びトポグラフィ的柔軟性を高めるスペーサーとして作用する分子を使用することにより達成することができる。このようなスペーサーの例には例えば、コハク酸、1, 6-ヘキサン二酸、1, 8-オクタ二酸など、さらに、例えば 6-アミノヘキサン酸、4-アミノブタン酸などの変性されたアミノ酸が含まれる。加えて、ペプチド成分を含むターゲッティングリガンドの場合には、側鎖-側鎖架橋が、側鎖-末端架橋及び/又は末端-末端架橋と共に補足される。さらに、ジメチルスベリイミデートなどの小さいスペーサー分子を、同様の目的を達成するために使用することができる。グルテルアルデヒド (gluteraldehyde) などのシッフ塩基型反応で使用されるものを含む薬剤を使用することもできる。還元アミノ化手順を使用することを介して、結合が可逆的となりうるシッフ塩基結合を、より永続的な共有結合にすることができる。これは例えば、水素化アルミニウムリチウム還元剤、あるいはジイソブチル水素化アルミニウムリチウム ($DIBAL$)、ホウ水素化ナトリウム ($NaBH_4$) 又はシアノホウ水素化ナトリウム ($NaBH_3CN$) を含む、より穏やかなその類似体などの化学的還元剤を必要とする。

10

20

【0214】

脂質、タンパク質及び/又はポリマーを含む、本組成物中の物質にターゲッティングリガンドを共有結合させることは、本記載をもとに、当技術分野の専門家には容易に分かるであろう合成有機技術を使用して達成することができる。例えば、よく知られているカップリング剤又は活性化剤を使用することで、ターゲッティングリガンドを、脂質を含む物質に結合させることができる。専門家には知られているように、活性化剤は通常、求核性である。この求核性を使用して、共有結合の形成を惹起することができる。使用することができる代表的な活性化剤には例えば、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 (DCI)、ジイソプロピルカルボジイミド (DIC)、塩化メチルスルホニル、Castro 試薬及び塩化ジフェニルホスホニルが含まれる。

30

【0215】

共有結合は、架橋及び/又は重合を伴ってよい。架橋とは好ましくは、化学的な共有結合により鎖の一定の炭素原子を結合する元素、基又は化合物からなるブリッジによる、ポリマー分子の 2 個の鎖の結合のことである。例えば、架橋は、シスチン基のジスルフィド結合により結合されるポリペプチドで生じうる。例えば、(1) 化学物質 (架橋剤) を加え、混合物を熱にさらすことにより、又は (2) ポリマーに高エネルギー放射線を与えることにより、架橋を達成することができる。異なる長さ及び/又は官能性の様々な架橋剤又は「つなぎ」が例えば、R. L. Lunbl and, Techniques in Protein Modification, CRC Press, Inc., Ann Arbor, MI, pp. 249-68 (1995) に記載されており、この記載をここでは全て、参照して援用する。代表的な架橋剤には例えば、3, 3'-ジチオビス (スクシニミジルプロピオネート)、ジメチルスベリイミデート及び、炭化水素鎖に基づくそれらのバリエーション及びビス-N-マレイミド-1, 8-オクタンが含まれる。

40

【0216】

好ましい実施形態では、ターゲッティングリガンドは、架橋基を介して、脂質、タンパク質又はポリマー又は他の安定化物質に架橋又は結合することができる。様々な架橋基を利用することができ、本記載を得れば、当技術分野の専門家には分かるであろう。好ましくは、架橋基は、親水性ポリマーを含む。例えば適切な親水性架橋ポリマーには、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) 及びポリプロピレングリコール (PPG) などのポリ

50

アルキレンオキシド、ポリビニルピロリドン、ポリビニルメチルエーテル、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及びポリヒドロキシプロピルメタクリルアミドなどのポリアクリルアミド、アクリル酸ポリヒドロキシエチル、メタクリル酸ポリヒドロキシプロピル、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及びポリアスパルタミドが含まれる。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及びポリビニルピロリドン及びこれらのコポリマーからなる群から選択され、PEG及びPPGポリマーがさらに好ましく、PEGポリマーが特に好ましい。したがって、例えばDPPE-PEGを含む脂質支持ポリマーを含む脂質組成物に関する実施形態では、ターゲッティングリガンドは直接、脂質に結合しているポリマーに結合していて、例えば、DPPE-PEG-TLの複合体をもたらす（ここで、TLは、ターゲッティングリガンドである）。したがって、例えばDPPE-PEG5000などの例DPPE-PEGを使用すると、前記の複合体は、DPPE-PEG5000-TLとして表すことができる。架橋基として使用される親水性ポリマーは好ましくは、二官能性ポリマー、例えばジアミノ-PEGなどの二官能性PEGである。この場合、PEG基の一方の末端は例えば、脂質化合物に結合していて、遊離の末端では、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。一方の末端では、末端カルボキシレート基で、かつ他方の末端では末端アミノ基で置換されている親水性ポリマー、例えばPEGを使用することもできる。これらの後者の二官能性親水性ポリマーが好ましい。それというのも、これらは、アミノ酸に対して様々な類似を有するためである。

10

20

【0217】

2個の独特な末端官能基を有する架橋基を使用して、ターゲッティングリガンドを脂質に結合するために、標準的なペプチド方法論を使用することができる。二官能性親水性ポリマー、特に二官能性PEGは、標準的な有機合成方法論を使用して、合成することができる。加えて、これらの材料のうちの多くは、市販されている。例えば、 α -アミノ、 ω -カルボキシPEGは、Shearwater Polymers (Huntsville, AL) から市販されている。架橋基としてPEG材料を使用することの利点は、エチレングリコールのモノマーサブユニットの数が、例えば約5の少数でも、例えば約500またそれ以上の多数であってもよいように、PEGのサイズを変動させることができることである。したがって、「つなぎ」又は架橋の長さは、望ましいように変動させることができる。例えば、使用される特定のターゲッティングリガンドに応じて、このことは重要である。例えば、大きなタンパク質分子を含むターゲッティングリガンドは、膜結合タンパク質を模倣するように、短いつなぎを必要とする。短いつなぎにより、ベシクルが、細胞に対する緊密さを維持するようにすることもできる。生物活性剤を含むベシクルに関しては、これを使用するのが有利であり、その際、細胞に輸送される生物活性剤の濃度を、有利に高めることができる。

30

【0218】

短いつなぎをもたらす他の適切な架橋基は、グリセルアルデヒドである。シッフ塩基反応を介して、グリセルアルデヒドを、例えばDPPEに結合させることができる。後続のアマドリ転移により、かなり短い架橋基が得られる。次いで、シッフ塩基の β カルボニルを、ターゲッティングタンパク質又はペプチドのリシン又はアルギニンと反応させて、ターゲット脂質を生じさせる。

40

【0219】

特に、脂質、タンパク質及び／又はポリマーを含む本発明の組成物中で使用される化合物は、適切なカップリング条件を使用して、親水性ポリマー架橋基のカルボン酸又はカルボン酸誘導体と反応することができ、本記載を得れば、当技術分野の専門家には理解されるであろう、例えばヒドロキシ、チオ及びアミン基などの様々な官能基を含有してよい。カルボン酸基（又はその誘導体）と官能基、例えば、ヒドロキシ、チオ又はアミン基とが反応して、エステル、チオエステル又はアミド基が生じた後に、当技術分野の専門家にはよ

50

く知られている手順を使用して、保護されている官能基を脱保護することができる。ここで使用する場合、保護基との用語は、官能基の反応をブロックするために使用することができ、望ましい場合には除去して、未保護の官能基を生じさせることができる成分のことである。様々な保護基を使用することができ、これらは、例えば、保護されるべき基が、アミン、ヒドロキシル又はカルボキシル成分であるかに応じて、変わりうる。官能基がヒドロキシル基である場合には、適切な保護基には例えば、一定のエーテル、エステル及びカルボネートが含まれる。このような保護基は例えば、Greene, TW and Wuts, PGM, "Protective Groups in Organic Synthesis" John Wiley, New York, 2nd Edition (1991)に記載されており、この記載をここでは全て、参照して援用する。アミン基のための代表的な保護基には例えば、*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及びトリフルオロアセテート (TFA)が含まれる。

10

【0220】

シッフ塩基を生じさせることにより、例えば、グルタルアルデヒドなどのカップリング剤を使用することにより、例えば、ベシクル中に含有されているポリマーのバックボーン上に存在しうるアミン基を、親水性架橋ポリマー上のアミン基と結合させることができる。この結合の例は、Allcock et al., *Macromolecules* Vol. 19 (6), pp. 1502-1508 (1986)に記載されており、この記載をここで全て、参照して援用する。例えば、ベシクルがポリリシンから処方されている場合には、遊離アミノ基を、ベシクルの表面上にさらすことができ、これらの遊離アミノ基は、前記のように活性化することができる。次いで、活性化されたアミン基を使用して、例えば、 ω -ヒドロキシ基がカルボネート基で保護されている α -アミノ- ω -ヒドロキシーPEGなどの官能化親水性ポリマーに結合させることができる。反応が終了した後に、カルボネート基を除去して、末端ヒドロキシ基を、適切なターゲッティングリガンドに反応させるために活性化させることができる。一定の実施形態では、例えばポリジクロロホスファジンなどの塩素含有ホスファゼン基中の塩素原子を置換することにより、ベシクル表面を活性化することができる。続いて、ターゲッティングリガンドを加え、水又は水性メタノールで残留しているクロリド基をクエンチすることにより、結合している生成物が得られる。

20

30

【0221】

加えて、ポリ(ジフェノキシホスファゼン)を合成し(Allcock et al., *Macromolecules* Vol. (1986) 19 (6), pp. 1502-1508)、例えばDPPE上に固定化し、引き続き、硝酸及び無水酢酸からなる混合物を加えることにより、フェノキシ成分をニトロ化することができる。次いで、例えば、(1) 0.1 Mのリン酸緩衝液(pH 11)中の臭化シアンで処理し、引き続き、遊離アミノ成分を含有するターゲッティングリガンドを加えて、結合している尿素類似体を生じさせることにより、かつ/又は(2) 亜硝酸ナトリウムを使用して、ジアゾニウム塩を生じさせ、引き続き、ターゲッティングリガンドを加えて、結合しているリガンドを生じさせるか、かつ/又は(3) ジアルデヒド、例えば、前記のようなグルタルアルデヒドを使用して、シッフ塩基を生じさせることにより、後続のニトロ基を活性化することができる。DPPEを親水性ポリマー及びターゲッティングリガンドと架橋させた後に、ここに記載の手順を使用して、ベシクルを処方することができる。

40

【0222】

シッフ塩基を生じさせることにより、前記のように、ポリマー上のアルデヒドをアミンとカップリングさせることができる。このカップリング手順の例は、Allcock and Austin *Macromolecules* vol 14, p1616 (1981)に記載されており、この記載をここで全て、参照して援用する。

【0223】

前記の手順では、脂質、例えば、ホスファチジルグリセロール又はホスファチジルエタノ

50

ールアミンのポリマー又は末端を好ましくは、活性化させて、その末端が適切な方法でブロックされている親水性ポリマー架橋基にカップリングさせる。この方法の例としては、*t*-Boc保護されている末端アミノ基及び遊離カルボキシレート末端を有する α -アミノ、 ω -カルボキシPEG-4000を、*N*-メチルピロリドン中のヒドロキシベンゾトリアゾールの存在下に、1, 1'-カルボニルジイミダゾールを用いて活性化させることができる。ホスファチジルエタノールアミンを加えた後に、トリフルオロ酢酸(TFA)を用いて、遊離アミン基を残すことにより、*t*-Boc基を除去する。次いで、リガンドを同様に活性化して、アミンを、例えばペプチド、タンパク質、アルカロイド又は他の成分を含んでよいターゲットングリガンドと反応させて、脂質-架橋基-ターゲットングリガンド複合体を得る。前記の方法に加えて、他の方法を使用して、脂質-架橋基-ターゲットングリガンド複合体を調製することもできる。一般に、これらの方法は、合成有機化学の分野の専門家には通常知られている合成方法を使用する。

10

【0224】

当技術分野の専門家には知られているように、免疫グロブリンは通常、「ヒンジ」領域と同定される柔軟な領域を含む。例えば、“*Concise Encyclopedia of Biochemistry*”, *Second Edition*, Walter de Gruyter & Co., pp. 282-283 (1988) 参照。ヒンジ領域のチオールがよく定義されているサイトを使用して、Fab'断片を、脂質、ポリマー、タンパク質及び/又はベシクルに架橋することができる。これは、Fab'断片をカップリングするために好ましい領域である。それというのも、強力な接合サイトは、抗原識別サイトからは離れているためである。一般に、適切に調製されていない限り、ヒンジ基のチオールを使用することは困難である。特に、Shahinian及びSalvias (*Biochimica et Biophysica Acta*, Vol 1239 (1995) 157-167) によって概説されているように、チオール基を減らして、例えば、マレイミド誘導架橋基にカップリングするために利用することができるようにすることが重要である。通常使用される還元剤の例は、エタンジチオール、メルカプトエタノール、メルカプトエチルアミン又はより一般的に使用され、クレランド試薬とも称されるジチオトレイトールである。しかしながら、ジチオトレイトールなどの一定の還元剤を利用する場合に、過還元が生じうるので、注意を払うべきであることを特記すべきである。過還元及び後続の変性又は構造変化に基づき、その活性又は結合能が低下しうるタンパク質では、還元剤の選択的な使用が必要である。例えば、Shahinian, S. and Salvias, J. R. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1239, 157-167 参照。

20

30

【0225】

抗体をペプシン(60 μ g/ml)と共に、0.1Mの酢酸ナトリウム(pH4.2)中で4時間、37°Cでインキュベーションすることにより、F(ab')₂抗体断片を調製することができる。2MのTris(pH8.8)を、最終濃度80mMになるまで加えることにより、消化を終えることができる。次いで、遠心分離(10000 $\times$ g、30分、4°C)により、F(ab')₂断片を得る。次いで、上澄みを4°Cで、150mMのNaCl、20mMのホスフェートに対して、pH7.0で透析することができる。次いで、これを、Protein A-Sepharose CL-4Bのカラムで、クロマトグラフィー処理して、未消化のIgGを除去することができる。次いで、溶液を十分に脱ガスし、使用する前に窒素でパージすることにより、Fab'断片を調製することができる。F(ab')₂断片を、5mg/mlの濃度で供給し、アルゴン下に、30mMのシステイン中で還元する。もしくは、システアミンを使用することができる。100mMのTris(pH7.6)を、緩衝液として、15分間、37°Cで使用することもできる。次いで、溶液を、等容量の適切な実験用緩衝液で2倍に希釈し、Bio-Gel P-6DGの0.4mlスピナラムで遠心脱水することができる。生じたFab'断片は、マレイミド架橋基へのそのカップリングにおいて、より効果的である。例えば、マレイミドスパーサーにカップリングするための、システイン基を含有する他の高分子で、同じ手順

40

50

を使用することもできる。さらに、システイン基を含有するならば、ペプチドを使用することもできる。ペプチドが新たに作られたものではなく、ペプチド構造内のシステイン基が酸化されている可能性がある場合には、前記のアプローチを使用して、チオール基を再生させる必要がある。

【0226】

付加的な架橋基は、二官能性スペーサーにカップリングするために使用することができる脂質の他の誘導体を含みうる。例えば、ホスファチジルエタノールアミン (PE) を、二官能性剤にカップリングさせることができる。例えば 4-(p-マレイミドフェニル) 酪酸 N-スクシンイミジル (SMPB) 及び 3-(2-ピリジルジチオール) プロピオン酸 N-スクシンイミジル (SPDP)、トランス-4-(N-マレイミジルメチル) シクロヘキサン-1-カルボン酸 N-スクシンイミジル (SMCC) 及び 3-マレイミジル安息香酸 N-スクシンイミジル (SMB) を使用して、例えば、官能化脂質 MPB-PE 及び PDPE-PE を生じさせることができる。

10

【0227】

アミン又はヒドロキシル基などの反応基を含有するポリエチレングリコールエチルアミンなどの親水性スペーサーの遊離末端を使用して、補因子又は他のターゲッティ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-スクシンイミジルビオチン又は p-ニトロフェニルビオチンと反応させて、スペーサー上に有効なカップリング基を導入することができる。例えば、ビオチンをスペーサーにカップリングさせることができ、これは容易に、非共役結合により、タンパク質と結合する。例として、MPB-PEG-DPPE を、次のように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 を、前記のように得る。次いで、SMPB: PEG-DPPE の合成を、クロロホルム中のトリエチルアミン 1 当量を用いて、1:5 の SMPB: DPPE-PEG のモル比で実施することができる。3 時間後、反応混合物をアルゴン下に、乾燥するまで蒸発させる。分取薄層クロマトグラフィー (TLC、クロロホルム中 50% のアセトンでシリカゲルを展開) により、過剰の未反応の SMPB 及び副生成物の大部分を除去する。脂質帯域の上部を、シリカから、クロロホルム中約 20~30% のメタノール (v: v) を用いて抽出すると、純粋完全な MPB-Peg-DPPE を単離することができる。次いで、ストレプトタビジン (Streptavidin) をタンパク質にカップリングさせて、次いで、タンパク質を、MPB-PEG-DPPE にカップリングさせることができる。簡単に SPDP をストレプトタビジンと共に室温で 30 分間インキュベーションし、クロマトグラフィーを使用して、未反応の SPDP を除去する。ジチオスレイトール (DTT) を反応混合物に加え、10 分後、2-チオピリドン (2-mercaptoethanol) を 343 nM の濃度で加える。反応混合物の残りを、DTT で還元する (25 mM、10 分間)。チオール化生成物を、ゲル除去により単離する。生じた、ストレプトタビジン標識されたタンパク質を次いで使用して、脂質成分に付いているビオチン化スペーサーに結合させることができる。

20

30

【0228】

脂質、タンパク質又はポリマー、ベシクル又は他の安定化物質にターゲッティングリガンドを共有結合させるために使用することができる付加的な方法は例えば、Unger, et al. の米国特許第 6090800 号及び Unger の米国特許第 6028066 号に記載されており、これらの記載をここで、全て参照して援用する。

40

【0229】

本発明の好ましい実施形態では、ターゲット化合物、即ちターゲット化脂質、タンパク質及びポリマーを、例えば、ターゲット化ミセル、ターゲット化リポソーム、ターゲット化アルブミン被覆ミクロスフェア及び／又はターゲット化ポリマー被覆ミクロスフェアを含むターゲット化ベシクルを生じさせるために使用される組成物中に導入することができる。ベシクルがそれから調製される化合物に付着しているターゲッティングリガンドは、例えば、ベシクル表面の外面向いてよい。したがって、受容体及び組織をターゲットとするために使用することができるターゲット化ベシクルが得られる。

50

【0230】

一定の実施形態では、ターゲッティングリガンドを、非共有結合性会合により本組成物に導入することができる。当技術分野の専門家には知られているように、非共有結合性会合は通常、例えば、該当する分子の極性、場合によっては該当する分子の電荷（正又は負）、分子ネットワークの水素結合の規模などを含む様々な要因の関数である。非共有結合は好ましくは、イオン相互作用、双極子-双極子相互作用、水素結合、親水性相互作用、ファンデルワールス力及びこれらの組合せからなる群から選択される。非共有結合性相互作用を、ターゲッティングリガンドを脂質に、又は直接にベシクル表面に結合するために使用することができる。例えば、アミノ酸配列 Gly-Gly-His を、好ましくは PEG などの架橋基によりベシクルの表面に結合させて、銅、鉄又はバナジリオンを加えることができる。米国特許第 5466467 号に記載されているように（この記載をここではすべて、参照して援用する）、ヒスチジン基を含有する抗体などのタンパク質は、銅イオンを伴うイオンブリッジを介して、ベシクルに結合することができる。水素結合の例は、脂質組成物に導入することができるカルジオ脂質に関する。

10

【0231】

ベシクル組成物に関する本発明の好ましい実施形態では、例えば、インビボでの pH 及び／又は温度の変化を、ターゲッティングリガンド中での位置の変化、例えば、ベシクル内から、ベシクルの外側壁の外側への位置の変化を促進するために使用することができる。これは、ターゲッティングリガンドがターゲッティングサイト、例えば、GP11bIIIIa 受容体などの受容体及び、心筋、内皮及び上皮細胞を含む組織への結合を促進する。それというのも、ターゲッティングリガンドは、このようなターゲッティング部位に対する暴露により高い可能性を有するためである。加えて、高エネルギー超音波を、ベシクルの破裂を促進するために使用することができる。これにより、ターゲッティングリガンドを所望の結合サイトに暴露することができる。

20

【0232】

本組成物中で使用されるターゲッティングリガンドの濃度は、例えば、使用される特定のターゲッティング剤、ターゲットとなるターゲット受容体又は組織、組成物の他の成分、ターゲッティングリガンドが、例えば脂質、タンパク質、ポリマー又はベシクルなどの組成物の他の成分と共有結合又は非共有結合によって会合しているかどうかに応じて、変動しうる。通常、本組成物中のターゲッティングリガンドの濃度は、低いレベルから始まって、所望の造影強化硬化が達成されるまで高めることができる。ターゲット化疎水性化合物（即ち、例えば、式 L-P-T の化合物又は式 (IV) の化合物の場合のように、ターゲッティングリガンドが、共有結合により例えば、脂質に結合している複合体）、さらに未結合又は遊離ターゲッティングリガンド（例えば、ターゲッティングリガンドが、非共有結合により、脂質などの安定化化合物に会合している実施形態のように）を、組成物中で使用されている非結合安定化物質の重量に対して約 0.05 重量% から約 20 重量% の範囲の濃度（及びこの範囲内の全ての組合せ及び二次的組合せ）で、組成物中で使用することができる。好ましくは、複合体又は遊離ターゲッティングリガンドを組成物中で、約 0.5 重量% から約 10 重量% の濃度で使用する事ができ、約 1 重量% から約 5 重量% の濃度がさらに好ましい。特に好ましくは、複合体又は遊離ターゲッティングリガンドを本組成物中で、約 1 重量% から約 2 重量% の濃度で使用する事ができ、約 1.25 重量% の濃度がさらに好ましい。他の実施形態では、約 5 重量% の濃度が特に好ましい。

30

40

【0233】

本発明の教示を得れば、専門家には分かるように、本発明の組成物中で使用することができるターゲット化疎水性化合物及び／又は未結合又は遊離のターゲッティングリガンドの濃度は、モル% で表すこともできる。この際には、ターゲット化疎水性化合物及び／又は未結合又は遊離のターゲッティングリガンドを、本発明の組成物中で、組成物中で使用される未結合の安定化物質のモル数に対して、0.05 モル% から約 10 モル% の範囲（及びこの範囲内の全ての組合せ及び二次的組合せ）の濃度で使用する事ができる。好ましくは、複合体又は遊離ターゲッティングリガンドを、組成物中で、約 0.5 モル% から約

50

5 モル % の濃度で 사용할 ことができ、約 1 モル % から約 3 モル % の濃度が好ましい。さらに好ましくは、複合体又は遊離ターゲットリガンドを、本組成物中で、約 1 モル % から約 2 モル % の濃度で 사용할 ことができ、約 1 . 8 モル % の濃度が特に好ましい。

【0234】

前記のように、本発明の脂質及び／又はベシクル組成物は望ましくは、水性環境中で処方される。これにより、脂質は、その疎水性／親水性の性質により、このような環境中で達成することができるもっとも安定な構造であるベシクルを生じる。このような水性環境を生じさせるために使用することができる希釈剤には例えば、脱イオン水あるいは、好ましくは、ベシクルの形成及び又は安定性あるいは超音波造影剤、MRI 造影剤又はCT 造影剤診断剤としてのその使用を妨げない塩などの1 種又は複数の溶解している溶質を含む水並びに通常の食塩水及び生理食塩水が含まれる。 10

【0235】

本発明の脂質及び／又はベシクル組成物はさらに、画像診断のための造影剤としてのその有効性を高めるために役立つ慣用の造影剤を含む付加的な造影剤を含有してもよい。

【0236】

したがって、柔軟なベシクル、例えば、脂質から処方されたベシクルあるいは非柔軟なベシクル、例えば、ポリメチルメタクリレートから調製されたベシクルを含むベシクル組成物を提供することは、本発明の範囲内である。

【0237】

本発明の組成物は特に、診断用超音波及び治療用超音波を含む超音波に関して使用することができる、と考えられる。超音波中での本発明の組成物の使用は、本記載を通して記載されている。 20

【0238】

前記のように、本組成物を、コンピュータ断層撮影 (CT) 造影に関して使用することもできる。CT は、様々な欠点を有しており、通常は、前記の診断技術に比べて、有効性は低い。しかしながら、十分に高い濃度の本発明の造影剤、特にガス充填ベシクル組成物が、該当領域、例えば血餅に輸送されるならば、血餅の全体密度の低減により、血餅をCT 画像で検出することができる。通常、前記の血餅を含む該当領域に輸送して、CT により検出するためには、ガス充填ベシクルの約 1 / 10 % から 1 % 以上の濃度 (容量ベースに対して) が必要である。 30

【0239】

本組成物中で使用するために適している代表的な常磁性造影剤には例えば、例えば、安定なニトロキシドなどの安定な遊離のラジカル、さらに、望ましくは、塩の形であってよいか、共有結合又は非共有結合により、その親油性誘導体を含む錯化剤又はタンパク質高分子に結合してよい遷移元素、ランタニド及びアクチニド元素を含む化合物が含まれる。

【0240】

好ましい遷移元素、ランタニド及びアクチニド元素には例えば、Gd (III)、Mn (II)、Cu (II)、Cr (III)、Fe (II)、Fe (III)、Co (II)、Er (II)、Ni (II)、Eu (III) 及びDy (III) が含まれる。さらに 40
好ましくは、元素は、Gd (III)、Mn (II)、Cu (II)、Fe (II)、Fe (III)、Eu (III) 及びDy (III)、特にMn (II) 及びGd (III) であってよい。

【0241】

前記の元素は、望ましい場合には、マンガン塩、例えば塩化マンガン、炭酸マンガン、酢酸マンガンなどの無機塩及びグルコン酸マンガンなどの有機酸及びマンガンヒドロキシルアパタイトを含む塩の形であってよい。他の代表的な塩には、鉄の塩、例えば、硫化鉄及び塩化鉄などの鉄塩が含まれる。

【0242】

これらの元素は、望ましい場合には、共有結合性又は非共有結合性会合により、その親油 50

性誘導体を含む錯化剤に、又はタンパク質高分子に結合していてもよい。好ましい錯化剤には例えば、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-テトラアザシクロデカン-N, N', N'', N'''-四酢酸（DOTA）、1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-N, N', N''-三酢酸（DOTA）、3, 6, 9-トリアザ-12-オキサー-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-三デカン酸（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（ピリドキシー-5-ホスフェート）エチレンジアミン、N, N'-二酢酸塩（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（*kryptand*；大環式錯体）及びデスフェリオキサミンが含まれる。さらに好ましくは、錯化剤は、EDTA、DTPA、DOTA、DO3A及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には、錯化剤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'-二酢酸塩（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'-二酢酸塩（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'-二酢酸塩（EDTA-LDP）；など、さらに、米国特許第5312617号に記載されているものが含まれ、この記載をここでは全て、参照して援用する。好ましいタンパク質高分子には例えば、アルブミン、コラーゲン、ポリアルギニン、ポリリシン、ポリヒスチジン、 γ -グロブリン及び β -グロブリンが含まれ、アルブミン、ポリアルギニン、ポリリシン及びポリヒスチジンが特に好ましい。

【0243】

したがって適切な錯体には、Mn(II)-DTPA、Mn(II)-EDTA、Mn(II)-DOTA、Mn(II)-DO3A、Mn(II)-クリプタンド、Gd(III)-DTPA、Gd(III)-DOTA、Gd(III)-DO3A、Gd(III)-クリプタンド、Cr(III)-EDTA、Cu(II)-EDTA又は鉄-デスフェリオキサミン、特に、Mn(II)-DTPA又はGd(III)-DTPAが含まれる。

【0244】

ニトロキシドは、ニトロキシド分子中に不対電子が存在することにより、MRIで、T1及びT2の両方の緩和速度を高める常磁性造影剤である。当技術分野の専門家には知られているように、MRI造影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常磁性核又は分子中の不対電子の数に、特に、不対電子の数の二乗に関連している。例えば、ガドリニウムは、7個の不対電子を有し、ニトロキシド分子は1個の不対電子を有する。したがって、ガドリニウムは通常、ニトロキシドよりもかなり強力なMRI造影剤である。しかしながら、造影剤の有効性を評価するもう1つの重要なパラメーターである有効な相関時間のために、ニトロキシドの立場が相対的に強まる可能性がある。例えば、常磁性造影剤を大きな分子に結合させることにより、タンブリング速度を遅くすると、これは、より遅く、したがってより有効に、水プロトンの緩和を促進するための移動エネルギーをタンブリングする。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、遅い回転相関時間が緩和を高めうる規模は限られる。しかしながら、ニトロキシドでは、電子スピン相関時間は、より有利で、これらの分子の回転相関時間を遅くすることにより、緩和性のかなりの増大が達成される。遅い回転相関時間の目的及び緩和で生じる改善を達成するために、本発明のガス充填ベシクルは理想的である。特定の作動理論に結びつけることは意図していないが、例えば、そのアルキル誘導体を作ることにより、ベシクルの周囲を被覆するようにニトロキシドを設計することができるので、生じる相関時間を最適化することができると、考えられる。さらに、生じる本発明の造影剤は、緩和性を最大限にする磁性球体、幾何学的形状とみなすことができる。

【0245】

望ましい場合には、ニトロキシドは、アルキル化又は誘導体化されていてよく、例えば、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、遊離ラジカル及び 2, 2, 6, 6-テトラメチル-1-ピペリジニルオキシ、遊離ラジカル (TMPO) である。

【0246】

本発明の組成物中で使用するために適している代表的な超常磁性造影剤には、磁区を受ける金属酸化物及び硫化物、純粋な鉄などの強磁性又はフェリ磁性化合物、磁鉄鉱、 γ -Fe₂O₃、Fe₃O₄、亜鉄酸マンガ、亜鉄酸コバルト及び亜鉄産ニッケルなどの磁性酸化鉄が含まれる。酸素 17 ガス (¹⁷O₂) などの常磁性ガスを、本発明の組成物中で使用することもできる。加えて、過分極キセノン、ネオン又はヘリウムガスを使用することもできる。MR 全身造影を、例えば血栓に関して迅速に体をスクリーニングするために使用することができ、血栓崩壊を促進するために望ましい場合には、超音波を適用することもできる。

10

【0247】

前記のような常磁性及び超常磁性造影剤などの造影剤を、脂質及び／又はベシクル組成物内の 1 成分として使用することもできる。ベシクル組成物の場合には、前記の造影剤を、その内部ボイドの中に封入するか、溶液としてベシクルと共に投与するか、付加的な安定化物質と導入するか、ベシクルの表面又は膜上にコーティングすることができる。

【0248】

望ましい場合には、常磁性及び超常磁性物質を、組成物、特にベシクルの脂質壁に導入されているアルキル化されている誘導体、又は他の誘導体として輸送することができる。特に、ニトロキシド 2, 2, 5, 5-テトラメチル-1-ピロリジニルオキシ、遊離ラジカル及び 2, 2, 6, 6-テトラメチル-1-ピペリジニルオキシ、遊離ラジカルは、例えば、アセチルオキシ結合を含む様々な結合を介して、メチル基で占められていない環の位置で、長鎖脂肪酸と共に付加生成物を形成しうる。このような付加生成物は、本発明の脂質及び／又はベシクル組成物に導入するために非常に適している。

20

【0249】

1 種又は複数の常磁性及び／又は超常磁性物質からなる混合物を、本発明の組成物中で使用することもできる。常磁性及び超常磁性物質は、望ましい場合には、別々に共投与することもできる。

30

【0250】

本発明の脂質及び／又はベシクル組成物、特にベシクル組成物は、前記の超常磁性物質の有効なキャリアとして役立つだけでなく、造影剤の磁化率の効果を改善することができる。超常磁性造影剤には、金属酸化物、特に酸化鉄が含まれるが、磁区を受ける様々な量のマンガ、コバルト及びニッケルを含有する酸化マンガ及び酸化鉄が含まれる。これらの物質は、ナノ又はマイクロ粒子であり、非常に高い体積磁化率及び横緩和速度を有する。より大きな粒子、例えば、約 100 nm の直径を有する粒子は、R1 緩和性に比較して、より高い R2 緩和性を有する。より小さい粒子、例えば、約 10 から約 15 nm の直径を有する粒子は、R2 緩和性よりも若干低い、よりバランスのとれた R1 及び R2 値を有する。かなり小さい粒子、例えば、約 3 から約 5 nm の直径を有する単結晶酸化鉄粒子は、より低い R2 緩和性を有するが、おそらく、最もバランスの取れた R1 及び R2 緩和速度を有する。非常に高い緩和速度の超常磁性鉄の核を封入するようにフェリチンを処方することができる。脂質及び／又はベシクル組成物、特に、ガス充填ベシクルを含むベシクル組成物は、これらの慣用の酸化鉄ベースの MRI 造影剤の効率及び安全性を高めうる。

40

【0251】

酸化鉄は簡単に、脂質及び／又はベシクル組成物に導入することができる。好ましくは、脂質から処方されたベシクルの場合には、米国特許第 5088499 号に記載されていて、その記載をここで全て、参照して援用することができるように、例えば、ベシクルの表

50

面に吸収させるか、ベシクルの内部に捕捉することにより、酸化鉄を、ベシクルの壁に導入することができる。

【0252】

特定の作動理論に結びつけることはないが、本発明のベシクルは、いくつかの機構により、超常磁性造影剤の効力を高めると考えられる。第一に、ベシクルは、酸化鉄粒子の見かけの磁性濃度を高めるように機能すると、考えられる。即ち、ベシクルは、常磁性及び超常磁性物質を含むMRI造影剤のみかけの回転相関時間を高めて、緩和速度を高めると考えられる。加えて、ベシクルは、この後に記載の方法により、造影剤の見かけの磁区を高めるようである。

【0253】

いくつかの本発明のベシクル、特に脂質から処方されたベシクルは、例えば、造影剤の水懸濁液あるいは、静脈内注入又は他の体の部位への注入の場合には、血液又は他の体液を含む懸濁媒体とは異なる磁化率の柔軟な球体領域として可視化されうる。フェライト又は酸化鉄粒子の場合には、これらの物質により得られるコントラストは、粒度に依ることを特記する。この現象は、非常に一般的で、往々にして、水分子の「永年」緩和とも称される。さらに物理的な表現で記載すると、この緩和機構は、常磁性原子又は常磁性分子が存在する分子錯体の有効サイズに依存している。物理的説明の1つが、次のソロモン-ブルーームバーゲン式 (Solomon-Bloembergen equations) で示されており、これは、常磁性寄与率を、常磁性イオンにより摂動される磁気回転比 g を伴うスピン $1/2$ 核の T_1 及び T_2 緩和時間の関数として定義する：

$$1/T_1 M = (2/15) S(S+1) \gamma^2 g^2 \beta^2 / r^6 [3\tau_c / (1 + \omega_I^2 \tau_c^2) + 7\tau_c / (1 + \omega_S^2 \tau_c^2)] + (2/3) S(S+1) A^2 / h^2 [\tau_e / (1 + \omega_S^2 \tau_e^2)]$$

及び

$$1/T_2 M = (1/15) S(S+1) \gamma^2 g^2 \beta^2 / r^6 [4\tau_c / 3\tau_c / (1 + \omega_I^2 \tau_c^2) + 13\tau_c / (1 + \omega_S^2 \tau_c^2)] + (1/3) S(S+1) A^2 / h^2 [\tau_e / (1 + \omega_S^2 \tau_e^2)]$$

[上式中、

S は、電子スピン量子数であり；

g は、電子 g 係数であり；

β は、ボーア磁子であり；

ω_I 及び ω_S ($657\omega_I$) は、核スピン及び電子スピンに関するラーモア角歳差周波数であり；

r は、イオン-核距離であり；

A は、超微細結合定数であり；

τ_c 及び τ_e はそれぞれ、双極子及びスカラー相互作用に関する相関時間であり；かつ

h は、プランク定数である]。例えば、Solomon, I. Phys. Rev. Vol. 99, p. 559 (1955) 及び Bloembergen, N. J. Chem. Phys. Vol. 27, pp. 572, 595 (1957) 参照。

【0254】

少数の大きな粒子は、主に、より大きな相関時間により、多数のより小さい粒子よりもかなり高い効果を有する。しかし、酸化鉄粒子を非常に大きくしようとすると、高い毒性が生じ、肺が梗塞しうるか、補足的なカスケード系が活性化されうる。さらに、粒子の全体サイズは、その縁部又は外側表面での粒子の直径ほどには重要ではないと考えられる。磁化のドメイン又は磁化率効果は、粒子の表面から急激に低下する。一般には、(スペースを通しての) 極性緩和機構の場合には、この指数低下は、常磁性極性-極性相互作用では r^6 依存を示す。文字通りに解釈すると、常磁性表面から4オングストローム離れている水分子は、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64分の1の影響を受ける。造影効果を最適化することに関して理想的な状況は、酸化鉄粒子を中空、柔軟及び可能な限り大きくすることである。今まではこのことを達成することは不可能で、そ

10

20

30

40

50

の利点も、今までは理解されていなかったと考えられる。ベシクルの内表面又は外表面を造影剤でコーティングすることにより、個々の造影剤、例えば、酸化鉄などの粒子又は常磁性イオンが比較的小さい構造であっても、造影剤の有効性をかなり高めることができる。このようにすると、造影剤は、有効なかなり大きい球体として作用し、その際、磁化の有効領域は、ベシクルの直径により決まり、ベシクル表面で最大である。これらの物質は、柔軟性、即ち、コンプライアンスの利点をもたらす。硬いベシクルが、肺又は他の臓器に留まり、毒性反応をもたらすのに対して、これらの柔軟なベシクルは、毛細血管をかなり容易にスライドする。

【0255】

前記の柔軟なベシクルとは異なり、一定の状況では、例えば、ポリメチルメタクリレートを含む実質的に不透過性のポリマー物質からベシクルを処方することが望ましい。これにより通常、実質的に不透過性で、比較的非弾性及び脆性であるベシクルの形成が生じる。画像診断、例えば超音波に関する実施形態では、このような脆性ベシクルを含む造影剤は通常、柔軟なベシクルがもたらす望ましい反射率をもたらさない。しかしながら、超音波の出力を高めることにより、脆性なミクロスフェアを破裂させて、アコースティック・エミッションを生じさせて、これを、超音波トランスデューサにより検出することができる。

【0256】

核医学映像法（NM I）を、本発明の診断及び治療法の態様との関連で使用することができる。例えば、NM Iは、本発明の組成物中に、前記のガスの他に、又はその代わりに導入することができる Xe^{133} などの放射性ガスを検出するために使用することができる。このような放射性ガスを、例えば血栓を検出する際に使用するためのベシクル内に捕捉することができる。好ましくは、二官能性キレート誘導体を、ベシクルの壁に導入し、生じたベシクルを、NM I及び超音波の両方で使用することができる。この場合、テクネチウム ^{99m} 又はイリジウム ^{111} などの高エネルギー、高品質の核医学映像法同位体を、ベシクルの壁に導入することができる。次いで、全身ガンマ走査カメラを使用して、インビボで撮取されたベシクルの領域を迅速に決定することができる。望ましい場合には、超音波を使用して、例えば血管内の血餅の存在を確認することもできる。それというのも、超音波は通常、核医学技術に比較して改善された結果をもたらすためである。NM Iを使用して、患者の全身をスクリーニングし、血管血栓の部位を検出することもでき、超音波をこれらの領域に局所的に適用して、ベシクルの破裂を促進し、血餅を治療することができる。

【0257】

光学的撮像では、アルゴン又はネオンなどの光学的に活性なガスを、本発明の組成物中に導入することもできる。加えて、光学的に活性な物質、例えば、ポルフィリン誘導体を含む蛍光物質を使用することもできる。組織弾性画像化法（Elastography）は、1 MHzを上回る周波数に関する超音波に比較して、かなり低い周波数音波、例えば約60 KHzを通常は使用する撮像技術である。組織弾性画像化法では、音波エネルギーを通常は、組織に適用し、次いで、組織の弾性を測定することができる。高弾性なベシクルに関する本発明の好ましい実施形態では、例えば血餅へのこのようなベシクルの堆積は、組織及び／又は血餅周囲のスペースの局所的弾性を高める。次いで、この増加した弾性を、組織弾性画像化法で検出することができる。望ましい場合には、組織弾性画像化法を、MRI及び超音波などの他の撮像技術と組み合わせて使用することができる。

【0258】

前記の診断撮像技術及び血餅の血栓崩壊に加えて、本発明の組成物は、様々な治療理学療法で使用するすることができる。例えば、生物活性剤、例えば薬剤を、本発明の組成物に導入することができる。有効な薬剤には例えば、硫酸ヘパリン、組織プラスミノゲン活性化因子、ストレプトキナーゼ及びウロキナーゼ及びヒルジンが含まれる。治療用途では、例えば、静脈うっ血を低減するための硫酸ヘパリンと共に使用することができるジヒドロエルゴタミンを含む補足的物質を使用することもできる。加えて、ワルファリンを、抗凝固

療法のための補助剤として使用することもできる。遺伝物質を、本発明の組成物に導入することもできる。ベシクル組成物の場合には、遺伝物質を、ベシクルの壁中に、又はベシクルの中心ガス充填ボイド内に導入することもできる。ベシクル壁にカチオン脂質を使用すると、これは簡単に、達成することができる。血管内皮成長因子又は、塩基性線維芽細胞成長因子を対象とするアンチセンス遺伝子断片などの遺伝子を使用することもできる。原アテローム硬化を治療するために、又はフィブ्रो内膜過形成の傾向を低減するために、本発明を使用することもできる。

【0259】

本発明の脂質及び／又はベシクル組成物は、様々な適切な方法を使用して調製することができる。これらは、下記で別々に、ガス充填ベシクルを含む脂質組成物及びガスに関する実施形態並びにガス充填ベシクルを含む脂質組成物及びガス前駆体に関する実施形態で詳述するが、ガス及びガス前駆体の両方を含有する組成物も、本発明の一部である。

10

【0260】

前記のように脂質、タンパク質、ポリマー及び／又は補助的安定化物質を含む、組成物がそれから製造される組成物中使用されている1種又は複数の物質に結合することにより、ターゲティングリガンドを、ガス又はガス前駆体充填ベシクルに付着させることができる。

【0261】

ミセル及び／又はリポソームなどのベシクル組成物を含む組成物を調製するために、幅広い方法を利用することができる。これらの方法には例えば、振盪、乾燥、ガス導入、噴霧乾燥などが含まれる。ベシクル組成物を調製するための適切な方法は例えば、米国特許第5469854号に記載されていて、その記載をここでは、参照して援用する。前記のように、ベシクルを好ましくは、ゲル状態のままの脂質から調製する。

20

【0262】

ミセル組成物の調製に特に関連して、次の検討を提供する。当技術分野の専門家には分かるであろう様々な慣用のミセル調製方法のうちのいずれかを使用して、ミセルを調製することができる。これらの方法は通常、有機溶剤中に脂質化合物を懸濁させ、溶剤を蒸発させ、水性媒体に再懸濁させ、音波処理及び遠心分離することを含む。前記の方法、さらに他の方法は例えば、Canfield et al., *Methods in Enzymology*, Vol. 189, pp. 418-422 (1990); El-Gorab et al., *Biochem. Biophys. Acta*, Vol. 306, pp. 58-66 (1973); Colloidal Surfactant, Shinoda, K. Nakagana, Tamamushi and Isejura, Academic Press, NY (1963) (特に、“The Formation of Micelles”, Shinoda, Chapter 1, pp. 1-88); Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems, Fendler and Fendler, Academic Press, NY (1975)で検討されている。前記の刊行物それぞれの記載をここでは全て、参照して援用する。

30

【0263】

前記のように、ベシクル組成物は、リポソームを含んでよい。所定のリポソームでは、脂質化合物は、単分子層又は二分子層の形であってよく、単分子層又は二分子層脂質を、1つ又は複数の単分子層又は二分子層を生じさせるために使用することができる。2つ以上の単分子層又は二分子層の場合には、単分子層又は二分子層は通常、同心である。したがって、脂質を使用して、ユニラメラリポソーム(1つの単分子層又は二分子層からなる)、オリゴラメラリポソーム(約2つ又は約3つの単分子層又は二分子層からなる)又はマルチラメラリポソーム(約3を上回る単分子層又は二分子層からなる)を生じさせることができる。

40

【0264】

リポソーム組成物の調製に関して、幅広い方法を利用することができる。したがって、当

50

技術分野の専門家には分かるであろう様々な慣用のリポソーム調製技術のうちのいずれかを使用して、リポソームを調製することができる。これらの技術には例えば、溶剤透析、フレンチプレス、押出し（凍結－融解を伴うか、伴わない）、逆相蒸発、一回凍結－融解、音波処理、キレート透析、均質化、溶剤注入、マイクロエマルジョン化、自発形成、溶剤蒸発、溶剤透析、フレンチプレッシャセル技術、制御界面活性剤透析などが含まれ、それぞれ、様々な方法でのベシクルの調製に関する。例えば、Madden et al., Chemistry and Physics of Lipids, 1990 53, 37-46 参照、この記載をここでは全て、参照して援用する。適切な凍結融解技術は例えば、1989年11月8日に提出された国際出願PCT/US89/第05040に記載されており、この記載をここでは全て、参照して援用する。リポソームの調製では、凍結融解技術を含む方法が、好ましい。リポソームの調製は、生理食塩水、水性リン酸緩衝液又は滅菌水などの溶液中で実施することができる。振盪又は渦流を含む様々なプロセスで、リポソームを調製することができる。例えば、Wig-L-Bug（登録商標、Crescent Dental、Lyons、IL）、ドイツ、フランクフルト所在のDegussa AGにより販売されているMixomat、ドイツ、Seefeld、Oberay所在のEspe Fabrik Pharmazeutischer Praeparate GmbH & Co. により販売されているCapmix、リヒテンシュタイン所在のVivadentにより販売されているSilamat Plus、英国Sussex所在のQuayle Dentalにより販売されているVibrosなどの機械的振盪装置を使用することにより、これは達成される。Microfluidizer（登録商標、Microfluidics、Woburn、MA）などの慣用のマイクロエマルジョン化装置を使用することもできる。

10

20

【0265】

ガス充填ベシクルを調製するために、噴霧乾燥を使用することもできる。この手順を使用する場合、脂質を水性環境中で予め混合し、次いで、噴霧乾燥させて、ガス充填ベシクルを調製する。ベシクルを、所望のガスのヘッドスペース下に貯蔵することができる。

【0266】

ベシクル組成物を調製する際に適している多くのリポソーム調製技術が例えば、米国特許第4728578号；英国特許出願GB第2193095A号；米国特許第4728575号；米国特許第4737323号；国際出願PCT/US85/第01161号；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4533254号；Mayhew et al., Methods in Enzymology, Vol. 149, pp. 64-77 (1987)；Mayhew et al., Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 755, pp. 169-74 (1984)；Cheng et al., Investigative Radiology, Vol. 22, pp. 47-55 (1987)；国際出願PCT/US89/第05040号；米国特許第4162282号；米国特許第4310505号；米国特許第4921706号；及びLiposome Technology, Gregoriadis, G., ed., Vol. I, pp. 29-31, 51-67及び79-108 (CRC Press Inc., Boca Raton, FL 1984)で検討されており、これらそれぞれの記載をここでは全て、参照して援用する。

30

40

【0267】

ガスを含む脂質組成物は、望ましい場合には安定化物質を含む水溶液を、ガスの存在下に攪拌することにより調製することができる。ここで使用する場合の「攪拌」との用語は、ガスが局所的な周囲環境から水溶液へと導入されるような水溶液の振盪運動のことを意味している。この攪拌は好ましくは、脂質のゲル－液晶相転移温度未満の温度で行う。溶液の攪拌に関する振盪は好ましくは、ベシクル組成物、特にガス充填ベシクルを含

50

むベシクル組成物を含む、脂質組成物を生じさせるに十分な力である。この振盪は、渦流などの渦運動、横一横又は上下運動によるものであってよい。様々なタイプの運動を組み合わせることができる。さらに、脂質水溶液を保持する容器を振盪することにより、又は容器自体を振盪させること無く、容器内の水溶液を振盪することにより、振盪を生じさせることができる。

【0268】

この振盪は、手動又は機械により生じさせることができる。使用することができる機械的な振盪機には例えば、VWR Scientific (Cerritos, CA) shaker tableなどの振盪機テーブル、さらに、前記のような振盪装置のいずれかが含まれるが、Capmix (Espe Fabrik Pharmazeutische Praeparate GmbH & Co., ドイツ、Seefeld, Oberay) が好ましい。一定のモードの振盪又は渦流を使用して、好ましいサイズ範囲のベシクルを製造することができることが判明した。振盪が好ましく、Espe Capmix 機械振盪機を使用して、振盪を実施することが好ましい。この好ましい方法では、往復運動を利用して、脂質組成物、特にベシクル組成物を生じさせるのが好ましい。運動を、円弧の形で往復させるのが、さらに好ましい。往復、さらに円弧の速度は特に、ベシクルの形成に関して重要であると考えられる。好ましくは、往復運動又は完全循環振動の回数は、1分当たり約1000から約20000回である。さらに好ましくは、往復運動又は振動の回数は、約2500から約8000回であり、約3300から約5000回の往復運動又は振動が特に好ましい。勿論、振動の回数は、攪拌される内容物の量に依存している。一般に、質量が大きいほど、振動は少ない。振盪を生じさせるための他の手段には、高速又は高圧下に放出されるガスの作用が含まれる。

【0269】

好ましくは、より高い容量の水溶液を用いると、力の全体量も相応して高まることは理解されるであろう。激しい振盪は、1分あたり少なくとも約60回の振盪運動と定義され、これが好ましい。1分当たり約60から約300回転での渦流がさらに好ましい。1分当たり約300から約1800回転での渦が、特に好ましい。

【0270】

前記の簡単な振盪方法に加えて、より入念な方法も使用することができる。このような入念な方法には例えば、Unger et al. の米国特許第5580275号に記載されているもののような（この記載をここでは参照して援用する）、液晶振盪ガス滴注プロセス及び真空乾燥ガス滴注プロセスが含まれる。数多くの技術のうちのいずれかを使用することができるが、本発明で使用されるベシクル組成物は好ましくは、振盪技術を使用して調製される。好ましくは、振盪技術は、例えば、Unger et al. の米国特許第5542935号に記載されている技術（この記載をここでは参照して援用する）を使用するEspe Capmix（ドイツ、Seefeld, Oberay）などの機械的振盪装置での攪拌を含む。

【0271】

望ましい場合には、例えば、マイクロエマルジョン化、渦流、押出し、濾過、音波処理、均質化、繰り返し凍結融解サイクル、規定のサイズの空孔を介しての圧力下での押出し及び同様の方法を含む、様々な手順により、ガス充填ベシクルサイズを調整することができる。ここに記載の方法に従い調製されたガス充填ベシクルは、約1 μm 未満から約100 μm を上回るサイズ範囲であってよい。加えて、下記で詳述する押出し及び滅菌手順の後に、攪拌又は浸透により、ベシクル組成物が得られるが、これは、残りの溶液中に残留無水脂質相を実質的にもたらさないか、最小限しかもたらさない（Bangham, A. D., Standish, M. M., & Watkins, J. C., J. Mol. Biol. Vol. 13, pp. 238-252 (1965)）。望ましい場合には、生じさせたそのまま、そのサイズをさらに改質することを試みる必要なしに、本発明のベシクルを使用することができる。静脈内使用のためには、ベシクルは好ましくは、約30 μm 未満、さらに好ましくは約12 μm 未満の直径を有する。例えば、ガン組織などの特定の組織

に結合することを含む、ターゲット化静脈内使用では、ベシクルはかなり小さくて、例えば、約100nm未満の直径であってよい。小腸又は胃腸用の用途では、ベシクルは、かなり大きくて、例えば、1ミリメートルのサイズまでであってよい。好ましくは、ベシクルを、約2μmから約100μmの直径を有するサイズにする。

【0272】

フィルターを介する簡単な押出しプロセスにより、ガス充填ベシクルのサイズを調整することができ、その際、フィルター空孔サイズによって、生じるガス充填ベシクルのサイズ分布を制御する。フィルターからなる2個又はそれ以上のカスケード状又は積層セット、例えば8μmフィルターが後接続している10μmフィルターを使用することにより、7から9μm付近の非常に狭いサイズ分布を有するように、ガス充填ベシクルを選択することができ、濾過の後に、これらのガス充填ベシクルは、24時間以上安定なままである。

10

【0273】

組成物が使用前に滅菌バイアルから出される場合には例えばフィルターアセンブリを使用することにより、サイズ調整又は濾過ステップを達成することができ、あるいは、さらに好ましくは、フィルターアセンブリを、使用の間にシリンジに導入しておくこともできる。ベシクルのサイズ調整の方法は、バレル、少なくとも1個のフィルター及び針を含むシリンジを使用することを含み；ベシクルをバレルから、バレルと針との間のシリンジに取り付けられているフィルターを介して押出すことを含む1ステップの押出しにより実施することができ、この際、患者に投与する前に、ベシクルをサイズ調整する。この押出しステップは、シリンジにベシクルを引き入れることも含んでよく、その際、フィルターは同様に、シリンジへの入口でベシクルをサイズ調整するように機能する。他の選択肢は、このようなシリンジに、既に他の手段でサイズ調整されているベシクルを充填することであり、この場合、所望のサイズ範囲内又は所望の最大サイズのベシクルのみが後で、シリンジから押出されて投与されることを保証するように、フィルターは機能する。

20

【0274】

一定の好ましい実施形態では、ベシクル組成物を熱滅菌又はフィルター滅菌し、振盪前にフィルターを介して押出すことができる。一般に、ガスを含むベシクル組成物は、熱滅菌することができ、ガス前駆体を含むベシクル組成物は、フィルター滅菌することができる。ガス充填ベシクルを生じさせたら、これを、前記のようにサイズ調整のために濾過することもできる。ガス及びガス前駆体充填ベシクルの形成前にこれらのステップを行うと、直ぐに患者に投与することができる滅菌ガス充填ベシクルが得られる。例えば、バイアル又はシリンジなどの混合容器に、濾過された脂質組成物を充填し、組成物を、混合容器内で、例えばオートクレーブ処理により滅菌することができる。ガスを、組成物中に注入して、滅菌容器を振盪することにより、ガス充填ベシクルを生じさせることができる。好ましくは、滅菌容器に、フィルターを取り付け、これを、ガス充填ベシクルが、患者に接触する前にフィルターを通過するように位置させる。

30

【0275】

フィルターを介して脂質化合物の溶液を押出すステップは、無水物質を破壊し、水和のためのより大きな表面積を与えることにより、非水和物質の量を減らす。好ましくは、フィルターは、約0.1から約5μm、さらに好ましくは、約0.1から約4μm、特に好ましくは約0.1から約2μm、極めて好ましくは、約1μmの空孔サイズを有する。通常は望ましくない非水和化合物は、不均一なサイズの非晶質クランプとして生じる。

40

【0276】

滅菌ステップにより、例えば、超音波又はCTを含む画像診断のために患者に直ぐに投与することができる組成物が得られる。一定の好ましい実施形態では、熱滅菌により、好ましくは、少なくとも約100℃の温度で溶液をオートクレーブ処理することにより、さらに好ましくは、少なくとも約100℃から約130℃、特に、約110℃から約130℃、さらに好ましくは、約120℃から約130℃、特に好ましくは約130℃の温度で溶液をオートクレーブ処理することにより、滅菌を行うことができる。好ましくは、加熱を、

50

少なくとも約 1 分間、さらに好ましくは約 1 から約 30 分間、特に、約 10 から約 20 分間、極めて好ましくは、約 15 分間行う。

【0277】

望ましい場合には、前記のような押出し及び加熱ステップは逆であってよい、又はこの 2 つのステップのうちの 1 つのみを使用することもできる。例えば、 γ 線照射を含む、滅菌の他の方法を使用することもできる。

【0278】

前記の実施形態に加えて、ベシクルに含有される気体前駆体を処方することができ、これは、活性化すると、例えば、高温、pH の変動又は光にさらすと、例えば、ベシクル中に捕捉されている液体を含む液体から、ガスへと相転移して、膨張し、前記のガス充填ベシクルを生じうる。この技術は、Unger, et al. の米国特許第 5542935 号及び Unger, et al. の米国特許第 5585112 号に詳細に記載されており、この記載をここでは全て、参照して援用する。

10

【0279】

ガス前駆体を活性化するための好ましい方法は、高温にさらすことである。活性化又は転移温度などの用語は、ガス前駆体の沸点であり、ガス前駆体の液-気相転移が生じる温度である。有効なガス前駆体は、約 -100°C から約 70°C の範囲内の沸点を有する物質である。活性化温度は、各ガス前駆体によって特異的である。約 37°C 又はほぼヒトの体温の活性化温度が、本発明のガス前駆体では好ましい。したがって、好ましい形態では、液体のガス前駆体は活性化されると、約 37°C 又はそれ未満でガスになる。ガス前駆体は、本発明の方法で使用するために、液体又は気相であってよい。

20

【0280】

ガス前駆体充填ベシクルを調製する方法は、液体が、例えばベシクル中に導入されるように、ガス前駆体の沸点未満で実施することができる。加えて、この方法は、ガスが、例えばベシクル中に導入されるように、ガス前駆体の沸点で行うこともできる。低い温度の沸点を有するガス前駆体では、液体の前駆体を、低温まで冷却されたマイクロ流動化装置を使用して、乳化することができる。液体の形で前駆体を使用するために、液体媒体中で溶剤を使用して、沸点を低下させることもできる。さらに、プロセスを通して温度が高まる方法を行うこともでき、この際、プロセスを、液体としてのガス前駆体で開始して、ガスで終了する。

30

【0281】

ターゲット化組織又は液体中でその場で、又は患者又は動物に侵入するとインビボで、又は使用前に、又は貯蔵の間に、又は製造の間に、ガスが生じるように、ガス前駆体を選択することができる。温度-活性化ガス前駆体充填ベシクルを製造する方法を、ガス前駆体の沸点未満の温度で実施することができる。この実施形態では、ガス前駆体は、製造の間に相転移が生じないように、ベシクル内に捕捉される。代わりに、ガス前駆体充填ベシクルを、ガス前駆体の液相の形で製造する。温度が前駆体の沸点を上回った時点で、相転移の活性化が生じる。したがって、液体のガス前駆体の滴中の液体の量がわかれば、気体状態を達成した際のベシクルのサイズを決定することができる。

【0282】

40

もしくは、ガス前駆体を使用して、使用する前に予め生じている安定なガス充填ベシクルを造ることもできる。この実施形態では、ガス前駆体を、脂質組成物が収容されている容器に、個々のガス前駆体の液-気相転移温度未満の温度で加える。温度が上昇し、ガス前駆体と液体溶液との間にエマルションが生じると、ガス前駆体は、液体から気体状態へと転移する。この加熱及びガス形成の結果として、ガスが、液体混合物上のヘッドスペース中の空気に代わって、ガス前駆体のガス、周囲ガス（例えば空気）を捕捉しているか、ガス状態のガス前駆体及び周囲空気を同時に捕捉しているガス充填ベシクルが生じる。この相転移は、造影剤の最適な混合及び形成のために使用することができる。例えば、ガス前駆体、ペルフルオロブタンを脂質ベシクル中に捕捉することができ、温度が上昇してペルフルオロブタンの沸点（ 4°C ）を上回ると、ペルフルオロブタンガスはベシクルに捕捉さ

50

れる。

【0283】

したがって、ガス前駆体を、インピボでガス充填ベシクルが生じるように選択することができるか、又は、その場で、製造プロセスの間に、貯蔵の間に、又は使用の前に、ガス充填ベシクルが生じるように設計することができる。水浴、超音波発生装置又は、閉じたストップコックの方へシリンジのプランジャを引くことによる流体力学的活性化を、I・V・注入の前に、ターゲット化ガス充填ベシクルを、温度感受性ガス前駆体から活性化するために使用することができる。

【0284】

本発明の他の実施形態では、水性エマルジョン中で液体状態のガス前駆体を予め生じさせることにより、ガス状態への転移が果たされた際のベシクルの最大サイズを、理想気体の法則を使用して概算することができる。ガス前駆体からガス充填ベシクルが生じるために、気相が直ちに生じると考えられ、新たに生じたベシクル中のガスは、通常はそのままでは水性である液体中に拡散するために、消費され尽くされない。したがって、エマルジョン中の判明している液体容量から、ガス充填ベシクルのサイズの上限を予測することができる。

【0285】

本発明の実施形態では、特異的な温度、例えばガス前駆体の沸点に達すると、液滴が、膨張して、規定のサイズのガス充填ベシクルになるように、規定のサイズの液滴を含有する脂質化合物及びガス前駆体からなる混合物を処方することができる。規定のサイズは、実際のサイズの上限を示している。それというのも、理想気体の法則は、溶液へのガスの拡散、大気へのガスの損失及び、高圧の効果などのファクターを考慮し得ないためである。

【0286】

液体からガス状態へと転移する際のバブルの容量の増大を算出するために使用することができる理想気体の法則は、次である：

$$P V = n R T$$

〔上式中、

Pは、大気圧（atm）であり；

Vは、リットル容量（L）であり；

nは、ガスのモル数であり；

Tは、ケルビン温度（K）であり；かつ

Rは、理想気体定数（22.4 L-atm/K-モル）である〕。液体混合物中の液体の容量、密度及び温度が分かると、液体の前駆体の例えばモルでの量及び容量を算出することができ、液体前駆体は、ガスに変わると、膨張して、判明している容量のベシクルになる。算出された容量は、ガス充填ベシクルのサイズの上限を反映しているが、その際、ガス充填ベシクル中への即時膨張及び膨張時間に互ってのガスの無視しうる拡散を仮定している。

【0287】

したがって、前駆体液滴が球体である混合物中で、液体状態で前駆体を安定化することに関して、前駆体液滴の容量は、次式で決定することができる：

$$\text{容量（球体ベシクル）} = 4 / 3 \cdot \pi r^3$$

〔上式中、

rは、球体の半径である〕。したがって、容量を予測し、所望の温度での液体の密度が分かれば、液滴中の液体のガス前駆体の量を決定することができる。より記述的な表現では、理想気体の法則：

$$P V = n R T$$

により、

次の式を当てはめることができる：

$$V_{gas} = 4 / 3 \cdot \pi (r_{gas})^3、$$

あるいは、

10

20

30

40

50

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

又は

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

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

と表され、液体容量に変換すると、

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

[上式中、Dは、前駆体の密度である]。液滴の直径を解くためには、

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

であり、これは、
直径 = $2 [[r_{gas}^3] P / R T [MW_n / D]^{1/3}$ に換算される。

10

【0288】

本発明の方法で使用するために望ましいサイズのベシクルを調製するための他の方法として、容量、特に液体の液滴の半径の知識を元に、ガス前駆体液滴を適切な直径の球体にサイズ調節するために、適切なサイズのフィルターを使用することができる。

【0289】

代表的なガス前駆体を、規定のサイズ、例えば10 μm直径のベシクルを生じさせるために使用することができる。この例では、ベシクルを、ヒトの血流中で生じさせ、したがって、通常温度は、37℃又は310 Kである。1気圧の圧力で、(A)の式を使用すると、ガス前駆体 7.54×10^{-17} モルが、10 μm直径のベシクルの容量を充填するために必要であろう。

20

【0290】

前記の算出量のガス前駆体及び分子量76.11、沸点32.5℃及び20℃での密度0.7789 g/mlを有する1-フルオロブタンを使用する場合、他の計算により、この前駆体 5.74×10^{-15} グラムが、10 μmベシクルのために必要であろうことが予測される。さらに推測すると、密度の知識をもとに、式(B)によりさらに、液体の前駆体 8.47×10^{-16} mLが、10 μmの上限を有するベシクルを生じさせるために必要であることが予測される。

【0291】

最後に、式(C)を用いると、混合物、例えば半径0.0272 μm又は対応する直径0.0544 μmを有する液滴を含むエマルションが、10 μmベシクルの上限を有するガス前駆体充填ベシクルを製造するために生じる。

30

【0292】

適切なサイズのフィルターを使用することにより、この粒度のエマルションを簡単に得ることができる。加えて、規定のサイズのガス前駆体液滴を生じさせるために必要なフィルターサイズから分かるように、フィルターのサイズは、ありうる細菌汚染物を除去するために十分であり、したがって、滅菌濾過として使用することもできる。

【0293】

ガス充填ベシクルを調製するためのこの実施形態を、温度により活性化される全てのガス前駆体に適用することができる。実際に、溶剤系の凝固点の低下により、0℃未満の温度で液-気相転移が生じるガス前駆体を使用することができる。ガス前駆体を懸濁するための媒体が得られるように、溶剤系を選択することができる。例えば、緩衝食塩水に混合可能な20%プロピレングリコールは、水単独での凝固点未満の凝固点低下を示す。プロピレングリコールの量を増やすか、塩化ナトリウムなどの物質を加えることによりさらに、凝固点を低下させることができる。

40

【0294】

適切な溶剤系の選択は、物理的方法によって決定することもできる。ここでは溶質とも称される物質、固体又は液体が、水系緩衝液などの溶剤に溶解する場合には、溶液の組成に応じた量により、凝固点が低下する。したがって、Wallによって定義されているように、溶剤の凝固点低下を次の式により表すことができる：

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

50

[上式中、

x_a は、溶剤のモル分率であり；

x_b は、溶質のモル分率であり；

ΔH_{fus} は、溶剤の熱融合であり；かつ

T_o は、溶剤の通常の凝固点である]。溶剤の通常の凝固点は、式の解により得られる。

x_b が x_a よりも小さい場合には、上式は、次のように書き直すことができる：

$$x^b = \Delta H_{fus} / R (T - T_o / T_o T) \quad \Delta H_{fus} \Delta T / R T_o^2$$

上式により、温度 ΔT の変化は、 T_2 よりも小さいと推測される。溶質の濃度を重量モル濃度、 m (溶剤 1000 グラム当たりの溶質のモル) で表すことにより、この式をさらに簡単に行うことができる。したがって、この式を次のように書き直すことができる：

$$X_b = m / [m + 1000 / m_a] \quad mM a / 1000$$

[上式中、

M_a は、溶剤の分子量である]。

【0295】

分率 x_b に代えると：

$$\Delta T = [M_3 R T_o^2 / 1000 \Delta H_{fus}] m$$

又は

$$\Delta T = K_f m$$

[式中、 $K_f = M_a R T_o^2 / 1000 \Delta H_{fus}$]。

K_f は、モルの凝固点であり、1 大気圧での水のモル濃度 - 1 単位当たり 1.86 度に等しい。上式を、ガス前駆体充填ベシクルの溶液のモル凝固点を正確に決定するために使用することができる。したがって、凝固点低下を推定し、溶剤凝固温度を適切な値に低下させるために必要な液体又は固体溶質の適切な濃度を決定するために、上式を使用することができる。

【0296】

温度活性化ガス前駆体充填ベシクルを調製するための方法には、次の方法が含まれる：

(a) ガス前駆体及び、例えば、安定化物質、増粘剤及び／又は分散剤を含む前記のような付加的な物質からなる水溶性混合物を渦流及び／又は振盪する。この方法の付加的なバリエーションには、渦流又は振盪前のオートクレーブ処理；ガス前駆体の水性混合物の加熱；混合／懸濁液を含有する容器のガス抜き；ガス前駆体充填ベシクルの振盪又は放置による、ガス前駆体充填ベシクルの懸濁液の自発的な形成及び冷却；及び約 0.22 μm のフィルターを介してのガス前駆体の水性懸濁液の押出しが含まれる。もしくは、約 0.22 μm のフィルターを使用して、ベシクルのインピボ投与の間に、濾過を行うこともできる；

(b) ガス前駆体の水性混合物を、攪拌により乳化させ、加熱して、例えば、患者に投与する前にベシクルを生じさせる、マイクロエマルション化；

(c) 攪拌を伴う、又は伴わない混合物中のガス前駆体の加熱であって、その際、膨張及び容器中の他のベシクルの置換及び空気を放出するための容器のガス抜きにより、溶液の上方に低い密度のガス前駆体充填ベシクルが浮かぶ；及び

(d) 前記のいずれかの方法での、ガス前駆体の水性懸濁液を保持する密閉容器の使用及びガス前駆体の相転移温度未満の温度での懸濁液の維持、さらにそれに続く、場合によって振盪しながら、相転移温度以上に温度を上昇させるためのオートクレーブ処理又はガス前駆体ベシクルの自発的な発生であって、その際、密閉された容器中の膨張したガス前駆体が、容器の圧力を高め、さらに、ガス充填ベシクル懸濁液を冷却し、その後に、振盪を行ってもよい。

【0297】

振盪導入方法の前に、水及び有機物質を除去するために、凍結乾燥が役立つ。ベシクルから水を除去するために、乾燥導入方法を使用することもできる。加温した後に、乾燥させるベシクル中にガス前駆体を予備捕捉 (即ち、乾燥前) することにより、ガス前駆体を膨張させて、ベシクルを充填することができる。ガス前駆体はさらに、真空を適用された後

の乾燥させたベシクルに充填するために使用することもできる。乾燥させたベシクルを、そのゲル状態－液晶温度未満の温度に維持したまま、乾燥室に徐々に、そのガス状態にあるガス前駆体を充填することができる。例えば、ペルフルオロブタンを使用して、4℃（ペルフルオロブタンの沸点）以上の温度で、乾燥ベシクルに充填することができる。

【0298】

温度活性化ガス前駆体充填ベシクルを調製するための好ましい方法は、脂質化合物を有する水溶液を、ガス前駆体の存在下に、ガス前駆体の液体状態－ガス状態相転移温度未満の温度で振盪することを含む。好ましくは、脂質のゲル状態－液晶状態相転移温度未満の温度で、これを行う。次いで、混合物を、ガス前駆体の液体状態－ガス状態相転移温度を上回る温度まで加熱すると、前駆体が揮発して、膨張する。次いで、加熱を中断し、混合物の温度を、ガス前駆体の液体状態－ガス状態相転移温度未満まで低下させる。混合物の振盪は、加熱ステップの間に、又はその後の、混合物を冷却させた後に行うことができる。

10

【0299】

ガス前駆体充填ベシクルを調製するための他の方法は、例えば脂質及びガス前駆体の水溶液を振盪すること及び生じたガス前駆体充填ベシクルを分離することを含む。

【0300】

先行技術の慣用の水性－充填リポソームは通常、それらを作るために使用される脂質の相転移温度以上の温度で生じる。それというのも、これらは、より柔軟で、したがって、液晶状態で生物系で使うことができるためである。例えば、S z o k a 及び P a p a h a d j o p o u l o s , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . 1 9 7 8 , 7 5 , 4 1 9 4 - 4 1 9 8 参照。これに対して、ここに記載の一定の好ましい実施形態に従い製造されたベシクルは、ガス前駆体を充填されていて、これは、より大きな柔軟性を与える。それというのも、ガス形成後のガス前駆体は、水性溶液よりも圧縮性及びコンプライアンスが高いためである。

20

【0301】

本発明で考えられた方法は、脂質を含有する水溶液を、温度活性化可能なガス前駆体の存在下に振盪することを規定している。好ましくは、約30分などの短時間以内に、好ましくは約20分以内に、さらに好ましくは、約10分以内にフォームが生じるような力で、振盪は十分である。振盪は、マイクロエマルジョン化、マイクロ流動化、渦（渦流によるような）、横－横又は上下運動を伴ってよい。液体状態のガス前駆体を加える場合には、前記の振盪方法に加えて、音波処理を使用することもできる。さらに、様々なタイプの運動を組み合わせることもできる。さらに、脂質水溶液を保持する容器を振盪することによるか、又は容器自体を振盪することなく、容器内の水溶液を振盪することにより、振盪を行うことができる。さらに、振盪を手動又は機械で行うことができる。使用することができる機械的振盪装置には例えば、前記のような機械的振盪機が含まれ、E s p e C a p m i x（ドイツ、S e e f e l d、O b e r a y）が好ましい。振盪を生じさせるための他の手段には、高速又は高圧下に生じるガス前駆体の作用も含まれる。

30

【0302】

ここに記載されている方法では、空気などのガスは、局所的な周囲大気により得る。局所的な周囲大気には、密閉された容器内の大気、さらに、外部環境が含まれる。もしくは例えば、ガスを、脂質水溶液を有する容器又は脂質水溶液自体に注入するか、加えて、空気以外のガスを与えることもできる。空気よりも軽いガスは通常、密閉された容器に加えるが、空気よりも重いガスは、密閉された又は、密閉されていない容器に加えることができる。したがって、本発明には、ガス前駆体と共に、空気及び／又は他のガスを同時捕捉することも含まれる。

40

【0303】

したがって、ガス前駆体充填ベシクルは、ホストの組織に適用されて活性化されれば、ここに記載のガス充填ベシクルと実質的に同様に使用することができる。温度又はpHなどのファクターを、ガスの発生を惹起するために使用することができる。ガス前駆体は、ホストの正常体温付近で、液体からガス状態への相転移するので、例えば、ホストのインビボ

50

温度により活性化して、気相へと転移しうるのが好ましい。代わりに、例えば、熱、機械又は光学的手段による I. V. 注入前の活性化を使用することもできる。例えば、ホスト組織が、約 37℃ の正常温度を有するヒト組織であり、ガス前駆体が、37℃ 付近で液体から気相に相転移する場合に、この活性化を行うことができる。

【0304】

前記のように、導入ステップの前に、又は組成物内の温度感受性ガス前駆体の温度による変化前に、これらのプロセスを行う場合には、脂質及び／又はベシクル組成物をオートクレーブ又は滅菌濾過により滅菌することができる。もしくは、安息香酸ナトリウム、4級アンモニウム塩、アジ化ナトリウム、メチルパラベン、プロピルパラベン、ソルビン酸、アスコルビン酸パルミテート、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、二酸化イオウ及び有機水銀塩などの1種又は複数の抗菌剤及び／又は防腐剤が、組成物の処方中に含まれていてよい。安定化されたベシクルを、観血的環境下で、例えば、血管内又は腹腔内で撮像するために使用する際には、放射線などの他の慣用の方法によっても達成することができるこのような滅菌が必要である。滅菌の適切な手段は、本記載を元にすれば、専門家には分かるであろう。

【0305】

アルブミンベシクルなどのタンパク質から処方されたベシクル（タンパク質封入マイクロバブルとも称される）を含有するベシクル組成物を、本記載を得れば、当技術分野の専門家には容易に理解されるであろう様々な方法で調製することができる。適切な方法には、例えば、Feinstein の米国特許第 4572203 号、同第 4718433 号及び同第 4774958 号並びに Cerny et al. の米国特許第 4957656 号に記載されている方法が含まれ、これらの記載をここでは全て、参照して援用する。タンパク質ベースのベシクルの調製に関する前記の特許中に記載されている方法の内には、タンパク質の溶液を音波処理することを含む方法が含まれる。好ましい形態では、出発物質は、熱変性水溶性生体適合性タンパク質の水溶液であってよい。封入タンパク質は好ましくは、熱感受性であるので、音波処理の間の加熱により、部分的に不溶化されうる。適切な熱感受性タンパク質には例えば、アルブミン、ヘモグロビン、コラーゲンなどが含まれる。好ましくは、タンパク質は、ヒトタンパク質であり、ヒト血清アルブミン（HSA）がさらに好ましい。HSA は、滅菌 5% 水溶液として市販されており、これは、タンパク質ベースのベシクルを調製するために使用するために適している。もちろん、当技術分野の専門家には分かるように、他の濃度のアルブミン、さらに熱変性な他のタンパク質を、ベシクルを調製するために使用することができる。一般に、HSA の濃度は変動してよく、約 0.1 から約 25 重量% 及びこの範囲内の全ての組合せ及び二次的組合せの範囲であってよい。タンパク質ベースのベシクルを調製するための一定の方法では、希水溶液の形のタンパク質を使用することが好ましい。アルブミンでは、アルブミン約 0.5 から約 7.5 重量% を含有する水溶液を使用するのが好ましく、約 5 重量% 未満、例えば、約 0.5 から約 3 重量% の濃度が好ましい。

【0306】

タンパク質系ベシクルを、市販の装置を使用して調製することもできる。例えば、Cerny et al. の米国特許第 4957656 号に記載されているような供給調製運転では、Walker Stainless Equipment Co. (New Lisbon, WI) から市販されているステンレス鋼タンク及び Millipore (Bedford, MA) から市販されているプロセスフィルターを使用することができる。

【0307】

音波処理運転では、音波処理容器を通る熱交換器及びフローの両方を連続して利用することができる。このタイプの熱交換装置は、ITT Standard (Buffalo, NY) から得られる。熱交換器は、音波処理プロセスのために運転温度を維持し、温度制御は、媒体の調製に応じて、約 65℃ から約 80℃ である。音波処理装置の振動数は、幅

10

20

30

40

50

広い範囲で、例えば、約5から約40キロヘルツ(kHz)で変動しうるが、市販の音波処理装置の大部分は、約10又は20kHzで運転する。適切な音波処理装置には例えば、S o n i c s & M a t e r i a l s, I n c. (D a n b u r y, C T)により市販されている、フラットチップ音波処理器用ホーンを備えたS o n i c s & M a t e r i a l s V i b r a - C e l lが含まれる。超音波処理器用ホーンに掛ける力は、S o n i c s & M a t e r i a l s V i b r a - C e l l M o d e l V L 1 5 0 0のように、製造者により1から10の段階まである出力設定で変動させることができる。中間の出力設定、例えば5から9を使用することができる。振動数及び供給される力が、超音波処理される液体中にキャビテーションをもたらすのに十分であるのが、望ましい。供給流速は、約50mL/分から約1000mL/分及びこの範囲内の全ての組合せ及び二次的組合せの範囲であってよい。音波処理容器中の滞留時間は、約1秒から約4分間の範囲内であり、ガス流体添加速度は、1分当たり約10立方センチメートル(cc)から約100cc/分、あるいは、供給流速の5%から25%及びこの範囲内の全ての組合せ及び二次的組合せの範囲であってよい。

10

【0308】

溶液の発泡、特に強い発泡が生じるように、音波処理を実施するのが好ましい。一般に、強い発泡及びエアロゾル化は、高い濃度及び安定性を有する造影剤を得るために重要である。発泡を促進するために、音波処理ホーンへの入力を高くして、プロセスを、穏やかな圧力、例えば約1から約5psiの下で運転することができる。溶液の曇りの発生及び生じたフォームにより、発泡は容易に検出することができる。

20

【0309】

タンパク質ベースのベシクルを調製するための適切な方法はさらに、物理的又は化学的に、タンパク質又はタンパク質誘導体を水溶液に変えて、物質を変性又は固定することを含む。例えば、音波処理を介して造影剤を処方した後に、又はその間に、加熱することにより、タンパク質系ベシクルをHSAの5%水溶液から調製することができる。化学的な変性は、タンパク質とグルテルアルデヒド(gluteraldehyde)などの二官能性アルデヒドとを結合することにより、化学的に変性又は固定することを含む。例えば、ベシクルを、タンパク質1グラム当たり50%水性グルテルアルデヒド0.25グラムと、pH4.5で、6時間反応させることができる。未反応のグルテルアルデヒドを次いで、タンパク質から洗浄する。

30

【0310】

本記載を与えられれば、当技術分野の専門家には分かるように、タンパク質ベースのベシクルを調製するための前記の技術のいずれかで、ターゲッティングリガンドを、ベシクルの形成の前に、その間に、又はその後に、タンパク質と共に導入することができる。

【0311】

本記載を得れば、当技術分野の専門家には容易に分かるように、ポリマーから処方されたベシクルを含有するベシクル組成物は、様々なプロセスで調製することができる。代表的なプロセスには例えば、界面重合、相分離及びコアセルベーションマルチオリフィス拡散調製及び溶剤蒸発が含まれる。ポリマーからベシクルを調製するための本記載に従い使用又は変更することができる適切な手順には、Garner et al. の米国特許第4179546号、Garnerの米国特許第3945956号、Cohrs et al. の米国特許第4108806号、日本公開特許公報第62286534号、英国特許第1044680号、Kenaga et al. の米国特許第3293114号、Morehouse et al. の米国特許第3401475号、Waltersの米国特許第3479811号、Walters et al. の米国特許第3488714号、Morehouse et al. の米国特許第3615972号、Baker et al. の米国特許第4549892号、Sands et al. の米国特許第4540629号、Sands et al. の米国特許第4421562号、Sandsの米国特許第4420442号、Mathiowitz et al. の米国特許4898734号、Lenccki et al. の米国特許第4822534号、Herbig et al.

40

50

．米国特許第3732172号、Himmel et al. の米国特許第3594326号、Somerville et al. の米国特許第3015128号、DeasyのMicroencapsulation and Related Drug Processes, Vol. 20, Chs. 9 and 10, pp. 195-240 (Marcel Dekker, Inc., N. Y., 1984)、Chang et al. のCanadian J. of Physiology and Pharmacology, Vol. 44, pp. 115-129 (1966) 及びChang, Science, Vol. 146, pp. 524-525 (1964) に記載されている手順が含まれ、これらそれぞれの記載をここでは全て、参照して援用する。

【0312】

好ましい合成プロトコルでは、例えば、Garner et al. の米国特許第4179546号、Garnerの米国特許第3945956号、Cohrs et al. 米国特許第4108806号、英国特許第1044680号及び日本公開特許公報第62286534号に記載されているプロセスなどの熱膨張プロセスを使用して、ベシクルを調製することができる。通常、そのボイド（キャビティ）中に揮発性液体（ガス前駆体）を含有しうる膨張性ポリマー又はコポリマーのベシクルを調製することにより、この熱膨張プロセスを実施することができる。次いで、このベシクルを加熱して、ベシクルを可塑性し、揮発性液体をガスに変えると、ベシクルは、その本来のサイズの約数倍まで膨張する。熱を除去すると、熱可塑性ポリマーは、その膨張した形の少なくとも若干を維持する。この方法により製造されたベシクルは、特に低い密度を有する傾向があり、したがって好ましい。前記のプロセスは、当技術分野でよく知られており、低密度ベシクルを調製するための熱膨張プロセスとも称される。

【0313】

熱膨張プロセスで 사용할 ことができるポリマーは、当技術分野の専門家には容易に分かり、前記のモノマーの多くからなるポリマー又はコポリマーを含む熱可塑性ポリマー又はコポリマーが含まれる。好ましい前記のポリマー及びコポリマーには、次のコポリマーが含まれる：ポリビニリデンーポリアクリロニトリル、ポリビニリデンーポリアクリロニトリルーポリメチルーメタクリレート及びポリスチレンーポリアクリロニトリル。最も好ましいコポリマーは、ポリビニリデンーポリアクリロニトリルである。

【0314】

熱膨張プロセスで 사용할 ことができる揮発性液体は、当技術分野の専門家にはよく知られており、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、ヘプタンなどの脂肪族炭化水素； CCl_3F 、 CCl_2F_3 、 $CClF_3$ 、 $CClF_2-CCl_2F_2$ 、クロロヘプタフルオロシクロブタン及び1, 2-ジクロロヘキサフルオロシクロブタンなどのクロロフルオロ炭化水素；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及びトリメチルn-プロピルシランなどのテトラアルキルシラン；さらに、前記のペルフルオロ炭化水素を含むペルフルオロ炭化水素が含まれる。通常、揮発性液体は、使用されるポリマー又はコポリマーの溶剤ではないことが重要である。揮発性液体が、該当するポリマー又はコポリマーの軟化点未満である沸点を有することが望ましい。様々な揮発性液体の沸点及び様々なポリマー及びコポリマーの軟化点は、当技術分野の専門家には容易に確認することができ、ポリマー又はコポリマーと揮発性液体との適切な組合せは、専門家には容易に分かるであろう。指針により、さらに当技術分野の専門家には理解されるように、通常、揮発性液体の炭素鎖の長さが長くなると、液体の沸点も高まる。したがって、最終的な加熱及び膨張の前に、過酸化水素の存在下に、水中でベシクルを穏やかに予備加熱して、ベシクルを予備軟化すると、より容易に膨張させることができる。

【0315】

合成ポリマーからなるベシクルを製造するために例えば、1種又は2種の前記文献の方法を変更するか又はそのまま使用して、ビニリデン及びアクリロニトリルを、イソブタン液の媒体中で共重合させて、イソブタンがベシクル内に捕捉されるようにする。次いで、こ

10

20

30

40

50

のようなベシクルを約 80℃から約 120℃の温度に加熱すると、イソブタンガスが膨張して、ベシクルを膨張させる。熱を除去した後に、膨張したポリビニリデン及びアクリロニトリルコポリマーベシクルは、実質的にその膨張した位置に留まる。生じた低密度ベシクルは、乾燥した状態でも、水性媒体中に懸濁されても、極めて安定である。この場合に、イソブタンは単なる例示的な液体として使用したに過ぎず、これらのベシクルの合成及び非常に低密度のベシクルを形成するために使用することができる温度で、加温すると液／ガス転移しうる他の液体で、イソブタンに代えることができることは理解されるであろう。同様に、ビニリデン及びアクリロニトリル以外のモノマーを、ベシクルを調製する際に使用することもできる。

【0316】

一定の好ましい実施形態では、合成ポリマーから処方されていて、本発明の方法で 사용할ことができるベシクルは、Expancel、Novel Industries (Sundsvall、スウェーデン) から市販されていて、EXPANCEL 551 DE (登録商標) ミクロスフェアが含まれる。EXPANCEL 551 DE (登録商標) ミクロスフェアは、その中にイソブタン液体が封入されているビニリデン及びアクリロニトリルのコポリマーからなる。このようなミクロスフェアは、無水組成物として販売されており、ほぼ 50 ミクロンのサイズである。EXPANCEL 551 DE (登録商標) ミクロスフェアは、水密度の 1/50 から 1/20 である 0.02 から 0.05 の比重しか有さない。

10

【0317】

ポリマーベースのベシクルを調製するための前記の技術では、本記載を得れば、当技術分野の専門家には分かるように、ベシクルの形成の前、その間、又はその後に、ターゲッティングリガンドをポリマーと共に導入することができる。

20

【0318】

脂質及び／又はベシクル組成物の調製と同様に、幅広い技術を、脂質処方物を調製するために利用することができる。例えば、脂質及び／又はベシクル処方物を、脂質化合物、生物活性剤及びガス又はガス前駆体からなる混合物から調製することができる。この場合、脂質組成物を、前記のように調製し、その際、この組成物は、生物活性剤も含有する。したがって例えば、ミセルを、生物活性剤の存在下に調製することができる。ガスを含有する脂質組成物では、調製は例えば、脂質化合物及び 1 種又は複数の付加的な材料からなる混合物中で直接、ガスを発泡させることを含む。もしくは、脂質組成物を、脂質化合物及びガス又はガス前駆体から予め生じさせることもできる。後者の場合には、次いで、生物活性剤を、使用前に脂質組成物に加える。例えば、リポソーム及びガスからなる水性混合物を調製し、これに、生物活性剤を加え、攪拌すると、リポソーム処方物が得られる。リポソーム処方物は容易に、単離することができる。それというのも、ガス及び／又は生物活性剤充填リポソームベシクルは通常、水溶液の上方に浮かぶ。過剰な生物活性剤を、残留している水溶液から回収することができる。

30

【0319】

当技術分野の専門家には理解されるように、脂質及び／又はベシクル組成物及び／又は脂質及び／又はベシクル処方物を貯蔵のために凍結乾燥させ、例えば、水性媒体 (滅菌水、リン酸緩衝液又は水性食塩水) で、激しい攪拌により再構成することができる。凍結乾燥の結果としての脂質及び／又はベシクルの凝集又は融合を防ぐために、このような融合又は凝集の発生を防ぐ添加剤を加えることも役立つ。使用することができる添加剤には、ソルビトール、マンニトール、塩化ナトリウム、グルコース、トレハロース、ポリビニルピロリドン及びポリ (エチレングリコール) (PEG)、例えば PEG 400 が含まれる。これらの、及び他の添加剤は、米国薬局方、USP XXII、NF XVII、アメリカ薬局方、The National Formulary, United States Pharmacopeial Convention Inc., 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852 などの文献に記載されており、これらの記載はここで全て、参照して援用する。凍結乾燥された製剤は

40

50

通常、より長い貯蔵寿命という利点を有する。

【0320】

前記のように、ガス及び／又はガス前駆体充填ベシクルを含む本発明の組成物は、例えば、超音波撮像（US）、CT血管造影（CTA）撮像を含むコンピュータ断層撮影（CT）撮像、磁気共鳴（MR）撮像、磁気共鳴造影（MRA）、核医学、光学撮像及びエラストグラフィを含む画像診断のための造影剤として使用することができる。

【0321】

本発明では、患者の1つ又は複数の局部を撮像する方法を提供する。本発明は、患者での疾患組織の存在の有無を診断する方法も提供する。本発明の方法は、造影剤を脂質及び／又はベシクル組成物の形で患者に投与することを含む。患者を、例えば、超音波撮像を含む画像診断を使用して走査して、患者の体内局部の可視映像を得る。この方法は特に、心臓領域、胃腸領域又はリンパ系の映像を得る際に使用することができるが、より幅広く、例えば血管を含む患者の他の内部領域を撮像するために使用することもできる。ここで使用する場合の「胃腸領域」又は「胃腸管」との句には、食道、胃、小腸、大腸及び直腸により規定される患者の局部が含まれる。本発明はさらに、患者の体内局部に生物活性剤を輸送するために使用することもできる。

【0322】

当技術分野の専門家には理解されるように、本発明の脂質及び／又はベシクル組成物の投与は、様々な方法で、即ち、非経口で、経口で、又は腹腔内で実施することができる。好ましい非経口投与には、次の経路での投与が含まれる：静脈内；筋肉内；組織内；動脈内；皮下；眼内；滑液包内；経皮を含む経上皮；吸入を介しての肺内；眼；舌下及び頬側；眼を含む局所；皮膚；眼；直腸及び吸入を介しての鼻吸入。非経口投与の経路のうちでは、静脈内投与が好ましい。投与に有効な用量及び投与の特定の方法は、年齢、体重及び特定の哺乳動物及び走査されるその局部及び使用される特定の造影剤に応じて変動する。通常、用量を比較的低いレベルから開始して、所望のコントラスト強度に達するまで、増やす。脂質組成物の様々な組合せを、粘度、容量オスモル濃度又は嗜好性を含む特性を望ましいように変更するために使用することができる。本発明の撮像方法を実施する際に、造影剤を単独で、又は診断剤、治療剤又は他の薬剤と組み合わせて使用することができる。このような他の薬剤には、着香剤又は着色剤などの付形剤が含まれる。使用されるCT撮像技術は慣用で、例えば、Computed Body Tomography, Lee, J. K. T., Sagel, S. S., and Stanley, R. J. eds., 1983, Ravens Press, New York, N. Y.、特に、“Physical Principles and Instrumentation”, Ter-Pogossian, M. M. 及び “Techniques”, Aronberg, D. J. とのタイトルの初めの2つの章に記載されており、これらの記載をここでは全て、参照して援用する。

【0323】

超音波及びCTなどの診断用途では、超音波エネルギーなどのエネルギーを、少なくとも患者の一部に適用して、ターゲット組織を撮像する。そして、疾患組織の有無が確認できるように、患者の体内局部の可視映像を得る。超音波に関しては、第二調波撮像を含む超音波撮像技術及びゲートド像映（gated imaging）が当技術分野ではよく知られており、例えば、Uhlendorf, “Physics of Ultrasound Contrast Imaging: Scattering in the Linear Range”, IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control, Vol. 14 (1), pp. 70-79 (1994) 及び Sutherland, et al., “Color Doppler Myocardial Imaging: A New Technique for the Assessment of Myocardial Function”, Journal of the American Society of Echocardiography, Vol. 7 (5)

， p p . 4 4 1 - 4 5 8 (1 9 9 4) に記載されており、これらの記載をここでは全て、参照して援用する。

【 0 3 2 4 】

診断目的及び治療目的の両方で、超音波を使用することができる。診断用超音波では、超音波又は超音波のパルス列を、トランスデューサを用いて適用することができる。超音波は通常、連続的であるよりも、パルスとしてであるが、望ましい場合には、連続的であってもよい。したがって、診断用超音波は通常、エコーのパルスを適用し、その後、聴音期間の間に、超音波トランスデューサが、反射信号を受信することを含む。高調波、超高調波又は低調波を使用することができる。二次高調波モードを有利には使用し、この際、 $2x$ の周波数が受信され、ここで、 x は、付随周波数である。これは、バックグラウンド物質からの信号を低減し、所望の部位、例えば血餅をターゲットとしうる本発明のターゲット化造影剤を使用して、トランスデューサからの信号を増幅するために役立つ。奇数調波、例えば、 $3x$ 又は $5x$ などの他の高調波も同様に、この方法を使用して受信される。低調波信号、例えば $x/2$ 及び $x/3$ を受信して、映像を形成するために処理することもできる。

【 0 3 2 5 】

パルス法に加えて、連続的な超音波、例えばパワードップラー (Power Doppler) を適用することもできる。硬質ベシクル、例えば、ポリメチルメタクリレートから処方されたベシクルを使用する場合に、これは特に有用である。この場合、比較的高いエネルギーのパワードップラーは、ベシクルを共振させて、その破裂を促進しうる。これにより、アコースティックエミッションが生じ、これは、低調波又は超高調波範囲であるか、場合によっては、適用された超音波と同じ周波数でありうる。このプロセスで放出されるアコースティックサインのスペクトルが存在し、こうして使用されるトランスデューサはアコースティックエミッションを受信して、例えば、血餅の存在を検出すると考えられる。加えて、例えば血餅分解を促進するために、血餅表面に運動エネルギーを移動させるベシクル破裂のプロセスを使用することもできる。したがって、診断用及び治療用超音波を組み合わせると、治療的な血栓崩壊を達成することができる。スペクトルドップラー (Spectral Doppler) を使用することもできる。通常、ベシクルの破壊を促進し、生物活性剤の放出及び細胞摂取を容易にするためには、診断用超音波からのエネルギーレベルでは不十分である。前記のように、診断用超音波は、1つ又は複数の音波パルスを適用することを含む。パルス間の休止期に、反射された音波信号を受信し、分析することができる。診断用超音波で使用される限られた数のパルスにより、調査されている組織に輸送される実効エネルギーが限られる。

【 0 3 2 6 】

高エネルギー超音波、例えば、治療用超音波装置により発生される超音波により通常、ベシクル種の破壊を惹起することができる。通常、治療用超音波のための装置は、超音波で治療される組織の面積に応じて、約10から約100%のデューティサイクルを使用する。大部分の筋肉部分により通常は特徴付けられる体の領域、例えば、背中及び大腿、さらに、心臓組織などのかなり血管化された組織は、より大きなデューティサイクル、例えば約100%までを必要とする。

【 0 3 2 7 】

治療用超音波では、連続的な超音波を使用して、より高いエネルギーレベルを輸送する。ベシクルを破壊するためには、連続的な超音波が好ましいが、音波エネルギーは、パルスであってもよい。パルス音波エネルギーを使用する場合、音波は通常、1回に約8から約20又はそれ以上のパルスのエコー列長さのパルスである。好ましくは、エコー列長さは、1回に約20パルスである。加えて、使用される音波の周波数は、約0.025から約100メガヘルツ (MHz) で変動する。通常、治療用超音波での周波数は、約0.75から約3 MHz の範囲であり、約1から約2 MHz が、さらに好ましい。加えて、エネルギーレベルは、1立方センチメートル (cm^2) 当たり約0.5ワット (W) から約5.0 W / cm^2 であってよく、約0.5から約2.5 W / cm^2 のエネルギーレベルが好ま

しい。過高熱を伴う治療用超音波でのエネルギーレベルは通常、約 $5 \text{ W} / \text{cm}^2$ から約 $50 \text{ W} / \text{cm}^2$ である。非常に小さいベシクル、例えば、約 $0.5 \mu\text{m}$ 未満の直径を有するベシクルでは、より高い音波周波数が通常は、好ましい。これは、より小さいベシクルは、より高い音波周波数で、より有効に音波エネルギーを吸収しうするためである。非常に高い、例えば、約 10 MHz を上回る周波数を使用する場合、音波エネルギーは通常、流体及び組織を透過して、限られた深さにのみ到達する。したがって、音波エネルギーの外部適用は、皮膚及び他の表面組織に適している。しかしながら、深部構造では、超音波エネルギーを集中させて、焦点帯域内が優先的に対象となるようにすることが、通常は必要である。もしくは、超音波エネルギーを、介在プローブ、血管内超音波カテーテル又は管腔内 (endoluminal) カテーテルを介して適用することができる。例えば、食道ガンの診断及び／又は治療のために食道で、このようなプローブ又はカテーテルを使用することができる。前記の治療での使用に加えて、本組成物を食道ガンで、又はアテローム硬化の治療のために冠動脈で、さらに例えば、米国特許第 5149319 号 (この記載をここでは全て、参照して援用する) に記載されているような治療用途に、使用することができる。

10

【0328】

2つの超音波周波数を利用する治療用超音波装置を、使用することができる。第1の周波数は、 x であってよく、第2の周波数は、 $2x$ であってよい。好ましい形態では、第1及び第2周波数の焦点帯域が、単一の焦点帯域に集中するように、この装置は設計される。この場合、装置の焦点帯域は、ターゲット化組織内のターゲット化組成物、例えば、ターゲット化ベシクル組成物を対象とする。この超音波装置は、超音波エネルギーの x 及び $2x$ 周波数の同時適用を用いて、第2の調波治療 (harmonic therapy) をもたらしう。ベシクルを伴う超音波の場合には、第2の調波治療は、単一の周波数を伴う超音波エネルギーに比べて、改善されたベシクル破壊をもたらすと考えられる。また、好ましい周波数範囲は、ベシクルの基本調波内であると考えられる。より低いエネルギーを、このデバイスで使用することもできる。前記の第2の調波治療で使用する超音波装置は、例えば、Kawabata, K. et al., Ultrasonic Sonochemistry, Vol. 3, pp. 1-5 (1996) に記載されており、この記載をここでは全て、参照して援用する。

20

【0329】

望ましい安定化ベシクルレベルを生じさせるために必要な脂質の濃度は、使用される脂質のタイプに依存して変動し、慣用の実験により容易に決定することができる。例えば、好ましい実施形態では、本発明の方法により安定化されたベシクルを生じさせるために使用される $1, 2$ -ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) の濃度は、生理食塩水溶液中、約 $0.1 \text{ mg} / \text{ml}$ から約 $30 \text{ mg} / \text{ml}$ 、さらに好ましくは、生理食塩水溶液中、約 $0.5 \text{ mg} / \text{ml}$ から約 $20 \text{ mg} / \text{ml}$ 、最も好ましくは、生理食塩水溶液中、約 $1 \text{ mg} / \text{ml}$ から約 $10 \text{ mg} / \text{ml}$ である。好ましい実施形態で使用されるジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC) は、生理食塩水溶液中、約 $0.1 \text{ mg} / \text{ml}$ から約 $30 \text{ mg} / \text{ml}$ 、さらに好ましくは、生理食塩水溶液中、約 $0.5 \text{ mg} / \text{ml}$ から約 $20 \text{ mg} / \text{ml}$ 、最も好ましくは、生理食塩水溶液中、約 $1 \text{ mg} / \text{ml}$ から約 $10 \text{ mg} / \text{ml}$ である。患者に投与される組成物の量は、変動しう。通常、 1 V 用量は、 70 kg の患者で約 10 mL 未満であり、より低い用量が好ましい。

30

40

【0330】

前記の方法に加えて、ターゲット化造影剤を調製する他の実施形態は、少なくとも1種の生体適合性脂質及びガス前駆体を組合せ；ガス充填ベシクルが生じるまで攪拌し；ターゲットティングリガンドを前記のガス充填ベシクルに添加して、ターゲットティングリガンドが、共有結合又は非共有結合により前記のガス充填ベシクルに結合するようにし；ガス充填ベシクル及びターゲットティングリガンドを含有する造影剤が生じるまで、攪拌することを含む。ターゲットティングリガンドを添加する前に、ガス充填ベシクルが生じるまで攪拌する代わりに、ガス前駆体は、使用の時点まで、ガス前駆体のままでもよい。即ち、ガス前

50

駆体を使用して、造影剤を調製し、インビボで、例えば温度により、前駆体を活性化する。

【0331】

もしくは、内皮細胞をターゲットとする造影剤を調製する方法は、少なくとも1種の生体適合性脂質及びターゲッティングリガンドを組み合わせて、ターゲッティングリガンドが、共有結合又は非共有結合により前記の脂質に結合するようにし、ガス前駆体を添加し、ガス充填ベシクル及びターゲッティングリガンドを含む造影剤が生じるまで攪拌することを含む。加えて、ガス前駆体を加え、使用する時点まで、ガス前駆体のままにすることもできる。即ち、ガス前駆体を使用して、ガス前駆体充填ベシクル及びターゲッティングリガンドを有する造影剤を調製して、これをインビボで使用することもできる。

10

【0332】

もしくは、ガス前駆体を利用して、使用前に予め予備形成されている、ターゲッティングリガンドを有する安定なガス充填ベシクルを作ることにもできる。この実施形態では、ガス前駆体及びターゲッティングリガンドを、懸濁及び／又は安定化媒体を有する容器に、それぞれのガス前駆体の液-気相転移温度未満の温度で加える。次いで、この温度を超えて、エマルションがガス前駆体と溶液との間に生じると、ガス前駆体は、液体からガス状態へと転移する。加熱及びガス形成の結果、ガスが、気体懸濁液上のヘッドスペースの空気に代わり、ガス前駆体のガス、周囲ガス、例えば空気を捕捉しているか、ガス状態のガス前駆体及び周囲空気を同時捕捉しているガス充填脂質球体が生じる。造影剤の最適な混合及び安定化のために、相転移を使用することもできる。例えば、ガス前駆体、ペルフルオロブタンは、生体適合性脂質又は他の安定化物質に捕捉されて、温度が上がり、4℃（ペルフルオロブタンの沸点）を上回ると、フルオロブタンガスを捕捉している安定化化合物が生じる。付加的な例として、ガス前駆体フルオロブタンを、グリセロール又はプロピレングリコールなどの乳化剤及び安定化剤を含有する水性懸濁液に懸濁させて、市販の渦流装置（vortexer）で渦流させることができる。渦流は、ガス前駆体が液体であるように十分に低い温度で開始し、試料の温度が、液体状態から気体状態へと相転移温度を過ぎて上昇するように継続する。このようにすると、ミクロエマルション化プロセスの間に、前駆体は、ガス状態に変わる。適切な安定化剤が存在すると、意外にも、安定なガス充填ベシクル及びターゲッティングリガンドが生じる。

20

【0333】

したがって、インビボでガス充填ベシクルが生じるように、ガス前駆体を選択することもできるが、その場で、製造プロセスの間に、貯蔵の際に、又は使用の直前にガス充填ベシクルが生じるように設計することもできる。

30

【0334】

出発物質として使用される脂質、タンパク質、ポリマー及び他の安定化化合物又はベシクル最終生成物は、本発明により考えられた方法に使用する前に、又はその後に、処理することができることは、本記載を与えられれば、当技術分野の専門家には理解されるであろう。例えば、生体適合性脂質などの安定化化合物を水和させ、次いで凍結乾燥させるか、凍結-融解サイクルで処理するか、又は単に水和させることができる。好ましい実施形態では、ガス前駆体充填ベシクルを生じさせる前に、脂質を、水和させ、次いで凍結乾燥するか、水和させ、次いで、凍結-融解サイクルにより処理し、次いで、凍結乾燥させる。

40

【0335】

本発明により考えられた方法では、空気に限らないが空気などのガスの存在が、局所周圍大気によりもたらされうる。局所周圍雰囲気は、密閉された容器内又は密閉されていない容器中の大気であり、外部環境であってもよい。もしくは例えば、ガスを、脂質水溶液を有する容器又は脂質水溶液自体に、注入するか、加えて、空気以外のガスを与えることもできる。空気よりも重くないガスは通常、密閉された容器に加えるが、空気よりも重いガスは、密閉された又は、密閉されていない容器に加えることができる。したがって、本発明には、ガス前駆体と共に、空気及び／又は他のガスを同時捕捉することも含まれる。

【0336】

50

安定化化合物を論じている欄で既に前記したように、本発明により考えられた好ましい方法は、使用される脂質のゲル状態－液晶状態相転移温度未満の温度で実施する。「ゲル状態－液晶状態相転移温度」とは、脂質二分子膜が、ゲル状態から液晶状態へと変わる温度を意味している。例えば、Chapman et al., J. Biol. Chem. 1974, 249, 2512－2521 参照。

【0337】

したがって、前記の安定化されたベシクル前駆体は、ホストの組織に適用されて活性化すると、本発明で使用される他の安定化ベシクルと同様に使用することができ、その際、ガスの発生をもたらすために温度又はpHなどのファクターが使用される。この実施形態は、ガス前駆体が前記のホストの正常な体温付近で液体からガス状態へと相転移し、したがって、前記のホスト組織の温度により活性化されて、気相へと転移しうる実施形態であることが好ましい。さらに好ましくは、この方法は、ホスト組織が、約37℃の正常な温度を有するヒト組織であり、ガス前駆体が37℃付近で液体からガス状態へと相転移する方法である。

10

【0338】

オートクレーブ又は滅菌濾過のプロセスを、ガス導入ステップの前、又は懸濁液中での温度感受性ガス前駆体の温度仲介ガス変化の前に行う場合には、本発明で使用される安定化されたガス充填ベシクルの調製に関する前記の実施形態全てを、オートクレーブ又は滅菌濾過により滅菌することができる。もしくは、安息香酸ナトリウム、全ての4級アンモニウム塩、アジ化ナトリウム、メチルパラベン、プロピルパラベン、ソルビン酸、アスコルビン酸パルミテート、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、二酸化イオウ及び有機水銀塩などの1種又は複数の抗菌剤及び／又は防腐剤が、造影剤の処方中に含まれていてよい。安定化されたミクロスフェアを、観血的環境下で、例えば、血管内又は腹腔内で撮像するために使用する際には、放射線などの他の慣用の方法によっても達成することができるこのような滅菌が必要である。安定化されたガス充填ベシクル及びその使用の本記載を教示されれば、滅菌の適切な手段は、専門家には分かるであろう。造影剤は通常、水性懸濁液として貯蔵するが、乾燥ベシクル又は乾燥脂質球体の場合には、造影剤を、使用前に再構成することができる乾燥粉末として貯蔵することもできる。

20

30

【0339】

本発明の新規の組成物、特にベシクル組成物は、画像診断での造影剤として使用することができ、さらに、画像診断が使用される全ての分野で使用するためにも適している。しかしながら、安定化ベシクルは特に、灌流撮像のために使用することができる。

【0340】

画像診断は、患者の内部体局部を可視化するための手段である。画像診断には例えば、超音波(US)、磁気共鳴撮像(MRI)、核磁気共鳴(NMR)、コンピュータ断層撮影(CT)、電子スピン共鳴(ESR)；造影剤が放射性物質を含む場合には、核医学；及び、特に蛍光造影剤を用いる光学撮像が含まれる。画像診断はさらに、本発明の方法を介してベシクルの破裂を促進することも含む。例えば、超音波を使用して、ベシクルを可視化し、特定の組織中のベシクルの位置を確認することもできる。加えて、ベシクルが、組織及び／又は受容体目的地を含む所定のターゲットに到達したら、超音波を使用して、ベシクルの破裂を促進し、生物活性剤及び／又は診断剤を放出させることもできる。

40

【0341】

本発明では、通常は、患者を撮像するか、かつ／又は特に、患者で疾患組織の存在を診断する方法も提供する。本発明の造影剤を患者に投与し、次いで、例えば超音波、コンピュータ断層撮影及び／又は磁気共鳴撮像を使用して、患者を走査して、患者の体内局部及び／又はその局部の疾患組織の可視映像を得ることにより、本発明の撮像プロセスを実施することができる。患者の局部とは、患者の全身又は患者の特定の局部又は部分を意味している。造影剤は特に、心筋、内皮及び／又は上皮組織、さらに、胃腸及び心臓血管局部な

50

どの組織の映像を得るために使用することができるが、より広範囲に、例えば、当技術分野の専門家には容易に理解されるように、血管系又は他の方法で撮像する際に使用することもできる。ここで使用される場合、心臓血管との句は、心臓並びに直接に心臓に、及び心臓から通じる血管系により規定される患者の局部を示している。ここで使用される場合、血管系との句は、体内、又は体の臓器又は一部内の血管（動脈、静脈など）を示している。患者は、どのタイプの哺乳類であってもよいが、ヒトが、最も好ましい。

【0342】

本発明はさらに、疾患組織の存在を診断する方法を提供する。疾患組織には例えば、疾患組織を支持する血管系から生じる内皮組織が含まれる。結果として、正常な環境下では、内皮組織とは関連していない患者の局部に、内皮組織が位置付けられ局在し、可視化されることは、局部中の疾患組織の指標となる。

【0343】

本発明の磁気共鳴撮像法を実施する際に、造影剤を単独で、又は他の診断剤、治療剤又は他の薬剤と組み合わせて使用することができる。このような他の薬剤には、着色剤又は着色剤などの付形剤が含まれる。使用される磁気共鳴撮像技術は慣用で、例えば、D. M. Kean and M. A. Smith, Magnetic Resonance Imaging: Principles and Applications, (William and Wilkins, Baltimore 1986)に記載されている。考えられるMRI技術には、これらに限らないが、核磁気共鳴（NMR）及び電子スピン共鳴（ESR）が含まれる。好ましい撮像の種類は、NMRである。

【0344】

本発明の造影剤を評価する際に使用することができる代表的な方法を、図面に示されているシステムを参照して下記で検討する。同じ数字は、同じ要素を示しているこの図面では、図1は、本発明の実施形態による造影剤をインビトロ評価するためのシステム10の図面表示である。この好ましい実施形態では、システム10は、本発明による造影剤の有効性を評価するための装置12を含む。装置12は、好ましくは2%寒天などの寒天からなるブロック14を含む。寒天oscは、例えばBoehringer Mannheim (Indianapolis, IN)から市販されており、通常の専門家によく知られている技術を使用して調製されたブロックであってよい。装置12はさらに、ブロック14を貫通している、例えばポリエチレン管などの管16を含む。ナイロン糸などの糸18を、管16に通すが、これには、ブロック12を貫通する管16の一部中で、糸18に固定されている木綿パイピング材料などの吸収材料22を介して血餅20が付着している。超音波プローブ24を、ブロック14に近接させる。

【0345】

造影剤を、図10のシステム10を使用して、次の手順により評価することができる。生理食塩水などの液体媒体を、ぜん動ポンプ（図示せず）を使用して望ましい流速で、管16にポンプ導入する。造影剤を、血餅20の循環溶液の上流に注入し、プローブ24からの超音波信号の対象を、血餅20付近の領域とする。撮像を連続的に行い、注入された造影剤の超音波強度を、血餅20の近接領域で測定する。

【0346】

本発明をさらに、次の実施例で詳述する。実施例1から8、13から15、20から22、27、28、42、43から45及び47、48、60及び61は、実際の実施例であり、実施例9から12、16から19、23から26、29から41及び49から59は、推測による実施例である。実施例46は（部分的に）実際の、及び（部分的に）推測の両方である。実施例は、説明の目的のためのものであり、本発明の範囲を制限することを意図するものではない。

【0347】

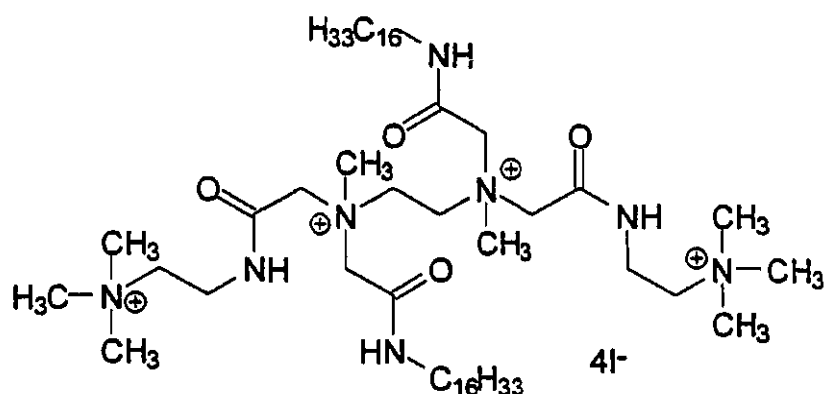
（実施例）

実施例1

本実施例は、次式を有する四ヨウ化N，N'-ビス（ヘキサデシルアミノカルボニルメチ

レン) - (β-N, N, N-トリメチルアンモニウムエチルアミノカルボニルメチレン) - N, N'-ジメチル-N, N'-エチレンジアミン (四ヨウ化 EDTA-HA-TMA) の調製を対象としている。

【化 2 5】

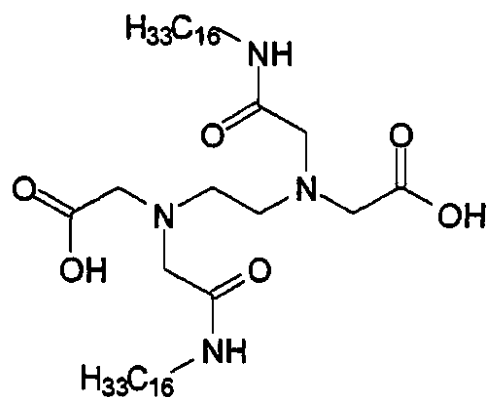


10

【0348】

A. N, N'-ビス(ヘキサデシルアミノカルボニルメチレン)-エチレンジアミン-N, N'-二酢酸 (EDTA-HA) の調製。

【化 2 6】



20

30

無水メタノール (30 mL) 中のエチレンジアミン四酢酸二無水物 (2.56 g、0.01 モル) 及び無水メタノール (60 mL) 中のヘキサデシルアミン (4.82 g、0.02 モル) を混合し、50℃で6時間攪拌した。生じた白色の固体を濾過により分離し、室温で、真空乾燥させると、EDTA-HA 3.43 g (64%) が得られた。

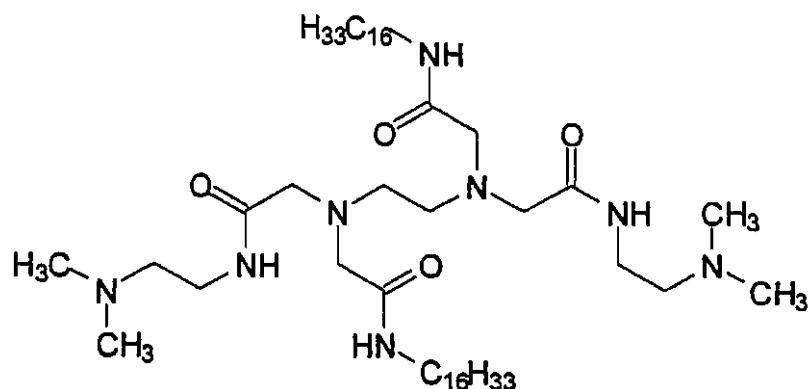
IR: OHで3320 cm⁻¹、C=O (カルボニル) で1670 cm⁻¹。

【0349】

B. N, N'-ビス(ヘキサデシルアミノカルボニルメチレン)-N, N'-β-N, N'-ジメチルアミノ-エチルアミノカルボニルメチレン)エチレンジアミン (EDTA-HA-DMA) の調製

40

【化 2 7】



10

ステップAからのEDTA-HA (3.69 g、0.005 mol)、N,N-ジメチルエチレンジアミン (0.88 g、0.01 mol) 及びCHCl₃ (100 mL) からなる冷溶液 (5℃) に、DCC (2.227 g、0.011 mol) のCHCl₃ (20 mL) 溶液を滴加した。生じたエマルジョンを、室温で約24時間攪拌し、濾過した。0.5%酢酸 (100 mL) で、濾液を洗浄して、過剰なDCCを分解した。2層に分離している乳白色の溶液が観察された。下部有機相を一晩乾燥させ (Na₂SO₄)、真空濃縮すると、EDTA-HA-DMA 3.81 g が軟らかい固体として得られた。

IR: 3280 cm⁻¹、2900 cm⁻¹、1640 cm⁻¹、1530 cm⁻¹。

【0350】

20

C. 四ヨウ化EDTA-HA-TMAの調製

ステップBからのEDTA-HA-DMA (4.22 g、4.77 mol)、ヨードメタン (3.41 g、24 mmol) 及びエタノール (30 mL) を混合し、2時間還流させた。反応混合物を濃縮し、残留物を一晩凍結乾燥させた。表題生成物 4.98 g (四ヨウ化EDTA-HA-TMA) が黄色の固体として得られた。

IR: 3260 cm⁻¹、1650 cm⁻¹。

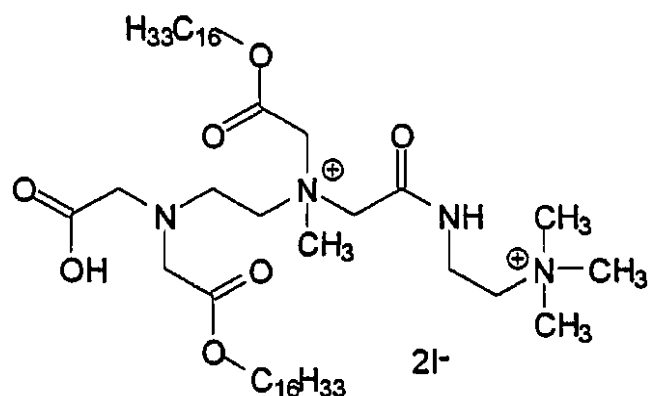
【0351】

実施例2

この実施例は、次式を有する二ヨウ化N,N'-ビス(ヘキサデシルオキシカルボニルメチレン)-N-(β-N,N,N-トリメチルアンモニウムエチルアミノカルボニルメチレン)-N-メチル-N'-(カルボキシメチレン)エチレンジアミン(二ヨウ化EDTA-HA-L-DMA)の調製を対象としている。

30

【化28】

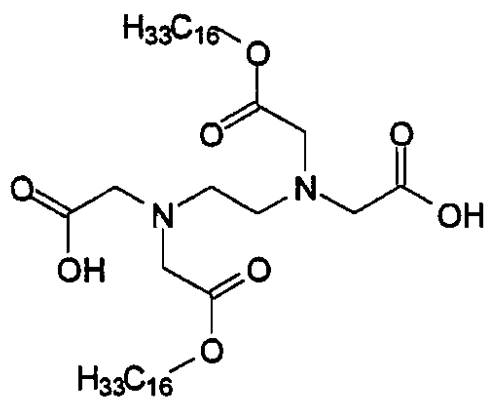


40

【0352】

A. N,N'-ビス-(ヘキサデシルオキシカルボニルメチレン)-エチレンジアミン-N,N'-二酢酸(EDTA-HA-L)の調製

【化29】



10

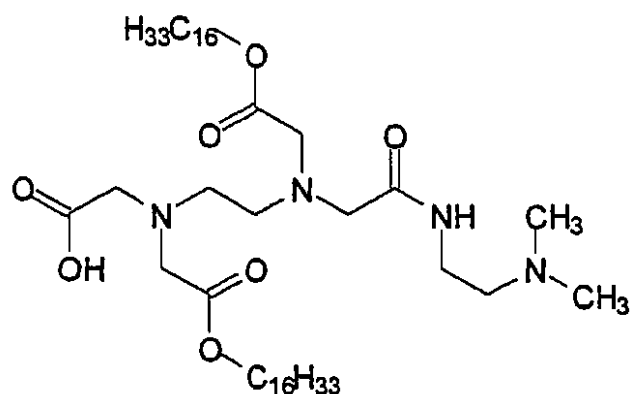
ヘキサデシルアルコール（4.84 g、0.02 モル）、無水ジメチルホルムアミド（20 mL）、無水トリエチルアミン（3.3 g）及びエチレンジアミンテトラ酢酸二無水物（2.56 g、0.01 モル）を混合し、50℃で2時間攪拌した。反応混合物を冷水（200 mL）に注ぎ、生じた水性混合物をHClで酸性化した。生じた白色沈殿物を濾過により分離し、濾過ケーキを水で洗浄した。エタノールから白色の固体を再結晶させると、EDTA-HAL 7 g が得られた。融点103℃。

【0353】

B. N, N'-ビス（ヘキサデシルオキシカルボニルメチレン）-N-（β-N-ジメチルアミノエチルアミノカルボニル）-N'-酢酸（EDTA-HAL-DMA）の調製

20

【化30】



30

ステップAからのEDTA-HAL（3.70 g、0.005 モル）、N, N-ジメチルエチレンジアミン（1.598 g、0.0175 モル）及びCHCl₃（100 mL）からなる冷溶液（5℃）に、（DCC）（3.60 g、0.0175 モル）のCHCl₃（20 mL）溶液を滴加した。沈殿物が生じ、反応混合物を室温で約24時間攪拌した。反応混合物を濾過し、濾液を0.5%酢酸（100 mL）で洗浄して、過剰のDCCを分解した。2層に分離している乳白色の溶液が生じた。底部の有機相を乾燥させ、真空濃縮すると、EDTA-HAL-DMA 3.85 g が粘性液体として得られた。

40

【0354】

C. ニヨウ化EDTA-HAL-DMAの調製

ステップBからのEDTA-HAL-DMA（2.36 g、0.0027 モル）、ヨードメタン（3.81 g）及びエタノール（50 mL）を混合し、2時間還流させた。溶液を真空濃縮し、生じた残留物を一晚凍結乾燥させた。表題化合物（ニヨウ化EDTA-HAL-DMA）2.96 g が、黄色がかった固体として得られた。

【0355】

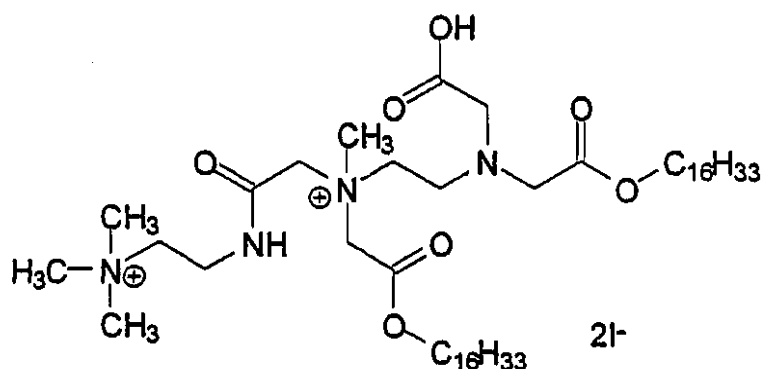
実施例3

この実施例は、次式を有するニヨウ化N, N'-ビス（ヘキサデシルオキシカルボニルメチレン）-N-（β-N, N, N-トリメチルアンモニウムエチルアミノカルボニルメチ

50

レン) -N-メチル-N'-(カルボキシメチレン)エチレンジアミン(二ヨウ化EDTA-HA-DMA)の調製を対象としている。

【化31】

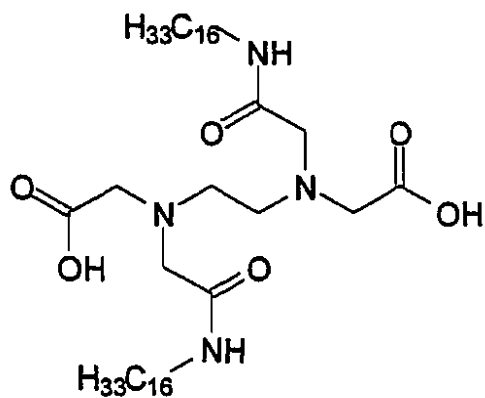


10

【0356】

A. N, N'-ビス(ヘキサデシルアミノカルボニルメチレン)-エチレンジアミン-N, N'-二酢酸(EDTA-HA)の調製

【化32】



20

30

無水メタノール(60 mL)中のヘキサデシルアミン(4.82 g、0.02 モル)を、エチレンジアミンテトラ酢酸二無水物(2.56 g、0.01 モル)の無水メタノール(30 mL)懸濁液に加えた。混合物を50℃で6時間攪拌した。生じた白色の固体沈殿物を濾過により分離し、室温で真空乾燥させると、EDTA-HA 3.43 g(64%)が得られる、融点156~158℃。

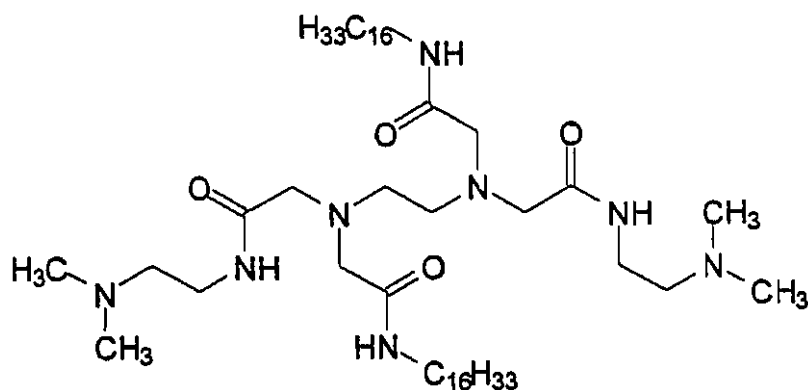
IR: OHで3320 cm^{-1} ; -C(=O)-で1670 cm^{-1} 。

【0357】

B. N, N'-ビス(ヘキサデシルアミノカルボニルメチレン)-N, N'-ビス(β-N, N-ジメチルアミノエチルアミノカルボニルメチレン)エチレンジアミン(EDTA-HA-DMA)の調製

40

【化33】



10

ステップAからのEDTA-HA (3.69 g、0.005モル)、N,N-ジメチルエチレンジアミン (0.88 g、0.01モル) 及びCHCl₃ (100 mL) からなる冷溶液 (5℃) に、1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) (2.227 g、0.011モル) のCHCl₃ (20 mL) 溶液を滴加した。沈殿物が観察され、反応混合物を室温で約24時間攪拌した。反応混合物を濾過し、濾液を0.5%酢酸 (100 mL) で洗浄して、過剰のDCCを分解した。2層に分離している乳白色の溶液が生じた。底部有機層を乾燥させ (Na₂SO₄)、真空濃縮させると、EDTA-HA-DMA 3.81 gが白色の固体として得られた。

20

IR: 3280 cm⁻¹; 2900 cm⁻¹; 1640 cm⁻¹; 1530 cm⁻¹。

【0358】

C. ニヨウ化EDTA-HA-DMAの調製

ステップBからのEDTA-HA-DMA (4.2 g、4.77モル)、ヨードメタン (3.41 g、24 mmol) 及びエタノール (30 mL) からなる溶液を2時間還流させた。エタノール溶液を真空濃縮し、生じた残留物を一晩凍結乾燥させた。表題化合物 (ニヨウ化EDTA-HA-DMA) 3.98 gが黄色の固体として得られた。

IR: 3260 cm⁻¹; 1650 cm⁻¹。

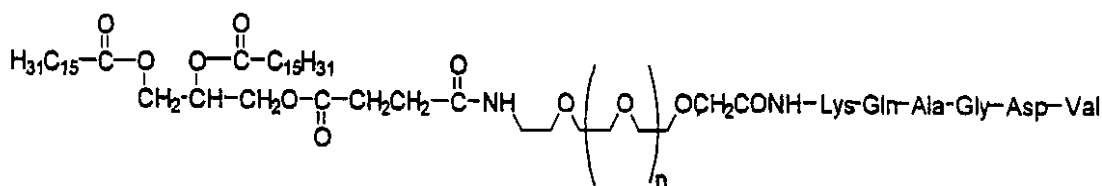
【0359】

実施例4

30

この実施例は、次式を有するDPGS-PEG-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Valの調製を対象とする。

【化34】

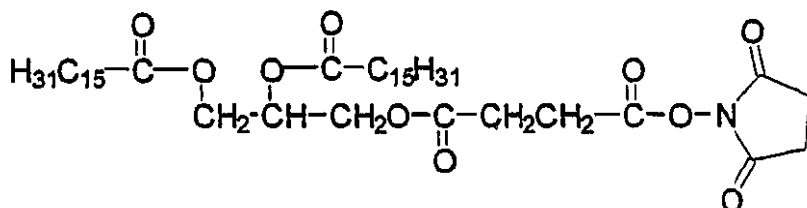


【0360】

40

A. N-(1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-スクシニル)-スクシンイミドの調製 (N-DPGS-スクシンイミド)

【化35】



50

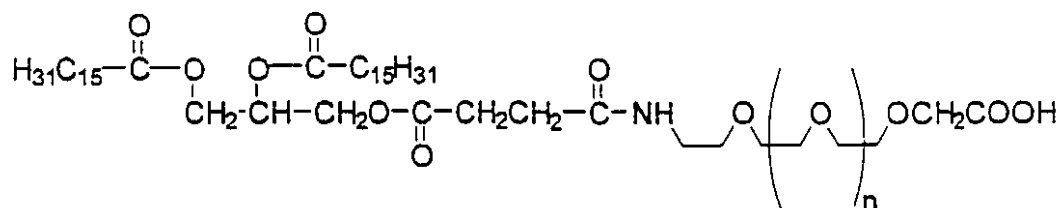
DCC (20.6 mg) 及びアセトニトリル (10 mL) からなる冷溶液 (0 から 5 °C) に、sn-グリセロ-3-コハク酸 1, 2-ジパルミトイル (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) (66.8 mg)、N-ヒドロキシスクシンイミド (11.5 mg)、ジメチルアミノピリジン (DMA P) (2 mg) 及びアセトニトリル (40 mL) からなる溶液を滴加した。反応混合物を 5 時間攪拌し、生じた固体を濾過により除去した。濾液を真空濃縮すると、N-DPGS-スクシンイミド 78 mg が白色の生成物として生じた。

【0361】

B. 3-ω-カルボキシーポリエチレングリコールイミノスクシネート-1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロール (DPGS-ω-カルボキシーPEG) の調製

10

【化36】



ω-アミノ-ω'-カルボキシーポリエチレングリコール (Shearwater Polymers, Huntsville, AL) (0.3 g) 及びトリエチルアミン (40 mg) からなる冷 CHCl_3 (20 mL) 溶液 (0 から 5 °C) に、ステップ A からの N-DPGS-スクシンイミド (78 mg) の CHCl_3 (10 mL) 溶液を滴加した。生じた溶液を 10 °C で約 5 時間攪拌し、一晚放置した。反応混合物を、氷水に注ぎ、10% HCl を用いて 3 未満の pH まで中和した。有機層を単離し、水で洗浄し、乾燥させた (NaSO_4)。濾過し、真空濃縮すると、DPGS-ω-カルボキシーPEG 0.34 g が白色の固体として得られた。

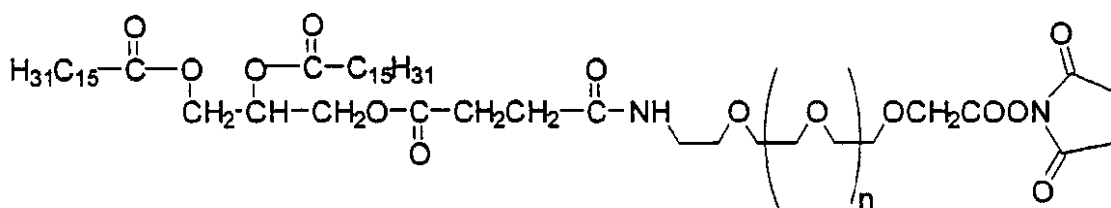
20

【0362】

C. 3-スクシナモイルオキシカルボニル-ポリエチレングリコールイミノスクシネート-1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロール (DPGS-ω-カルボキシーPEG-スクシンイミド) の調製

30

【化37】



DCC (12 mg) の冷アセトニトリル (10 mL) 溶液 (0 から 5 °C) に、ステップ B からの DPGS-ω-カルボキシーPEG (200 mg)、N-ヒドロキシスクシンイミド (6 mg) 及びジメチルアミノピリジン (2 mg) からなる溶液を加えた。生じた反応混合物を 5 時間攪拌した。生じた白色の固体を濾過により反応混合物から除去し、濾液を真空濃縮した。DPGS-ω-カルボキシーPEG-スクシンイミドが白色の固体 (200 mg) として得られた。

40

【0363】

D. DPGS-PEG-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val 複合体の調製
Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val (5 mg) の冷 pH 8.5 緩衝液 (20 mL) 溶液 (0 から 5 °C) に、ステップ C からの DPGS-ω-カルボキシーPEG-スクシンイミド (40 mg) のアセトニトリル (0.1 mL) 溶液を滴加した。生じた反応混合物を室温で約 48 時間攪拌した。反応混合物を真空濃縮し、約 1000 の分画分子

50

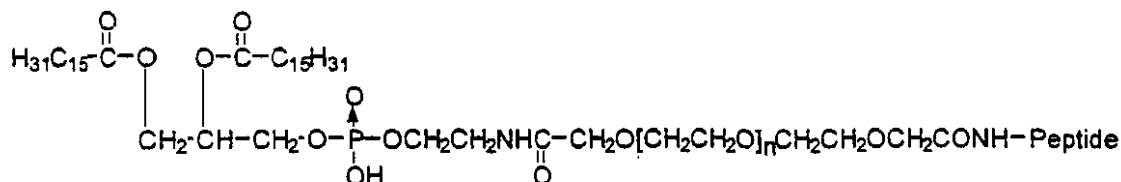
量を有する膜を介して、無機塩を透析した。表題化合物（D P G S - P E G - L y s - G l n - A l a - G l y - A s p - V a l）が白色の固体（24 mg）として得られた。

【0364】

実施例5

この実施例は、次式を有するD P P E - P E G - L y s - G l n - A l a - G l y - A s p - V a l）の調製を対象とする。

【化38】



10

[上式中、「Peptide」は、

【化39】



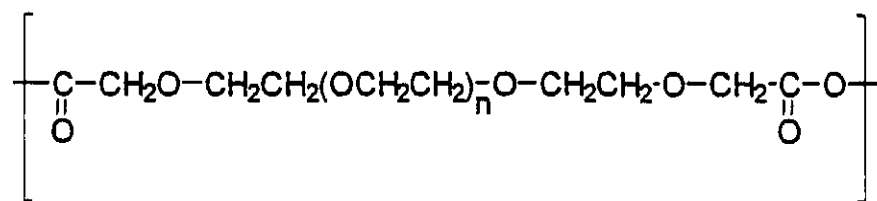
である]

【0365】

A. ω , ω' -ジメチレンカルボキシーポリエチレングリコール無水物の調製

20

【化40】



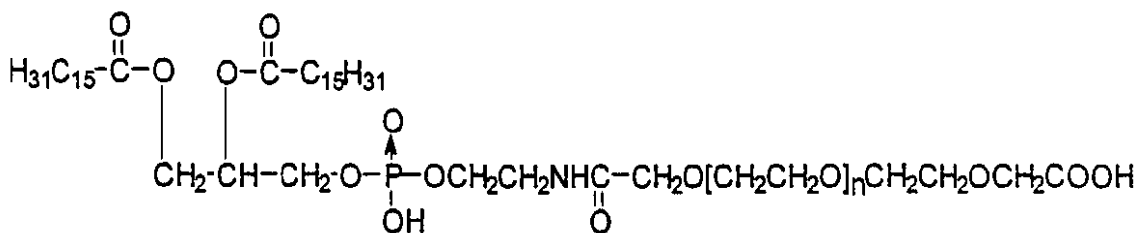
イソシアン酸クロルスルホニル（14.2 mg）の冷 CHCl_3 （5 mL）溶液（0から5℃）に、 ω , ω' -ジメチレンカルボキシーポリエチレングリコール（0.34 g）及びトリエチルアミン（20 mg）からなる CHCl_3 （20 mL）溶液を加えた。反応混合物を一晩攪拌し、氷水に注いだ。有機層を単離し、乾燥させた（ NaSO_4 ）。有機層を濾過し、真空濃縮すると、表題の無水化合物が白色の固体（0.2 g）として得られた。

30

【0366】

B. 1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン-N-カルボニルメチレン- ω' -カルボキシーポリエチレングリコール（D P P E - ω -カルボキシーPEG）の調製

【化41】



40

ステップAからの無水化合物（0.3 g）の冷 CH_2Cl_2 （10 mL）溶液（0から10℃）に、D P P E（0.07 g）及びトリエチルアミン（0.05 g）からなる CH_2Cl_2 （15 mL）溶液を加えた。生じた反応混合物を一晩攪拌し、氷水に注ぎ、10% HCl を用いてpH 3未満に中和した。有機層を単離し、乾燥させた（ NaSO_4 ）。有

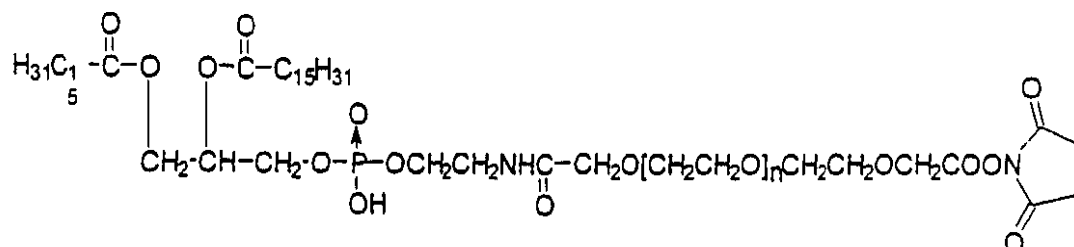
50

機層を濾過し、真空濃縮すると、D P P E- ω -カルボキシ-PEG 0.45 gが暗い白色の固体として得られた。

【0367】

C. 1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン-N-カルボニルメチレン-ポリエチレングリコール-スクシンイミド (D P P E- ω -カルボキシ-PEG-スクシンイミド) の調製

【化42】



10

DCC (3 mg) の冷アセトニトリル (2 mL) 溶液 (0 から 5 °C) に、ステップ B からの D P P E- ω -カルボキシ-PEG (60 mg)、N-ヒドロキシースクシンイミド (1.8 mg) 及びジメチルアミノピリジン (0.2 g) からなるアセトニトリル (6 mL) 溶液を加えた。生じた混合物を 0 から 5 °C で 3 時間攪拌し、次いで、室温で一晩攪拌した。生じた固体を、濾過により除去し、濾液を、真空濃縮すると、D P P E- ω -カルボキシ-PEG-スクシンイミド 60 mg が得られた。

20

【0368】

D. D P P E-PEG-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val 複合体の調製
Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val (5 mg) の冷 pH 8.5 緩衝液溶液 (0 から 5 °C) に、アセトニトリル (10 mL) 中の D P P E- ω -カルボキシ-PEG-スクシンイミド (40 mg) を滴加した。生じた混合物を室温で約 48 時間攪拌した。アセトニトリルを真空除去し、分画分子量 1000 を有する膜を介して無機塩を透析した。凍結乾燥により、表題化合物 (D P P E-PEG-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val) 35 mg が白色の固体として得られた。

【0369】

30

実施例 6

生理食塩水、プロピレングリコール及びグリセロール (8 : 1 : 1) からなる溶液に、D P P C、D P P E-PEG 5000 及び D P P A をモル比 (82 : 8 : 10) で加えた。生じた混合物を約 45 °C に加熱し、濾過した (0.22 μ m)。濾過した混合物をバイアルに入れ、放置して室温まで冷却した。バイアルを真空下において、ガスを排気し、その後、バイアルを P F P で加圧した。次いで、バイアルを密閉し、振盪機上に置き、室温で攪拌すると、平均直径約 2.5 μ m を有する P F P-充填ベシクルが得られた。

【0370】

実施例 7

この実施例は、本発明の範囲内のターゲット化ベシクルの調製を対象とする。

40

【0371】

G P I I b I I I a 結合ペプチド (Integrated Biomolecule Corporation、Tucson、AZ) を、実施例 5 に記載の手順を使用して、D P P E-PEG 3400 に共有結合により結合させた。次いで、このペプチド複合体を、D P P C (82 モル%)、D P P E-PEG 5000 (8 モル%) 及び D P P A (8 モル%) からなる乾燥脂質混合物と混合した。この混合物を水和させて、Labconco Lymph-Lock 12 凍結乾燥機 (Kansas City、MO) で凍結乾燥させた。凍結乾燥させた物質を、8 : 1 : 1 の通常生理食塩水 : プロピレングリコール : グリセロールに、1 mg/mL の濃度で再懸濁した。この混合物の分量を、2 mL Wheaton バイアル (Millville、NJ) に入れ、キャップをし、ヘッドスペースを

50

、ペルフルオロブタンガス（F l u r a、N e w p o r t、T N）に代えた。バイアルを攪拌すると、G P I I b I I I a受容体をターゲットとするベシクル組成物が得られた。

【0372】

実施例 8

この実施例には、実施例 6 及び 7 で調製されたベシクル組成物を使用するペプチド結合実験の記載が含まれる。

【0373】

非ヘパリン化ヒト血液を、V a c u t a i n e r 管（B e c t o n D i c k i n s o n、R u t h e r f o r d、N J）に入れ、血餅にした。B e c k m a n T J - 6 遠心分離機（P a l o A l t o、C A）中で遠心分離することにより、血餅を集めた。次いで、血餅を正に荷電されている顕微鏡スライド（F i s h e r S c i e n t i f i c、P i t t s b u r g h、P A）の上に置いた。スライド 9 枚を、血餅血液で被覆した。未被覆のスライド 6 枚を、対照研究として使用した。次いで、前記のスライドに、実施例 6 及び 7（200 μ L）からなるベシクル組成物を塗布することにより、次のように結合研究を行った：（A）血餅のみ（対照）；（B）血餅を伴わない、実施例 6 からのベシクル組成物；（C）血餅を伴う、実施例 6 からのベシクル組成物；（D）血餅を伴わない、実施例 7 からのベシクル組成物；及び（E）血餅を伴う、実施例 3 からのベシクル組成物。スライドを 20 分間インキュベーションし、次いで、リン酸緩衝生理食塩水を使用して、未結合の物質を洗い流した。次いで、スライドを、N i k o n D i a p h o t（東京、日本）顕微鏡を使用して観察した。結果を、次の表に記載する。

【0374】

表 3

結合研究	結合
(A)	なし
(B)	なし
(C)	なし
(D)	なし
(E)	あり

【0375】

上の表から分かるように、結合は、G P I I b I I I a ターゲッティングペプチドを含有する実施例 7 で調製されたベシクル組成物でのみ観察された。

【0376】

実施例 9

この実施例は、G P I I b I I I a 受容体を対象とするターゲッティングリガンドを支持するヒト血清アルブミン系ベシクルの調製を対象とする。

【0377】

容器に、ヒト血清アルブミン 5 % の懸濁液を導入する。公開国際出願 W O 9 5 / 第 2 9 7 0 5 号（この記載を、ここでは全て参照して援用する）に記載されているように、この懸濁液を、連続的な真空下に脱気し、ヘッドスペースにペルフルオロプロパンガスを導入する。生じるガス充填アルブミンベシクルを、通常生理食塩水での洗浄を繰り返して、遊離のアルブミンから分離する。ガス充填ベシクルを、通常生理食塩水：プロピレングリコール：グリセロール（6：2：2、v：v：v）からなる混合物に再懸濁し、この懸濁液を穏やかに混合する。この懸濁液に、グルタルアルデヒド 1 % 及びペプチド L y s - G l n - A l a - G l y - A s p - V a l 1 重量%を加えると、G P I I b I I I a 結合ペプチドを支持する架橋ペルフルオロプロパンベシクルが生じることになる。

【0378】

実施例 10

この実施例は、G P I I b I I I a 受容体を対象とするターゲッティングリガンドと結合する重合可能なアクリロイル／スチリル脂質類似体により安定化されたベシクルの調製を対象とする。

10

20

30

40

50

【0379】

12-ヒドロキシドデカン酸を、塩化メタクリロイルでエステル化し、このエステルを無水物に変えると、12-(メタクリロイルオキシ)ドデカン酸無水物が得られよう。タマゴレシチンに由来するL-アルファグリセロホスホコリンを、12-(メタクリロイルオキシ)ドデカン酸無水物でアシル化すると、ビス[12-(メタクリロイル)オキシドデカノイル]-L-アルファホスファチジルコリン(1)が得られよう。化合物(1)を、粗製ガラガラヘビ毒液(*Crotalus adamanteus*)に由来するホスホリパーゼA₂を用いて酵素により加水分解し、引き続き、パルミトイル無水物でアシル化すると、1-[2-(メタクリロイルオキシ)ドデカノイル]-2-パルミトイル-L-アルファホスファチジルコリン(2)が得られよう。同様の方法を使用して、ジパルミトイル-L-アルファホスファチジルコリンを1-パルミトイル-2-[12-(メタクリロイルオキシ)ドデカノイル]-L-アルファホスファチジルコリン(3)に変えるものとする。

10

【0380】

DPPE-PEG5000(1.8mg/mL)及び、前記の実施例5に記載の手順を使用して調製されるGP11b111a結合ペプチド(Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val)で標識されているDPPE-PEG-5000 10重量%からなる通常生理食塩水溶液に、前記で調製される化合物(3)を加えるものとする。この溶液の分量を、滅菌3mLバイアルに入れる。バイアルのヘッドスペースを脱気し、窒素及びペルフルオロエタンガスからなる混合物(20:80、v/v)をバイアルのヘッドスペースに周囲圧力まで充填する。バイアルをESPE Capmix(Seefed、Oberay ドイツ)上で、室温で約1分間振盪する。ベシクル組成物を照射(254nm)すると、GP11b111a結合ペプチドを有する重合ガス充填ベシクルが得られよう。ベシクルの平均直径は、約3µmとなろう。

20

【0381】

実施例11

この実施例は、GP11b111a受容体をターゲットとする合成ポリビス(カルボキシラトフェノキシ)ホスファゼン(PCPP)ガス充填ベシクルの調製を対象としている。

【0382】

前記の実施例5に記載の手順を使用して、PCPP-PEG2000-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Valを調製することとする。次いで、PCPPベシクルを、米国特許第5487390号(この記載をここでは全て、参照して援用する)に記載されているように調製する。PCPPベシクル(100mg)を、Na₂CO₃溶液(30mg/mL)1mLに加え、室温で一晩攪拌して、溶解させる。溶液を、リン酸緩衝生理食塩水(pH7.4)で希釈して、最終ポリマー濃度2.5%(w/v)及び溶液pH7.4にする。必要な場合には、1NのHClを使用して、pHを調整する。

30

【0383】

Tween20 0.2%を含有するPCPP溶液(2.5w/v%)を、コロイドミル中でペルフルオロプロパンガスと混合して、数時間安定なガス処理されたPCPP溶液を生じさせる。溶液中で利用されるPCPPの10モル%は、PCPP-PEG2000-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Valである。ガス処理された溶液を、シリンジポンプから、150µL/分で、空気噴霧装置中に、ペルフルオロプロパンガスの雰囲気下に押し出し、Tween20 0.5%を含有する7.5%CaCl₂溶液250mLを含むパンに噴霧する。CaCl₂溶液と接触すると、PCPPは、二価カルシウムイオンにより架橋して、GP11b111aをターゲットとし、ペルフルオロプロパンで充填されている球体ゲルベシクルの比較的均一な集団をもたらす。捕捉されているペルフルオロプロパンの存在は、倒立顕微鏡を使用してベシクルを観察することにより証明される。

40

【0384】

50

実施例 12

この実施例は、フッ素化脂質から処方された、GPIIbIIIa受容体をターゲットとするベシクルの調製を対象とする。

【0385】

α -アミノ, ω -カルボキシーPEG3400 1当量を水:ジオキサン (1:1、v:v) の溶液中に溶かすことにより、 α -アミノ, ω -カルボキシーPEG3400 (Shearwater Polymer, Huntsville, AL) 中のアミノ基を保護する。この攪拌溶液に、t-Boc-無水物 (Bachem, Gardena, CA) 及びトリエチルアミン (Aldrich Chemical, Milwaukee, WI) それぞれ1モル当量を加える。生じる溶液を一晩攪拌し、真空濃縮して、揮発性ジオキサンを除去する。濃縮される物質に、水に対して10容量当量の酢酸エチルを加え、生じる混合物を氷浴中で冷却する。混合物のpHを、2N硫酸水溶液でpH2に調整し、分液漏斗を使用して、下部水性相を除去する。この酢酸エチル層を、飽和ブラインで洗浄し、乾燥させ (MgSO_4)、濾過し、真空濃縮すると、シロップが得られる。

10

【0386】

t-Boc- α -アミノ, ω -カルボキシルPEG3400、1モル当量のジイソプロピルカルボジイミド (DIC) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 及び無水DMFを混合する。この溶液を、攪拌し、ジイソプロピルエチルアミン (DIEA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)、ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBT) 及び1, 2-ジ- (15, 16, 17, 18-ノナフルオロ) ステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン (フルオロ-DSPÉ) をそれぞれ1当量加える。生じる溶液を2時間攪拌し、真空濃縮する。フルオロ-DSPÉ-t-Boc- α -アミノ, ω -アミドPEG3400を、トリフルオロ酢酸及び CH_2Cl_2 (4:6、v:v) からなる溶液に懸濁し、引き続き、さらに20分間攪拌する。次いで、溶液をDIEAで中和し、真空濃縮する。生成物を、 CH_2Cl_2 に再懸濁し、HCl水溶液を、約2のpHになるまで加える。水性層を、分離し、pHを、1.0% NaOHを用いてpH10に再調整する。この水性混合物に、酢酸エチルを加え、これを分離し、飽和ブラインで洗浄し、乾燥させる (MgSO_4)。濾過し、真空濃縮すると、フルオロ-DSPÉ α -アミノ, ω -アミドPEG3400が黄色のオイルとして得られよう。

20

30

【0387】

前記で得られる黄色のオイル、1当量のN-ブロモスクシンイミド (NBS) (Sigma Chemical, St. Louis, MO) 及びDMFを混合する。生じる混合物を3時間攪拌し、一晩真空濃縮する。濃縮した物質を、pH7のリン酸緩衝生理食塩水中に懸濁させる。GPIIbIIIa受容体をターゲットとするペプチドArg-Gly-Asp-Ser (RGDS) を、懸濁液に加える。一晩攪拌した後に、反応混合物を、Amiconフィルター濃縮機 (Amicon, Beverly, MA) を用いて、約300mLの容量まで濃縮する。濃縮された溶液を、ゲル濾過クロマトグラフィーにより精製すると、フルオロ-DSPÉ- α -アミノ, ω -アミドPEG3400-Arg-Gly-Asp-Serが得られる。この生成物を、DPPC及びDPPAからなる混合物に加えると、40:54:6 (w:w:w) のDPPC:フルオロ-DSPÉ:DPPAの比が生じる。この脂質混合物を、通常生理食塩水:グリセロール:プロピレングリコール (8:1:1、v:v:v) を有する希釈剤に加えると、希釈剤1mg/mLの最終脂質濃度が得られる。この溶液の分量を2mLバイアル (Wheaton Industries, Chicago, IL) に導入し、ヘッドスペースにペルフルオロプロパンを充填する。このバイアルを、ESPE Capmix (ESPE, Seefeld, ドイツ) で4300rpmで1分間攪拌すると、GPIIbIIIa受容体をターゲットとするフッ素化ベシクルが得られる。

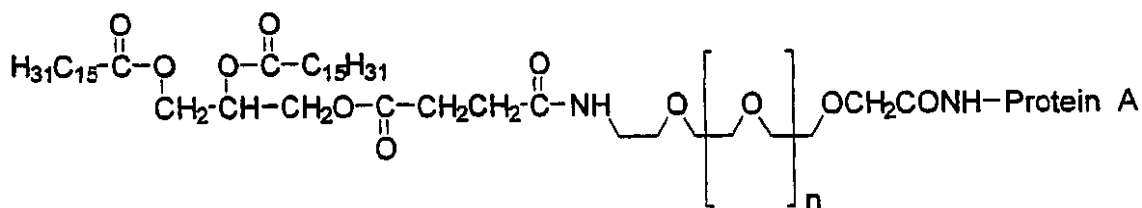
40

【0388】

実施例 13

50

【化 4 3】



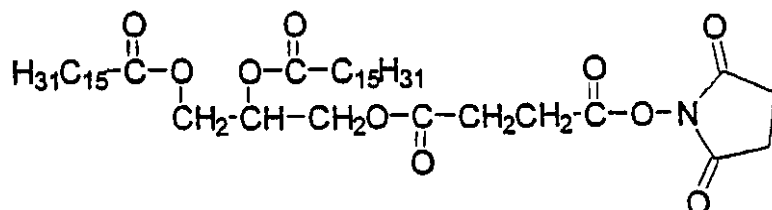
この実施例は、次式を有する N-（1，2-ジパルミトイル-s n-グリセロ-3-スクシニル）-PEG-プロテイン A 複合体の調製を対象とする。

10

【0389】

A. N-DPGS-スクシンイミドの調製

【化 4 4】



20

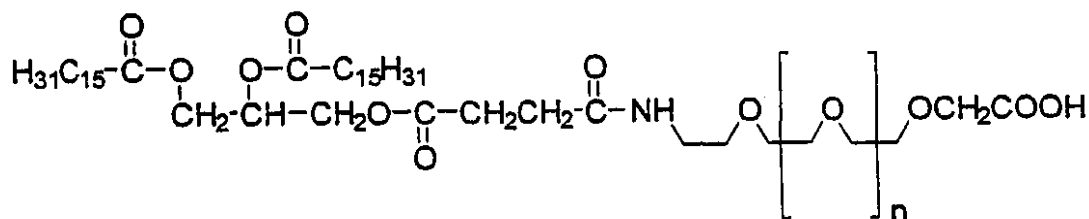
100 mL 丸底フラスコ中の s n-グリセロ-3-コハク酸 1，2-ジパルミトイル（66.8 mg）、N-ヒドロキシースクシンイミド（11.5 mg）、DMAP（2 mg）及びアセトニトリル（40 mL）からなる冷溶液（0 から 5℃）に、DCC（20.6 mg）のアセトニトリル（10 mL）溶液を加えた。生じた混合物を 5 時間攪拌した。反応の間に生じた固体物質（ジシクロヘキシル尿素）を濾過により除去し、濾液を真空濃縮すると、N-DPGS-スクシンイミド 78 mg が白色の生成物として得られた。

【0390】

B. 3-ω-カルボキシーポリエチレングリコール-イミノ-スクシネート-1，2-ジパルミトイル-s n-グリセロール（DPGS-ω-カルボキシーPEG）の調製

【化 4 5】

30



100 mL 丸底フラスコ中のステップ A からの N-DPGS-スクシンイミド（78 mg）及び CHCl_3 （10 mL）（Mallinckrodt、St. Louis、Mo）からなる冷溶液（0 から 5℃）に、ω-アミノ-ω'-カルボキシーポリエチレングリコール（0.3 g）及びトリエチルアミン（40 mg）からなる CHCl_3 （20 mL）溶液を滴加した。生じた混合物を 10℃ で 5 時間攪拌した。一晚攪拌した後に、反応混合物を氷水に注ぎ、10% HCl を用いて約 3 又はそれ未満の pH まで中和した。下部有機層を分液漏斗を使用して除去し、水で 3 回洗浄した。有機層を集め、乾燥させた（ NaSO_4 ）。濾過し、真空濃縮すると、DPGS-ω-カルボキシーPEG 0.34 g が白色の固体として得られた。

40

【0391】

C. 3-スクシナモイル-オキシーカルボニル-ポリエチレングリコール-イミノ-スクシネート-1，2-ジパルミトイル-s n-グリセロール（DPGS-ω-カルボキシーPEG-スクシンイミド）の調製

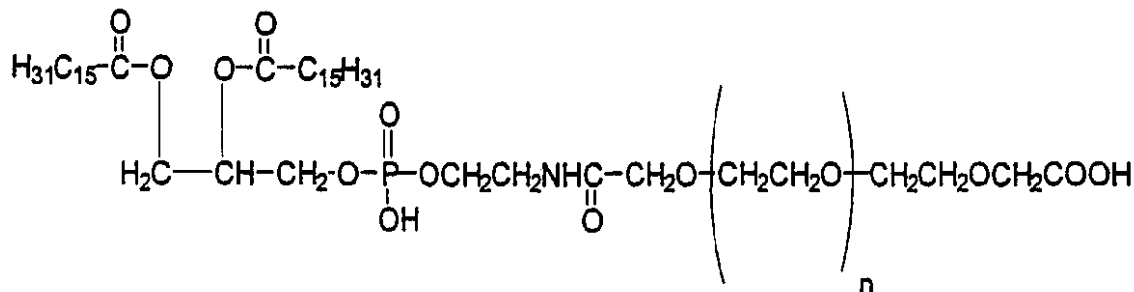
50

無水物 0.3 g が白色の固体として得られた。

【0395】

B. 1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン-N-カルボニル-メチレン-ω'-カルボキシ-ポリエチレングリコール (DPPE-ω-カルボキシ-PEG) の調製

【化49】



10

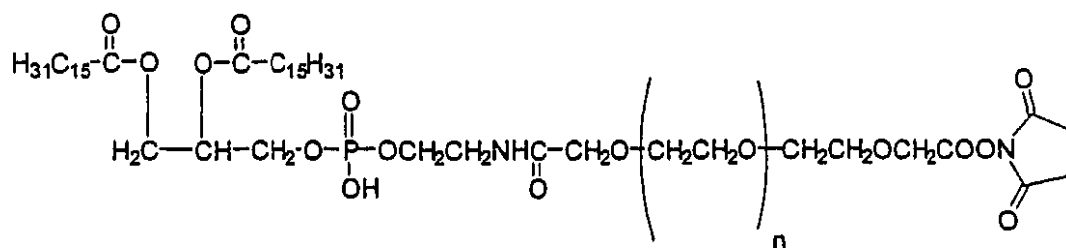
100 mL 丸底フラスコ中のステップAからの無水物 (0.3 g) 及び CH_2Cl_2 (10 mL) の冷溶液 (0 から 10 °C) に、DPPE (0.07 g) 及びトリエチルアミン (0.05 g) からなる CH_2Cl_2 (15 mL) 溶液を加えた。一晚攪拌した後に、反応混合物を氷水に注ぎ、10% HCl を用いて、約 3 又はそれ未満の pH に酸性化した。次いで、下部有機層を、250 mL 分液漏斗を使用して分離し、乾燥させた (NaSO_4)。濾過し、 CH_2Cl_2 溶液を真空濃縮すると、DPPE-ω-カルボキシ-PEG 0.45 g が白色の固体として得られた。

20

【0396】

C. 1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロール-3-ホスホエチルアミン-N-カルボニル-メチレン-ポリエチレングリコール-スクシンイミド (DPPE-ω-カルボキシ-PEG-スクシンイミド) の調製

【化50】



30

DCC (3 mg) 及びアセトニトリル (2 mL) の冷溶液 (0 から 5 °C) に、ステップBからの DPPE-ω-カルボキシ-PEG (60 mg)、N-ヒドロキシー-スクシンイミド (1.8 mg) 及び DMAPI (0.2 mg) からなるアセトニトリル (6 mL) 溶液を加えた。0 から 5 °C で 3 時間攪拌した後に、反応混合物の温度を、室温と平衡させた。一晚攪拌した後に、生じた白色の固体沈殿物 (ジシクロヘキシル尿素) を濾過により除去し、濾液を真空濃縮すると、DPPE-ω-カルボキシ-PEG-スクシンイミド 60 mg が得られた。

40

【0397】

D. DPPE-PEG-プロテインA複合体の調製

pH 8.5 の 15 mL 水性緩衝液 (15 mL) 中のプロテインA (20 mg) の冷溶液 (5 から 10 °C) に、アセトニトリル (8 mL) 中のステップCからの DPPE-ω-カルボキシ-PEG-スクシンイミド (4 mg) を滴加した。反応混合物の温度を室温と平衡させ、攪拌を 48 時間継続した。混合物を真空濃縮し、残留した塩を、分画分子量約 3500 を有する透析膜を使用して、水に対して透析した。水性透析サンプルを凍結乾燥させると、表題生成物 (DPPE-PEG-プロテインA複合体) 15 mg が白色の固体として得られた。

50

【0398】

実施例15

この実施例は、上皮細胞をターゲットとするターゲット化ベシクル組成物の調製及び使用を対象としている。

【0399】

A. ベシクル組成物の調製

実施例13からのDPGS-PEG-プロテインA複合体(1重量%)を、DPPC(82モル%)、DPPA(10モル%)及びDPPE(8モル%)からなる無水脂質混合物と組み合わせた。この無水脂質混合物を水和させ、Labconco(Kansas City, MO) Lymph-Lock12凍結乾燥機で凍結乾燥させた。凍結乾燥させた混合物を、通常生理食塩水：プロピレングリコール：グリセロール(8：1：1)に、脂質濃度1mg/mLで再び再懸濁させた。混合物を2mL Wheatonバイアル(Millville, NJ)に分量した。バイアルにキャップをし、バイアルのヘッドスペースをペルフルオロブタンガス(Flura, Newport, TN)に代えた。次いで、バイアルをEspe Capmix(登録商標)(Seefeld, ドイツ)で1分間振盪すると、ガス充填ベシクルが得られた。ウサギ抗ケラチン抗体(Calbiochem, San Diego, CA)(100μL)をバイアルのサンプルに加え、これらのバイアルを、回転させて、抗体とガス充填ベシクルとを混合する。バイアルを、室温で約1時間インキュベーションした。ピシンコニン酸タンパク質アッセイ(Pierce, Rockford, IL)をベシクル組成物で、PBSで洗浄する前後に行った。このアッセイは、抗ケラチン抗体が、プロテインAを介してベシクルに結合し、洗浄の間にも結合し続けたことを示した。

【0400】

B. ベシクル組成物でのターゲッティング実験

HeLa細胞(ケラチンを発現する上皮子宮頸ガン細胞系)を、EMEM媒体(Cellgro, Washington, DC)中の水平組織培養管(Nunc, Roskilde, Denmark)に入れた。細胞を一晩成長させ、ベシクル組成物の分量をそれぞれの管に加えた。使用したベシクル組成物は：(i)実施例6からのベシクル；(ii)ウサギ抗ケラチン抗体を含有しないステップAで調製されたベシクル；及び(iii)ウサギ抗ケラチン抗体を含有するステップAで調製されたベシクルであった。抗体を含む(iii)のベシクルのみが、HeLa細胞に結合した。

【0401】

実施例16

peg化脂質を、ジステアロイルホスファチジル-エタノールアミン(DSPE)(Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL)及びα-アミノ, ω-カルボキシ-PEG3400(Shearwater Polymer, Huntsville, AL)から調製する。水：ジオキサン(1：1, v：v)中で、α-アミノ, ω-アミド-PEG及びそれぞれ1モル当量のt-Boc-無水物(Bachem, Gardena, CA)及びトリエチルアミン(Aldrich Chemical, Milwaukee, WI)を組み合わせることにより、アミノ基を保護する。生じる溶液を、一晩攪拌し、ジオキサンを真空除去する。水性残留物に、水に対して10容量当量の酢酸エチル(Mallinckrodt, St. Louis, Mo)を加え、この混合物を氷浴中で冷却する。pHを、硫酸水溶液(2N)でpH2に調整し、水性層を分液漏斗を使用して分離する。酢酸エチル層をブラインで洗浄し、乾燥させ(MgSO₄)、真空濃縮すると、シロップが得られよう。

【0402】

この黄色オイル、DSPE-t-Boc-α-アミノ, ω-アミド-PEG3400、1モル当量のジイソプロピルカルボジイミド(DIC)(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo)及び無水ジメチルホルムアミド(DMF)を混合する。溶液を攪拌し、それぞれ1モル当量のジイソプロピルエチルアミン(DIEA)、(S

igma Chemical Co.、St. Louis、Mo) 及びヒドロキシベンゾトリアゾール (HOB T) を加える。溶液を 2 時間攪拌し、真空濃縮する。濃縮された残留 D S P E- α -アミノ、 ω -アミド-PEG 3400 を、トリフルオロ酢酸及び塩化メチレン (4:6、v:v) と混合し、生じる混合物をさらに 20 分間攪拌する。溶液を D I E A で中和し、真空濃縮する。残留物を塩化メチレンに再懸濁させ、塩酸水溶液を、pH が 2 になるまで加える。水性層を分離し、pH を、1.0% NaOH を用いて pH 10 まで調整する。この水性混合物に、酢酸エチルを加え、これを分離し、飽和ブラインで洗浄し、乾燥させる (MgSO₄)。酢酸エチル溶液を真空濃縮すると、黄色オイルが得られる。

【0403】

10

DMF 中のこの黄色オイル、D S P E- α -アミノ、 ω -アミド-PEG 3400 の溶液に、1 当量の N-ブロモスクシンイミド (NBS) (Sigma Chemical Co.、St. Louis、Mo) を加える。3 時間攪拌した後に、反応混合物を一晩真空濃縮する。pH 約 7 のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中の生じた濃縮残留物の懸濁液に、マウス/ヒトキメラ由来のモノクローナル抗原である抗癌胎児性抗原 (抗 CEA) を加える。一晩攪拌した後に、溶液を Amicon フィルター濃縮機 (Amicon、Beverly、MA) で約 300 mL の溶液まで濃縮する。濃縮された溶液をゲル濾過クロマトグラフィーにより精製すると、最終生成物が得られよう。

【0404】

実施例 17

20

ベシクル処方物を、実施例 6 を繰り返して調製するが、ただし、約 1 ナノモルの組換えヒト成長ホルモンをベシクル処方の前に脂質組成物に加えることとする。

【0405】

実施例 18

実施例 17 を繰り返すが、ただし、DPPA を、カチオン脂質ジパルミトイルホスホコリン (Avanti) に代え、DPPC を中性脂質 DPP E に代える。これにより、生物活性剤、特に、血管内皮成長因子 (VEGF) のための遺伝子などの遺伝子物質に結合しうるカチオンベシクルが得られよう。抗心筋抗体複合体などのターゲッティングリガンドの導入により、梗塞及び/又は虚血組織を対象としうるターゲット化ベシクルが得られよう。高エネルギー超音波のバースト、例えば 1 MHz 連続波 200 mW をパルス期間を変えながら適用して、ベシクルの破裂を促進することができる。結果として、VEGF を実質的に直接、梗塞及び/又は虚血組織に輸送することができる。

30

【0406】

実施例 19

この実施例は、すい臓の神経内分泌腫瘍をターゲットとするベシクル組成物の調製を対象としている。

【0407】

実施例 16 を繰り返すが、抗 CEA の代わりに、ソマトスタチン (Somatostatin) ペプチドを使用する。治療用抗がん剤ストレプトゾシン (Streptozocin) もベシクル組成物に導入する。生じるベシクル組成物を、神経内分泌腫瘍と診断された患者に静脈注入する。ベシクルは優先的に腫瘍近傍のすい臓領域に吸収されて、腫瘍への抗がん剤の高い輸送が生じることになる。

40

【0408】

実施例 20

実施例 15 を繰り返したが、ただし、HeLa 細胞に加えて、ターゲット化ベシクルをマウス正常肝細胞を有する上皮細胞系にも加えた。抗体を含有するベシクルだけが、肝細胞に結合した。

【0409】

実施例 21

この実施例は、心筋細胞をターゲットとするベシクル組成物の調製及び使用を対象として

50

いる。

【0410】

A. ターゲット化ベシクルの調製

実施例15を繰り返したが、ウサギ抗ケラチン抗体を、ウサギ抗ヒト骨ミオシン抗体 (Biomakor (登録商標)、Kiryat Weizmann、Rehovot、Israel) (100 μ L) に代えた。

【0411】

B. 心筋細胞のターゲッティング

ラット心臓筋芽細胞 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) を、EMEM媒体 (Cellgro, Washington, DC) 中の水平組織培養管 (Nunc, Roskilde, デンマーク) に入れた。細胞を一晩成長させ、ベシクル組成物の分量をそれぞれの管に加えた。使用したベシクル組成物は: (i) 実施例6からのベシクル; (ii) ウサギ抗心筋抗体を含有しないステップAで調製されたベシクル; 及び (iii) ウサギ抗心筋抗体を含有するステップAで調製されたベシクルであった。抗体を含む (iii) のベシクルのみが、心筋細胞に結合した。 10

【0412】

実施例22

この実施例は、心筋の細胞 (心筋細胞) をターゲットとするベシクル組成物の調製及び使用を対象としている。 20

【0413】

A. ターゲット化ベシクルの調製

実施例15を繰り返したが、ただし、ウサギ抗ケラチン抗体を、ウサギ抗ミオシン (骨核) 抗体 (Accurate Chemical, Westbury, NY) (100 μ L) に代えた。

【0414】

B. 心筋の細胞のターゲッティング

心筋を発現するH9C2、ラット心筋系を使用した。(骨格筋ミオシン及び心筋ミオシンは実質的に同じである。) 対照細胞系は、ヒト腸管細胞系であるINT407であった。細胞を、EMEM媒体 (Cellgro, Washington, DC) 中の水平組織培養管 (Nunc, Roskilde, Denmark) に入れた。細胞を一晩成長させ、ベシクル組成物の分量をそれぞれの管に加えた。使用したベシクル組成物は: (i) 実施例6からのベシクル; (ii) ウサギ抗ミオシン抗体を含有しないステップAで調製されたベシクル; 及び (iii) ウサギ抗ミオシン抗体を含有するステップAで調製されたベシクルであった。次の3種の実験細胞タイプを使用した: (a) INT407; (b) H9C2; 及び (c) 10%グルコースに10分間さらして、細胞に衝撃を与え、空孔を開けて、抗ミオシンと細胞質ミオシンとが結合するようにしたH9C2。細胞タイプ(a)、(b) 又は (c) のいずれでも、ベシクル組成物 (i) 又は (ii) では結合が観察されなかった。ベシクル組成物 (iii) も、細胞タイプ (a) には結合しなかった。ベシクル組成物 (iii) と細胞タイプ (b) との若干の結合が観察され、ベシクル組成物 (iii) と細胞タイプ (c) との実質的な結合が観察された。 30 40

【0415】

実施例23

ジピリダモール (例えば、The Merck Index, 10th Ed., p. 489 (1983) 参照) は、本発明では、冠血管拡張剤である生物活性剤である。ジピリダモールは、本発明ではターゲッティングリガンドでもある。それというのも、これは、心臓組織中の1種又は複数の受容体に結合し、ホスホリピドに付着して、膜親和性誘導体をもたらすためである。特に、N-スクシニル-DPPEは、ジシクロヘキシルカルボジイミド及び縮合剤としての触媒を使用すると、ジピリダモールに結合して、N-ジピリダモリルスクシネート-DPPEを生じる。この脂質結合ジピリダモール誘導体を、心臓組 50

織をターゲットとするためのベシクルを調製するために、脂質組成物中で使用することになる。

【0416】

実施例24

バルーンカテーテルを経皮的に、大腿動脈を介して、実験動物の左の冠動脈回旋枝へと設置する。バルーンを、3時間膨らませて、前外側心筋層への血流を阻止し、心筋梗塞を生じさせる。心エコー検査を、5MHzトランスデューサで行い、残存壁運動異常、さらに左心室の前外側壁の心筋薄化を明らかにする。バルーンをしぼませ、例えば実施例22のステップAで調製したものと同様に、ドデカフルオロペンタンガスを充填した抗心筋抗体標識ベシクル30 $\mu\text{L}/\text{kg}$ の用量を、静脈により注入する。心エコー検査を注入の30分後に行う。撮像により、梗塞の領域に対応して、前外側壁に高いエコー源性の領域が示されよう。梗塞の周辺（再還流領域）は最も明るく、中心で低い強度を示す（流れが持続的に存在しない領域）。これに対して、中心心室房は比較的暗く、ベシクルの大部分はこの時間までには除去されている。

10

【0417】

実施例25

胸痛を病んでいる患者を、病院の救急処置室に入れることにする。超音波試験を行うと、左心室の前壁に壁運動異常を示す。患者に、例えば実施例22のステップAで調製したものと同様に、ペルフルオロブタンガスを充填した抗心筋抗体標識ベシクル5 $\mu\text{L}/\text{kg}$ の用量を投与する。投与の10分後、超音波撮像を繰り返すと、これにより左心室前壁に高いエコー源性の領域が示される。これにより、心筋梗塞の診断が確認され、患者を組織プラスミノゲン活性化因子で治療することになる。

20

【0418】

実施例26

冠状動脈疾患の有無を診断するために、患者でストレス心エコー検査法を行うことにする。ピーク運動の間、患者に、前記の実施例23に記載のジピリダモールで標識されたペルフルオロプロパン充填ベシクル5 $\mu\text{L}/\text{kg}$ を投与する。ジピリダモールを、(a)二官能性架橋基；(b)小さいスパニング分子；(c)還元アミノ化を伴う、又は伴わないシッフ塩基；又は(d)マレイミジルリンカーを使用することにより、ベシクルと組み合わせる。ベシクルは、心筋の灌流領域に結合する。約5分で、バックグラウンドベシクルが消失すると、標識ベシクルが心筋に存在し続けることになる。後発撮像により、冠状動脈疾患(CAD)を受けている虚血心筋が、明るい正常に灌流されている心筋に取り囲まれている低強度領域として示されよう。心室内での認めうるバックグラウンドベシクルの不在により、影付きの問題が消え、CADの診断が容易になる。

30

【0419】

実施例27

この実施例では、本発明の範囲内のベシクル組成物及び方法を使用して、タンパク質のターゲット化発現を証明する。

【0420】

ここではラット(A)、(B)及び(C)と同定するSDラット3匹を、ケタミンアセプロマジンで麻酔した。 β -ガラクトシダーゼ遺伝子をSV40プロモーター及びエンハンサー遺伝子と共に含有するプラスミドであるpSV β -galを、実施例2で調製されたカチオン脂質化合物と混合する。プラスミド及びカチオン脂質化合物混合物を室温で15分間インキュベーションした。次いで、cGMP及び生じたインキュベーションされた物質を、通常生理食塩水：グリセロール：プロピレングリコール(8:1:1)中のそれぞれモル%比82:10:8のDPPC、DPPA及びDPPG-PEG5000からなるブレンドに加えた。生じた混合物を、WIG-L-BUG(登録商標)で1分間、3200rpmで振盪することにより、ベシクルを調製した。生じたベシクル組成物を、ラット(A)、(B)及び(C)に注入した。用量は、次の通りであった。

40

ラット pSV β gal用量(μg) カチオン脂質用量(μg)

50

(A)	5	3 0
(B)	5	3 0
(C)	2 5	1 5 0

ベシクル組成物を注入している間に、ラット（B）及び（C）を、治療用超音波装置（1．0MHz、Rich-Mar model 25、Rich-Mar Corporation、Inola、OK）からの超音波エネルギーにさらす。注入の間及びフラッシュ後の1分間、超音波を、左後肢の内側に向けた。ラット（A）には、超音波治療を受けさせなかった。48時間後、CO₂で窒息させることにより、ラットを安楽死させた。左右の肢の筋肉及び皮膚を各ラットから切除した。心臓、肝臓及び腎臓も切除した。切除された組織を、2%ホルマリン中で72時間固定した。固定した後に、X-gal、フェロシアン化カリウム及びフェリシアン化カリウムを含有する溶液に組織を浸すことにより、β-ガラクトシダーゼ活性の存在をアッセイした。組織を染色し、検査し、撮影した。ラット（A）の肢組織、特に、内皮細胞、筋肉及び皮膚に、発現が広く分散しているのが見られた。ラット（B）から切除された組織の検査で、同様の細胞タイプに発現が見られたが、超音波適用の部位でのみであった。ラット（C）では、ターゲット肢で点発現及びターゲットではない肢で分散発現が見られた。

【0421】

実施例28

この実施例は、様々な脂質組成物の調製を対象としている。

【0422】

DPPC、DPPA及びDPPE-PEG5000を、それぞれモル比82：10：8でブレンドした。この脂質混合物をここでは、組成物（A）と称する。組成物（A）の1部分を、蒸留脱イオン水中で、実施例2で調製されたカチオン脂質化合物と10：1（w：w）の比で混合した。この後者の混合物をここでは、組成物（B）と称する。組成物（A）及び（B）を、1ml血清バイアルに導入した。Sargent Welch真空ポンプ（Skokie、IL）を用いてバイアルを排気し、ヘッドスペースをペルフルオロプロパンガス（Flura Chemical Corp、Newport、TN）に代えた。バイアルをCrescent Dental WIG-L-BUG（登録商標）311OB（Lyons、IL）機械的振盪機を用いて攪拌した。振盪の後に、ヘパリン（Elkin Sinns Inc.、Cherry Hill、NJ）をほぼ5：1の脂質：ヘパリンのモル比でバイアルの1部分に加えた。ヘパリン及び組成物（A）の混合物をここでは、組成物（C）と称する。ヘパリン及び組成物（B）の混合物をここでは、組成物（D）と称する。

【0423】

次いで、組換えヒト塩基性線維芽細胞成長因子（BFGF）（Sigma、St. Louis、Mo）を次いで、組成物（A）、（B）、（C）及び（D）に加え、これらをそれぞれ、組成物（E）、（F）、（G）及び（H）と称する。BFGFを、ヘパリンを含有する組成物（組成物（C）及び（D））に、モル比5：1（BFGF：ヘパリン）で加えた。組成物（A）から（H）それぞれから少なくとも3つのサンプルを、Accusizer 770（Particle Sizing Systems、Santa Barbara、CA）を使用してサイズ調整した。サイズ調整で、組成物（A）から（G）にベシクルサイズの違いは見られなかった。しかしながら、カチオン脂質、ヘパリン及びBFGFを含有する組成物（H）中のベシクルは、より小さい平均サイズを有した。

【0424】

次いで、組成物（E）から（H）を、天然ポリアクリルアミドゲル（タンパク質ゲルPAGEミックス、Boehringer Mannheim、Indianapolis、IN）を使用して分析し、ヘパリン及びBFGFの結合特性を識別した。ゲルを、Hoefer SE400スラブゲル装置（Hoefer Scientific、San Francisco、CA）に泳動させた。ゲルを、電気泳動電力供給（MBP300、IBI、Rochester、NY）を使用して一定の電流で泳動させた。次いで、ゲルを

高速クーマシーブルー染色法を使用して染色し、視覚的に分析した。ゲル電気泳動により、組成物（H）では、カチオン脂質の存在がヘパリンさらにはB F G Fの結合を強めることが確認された。アニオン性のヘパリンがカチオン脂質に結合し、カチオン性であるB F G Fがヘパリンに結合すると考えられる。ヘパリン及びカチオン脂質を含有しない組成物中のB F G Fは、電気泳動の間に移動する。

【0425】

実施例29

実施例16を繰り返したが、ただし、血管内皮成長因子（VEGF）を、抗CEA抗原の代わりに使用することにする。

【0426】

実施例30

DPPC、DPPA及びDPPE-PEG5000をモルパーセント比82：10：8で、塩水：プロピレングリコール：グリセロール（8：1：1、w/w/w）中で混合する。溶液中の脂質の全体濃度は、1mg/mLである。組換えヒト成長ホルモンを、脂質の全体重量に対して10重量%の濃度でこの混合物に加える。この混合物の分量（1.5mL）を3mL容量ガラスバイアルに入れ、バイアルのヘッドスペースをペルフルオロプロパンガスに代える。バイアルを密閉し、振盪すると、ヒト成長ホルモンに結合していて、内皮細胞をターゲッティングするために使用することができるガス充填ベシクルが生じる。ベシクルの平均直径は、約3μmとなろう。

【0427】

実施例31

ジステアロイルホスファチジルグリセロール（DSPG）及びDPPE-PEG5000をモル比92：8で、滅菌水中で混合する。脂質の濃度は、約1mg/mLである。キトサンのアミン基とbFGFのカルボキシル成分とを付着させるためのアミド結合を使用して、キトサンを、塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）10モル重量%で誘導体化する。誘導体化キトサンを、キトサン中のカチオン基とDSPG中のアニオン基を実質的に等濃度にするような量の脂質懸濁液に加える。この混合物の分量（1.5mL）を3mLバイアルに入れ、ヘッドスペースをペルフルオロブタンに代えた。バイアルを密閉し、ESPE Capmix（Seefeld、ドイツ）で振盪すると、内皮細胞をターゲッティングするために使用することができるガス充填ベシクルが得られよう。

【0428】

実施例32

peg化脂質を、DSPE及びα, ω-ビス（カルボキシメチル）-PEG2000（Shearwater Polymers、Huntsville、AL）から調製すると、MeO₂C-PEG-DSPEが得られる。この脂質をカラムクロマトグラフィー（シリカゲル）により精製すると、遊離酸（HO₂C-PEG-DSPE）が得られ、この後、VEGFを、遊離のカルボキシル基と架橋させる。DPPC、DSPA、DSPE-PEG及びDSPE-PEG-VEGFをモル比82：10：6：2で、生理食塩水：グリセロール：プロピレングリコール（8：1：1、w/w/w）中で、全体脂質濃度1.5mg/mLで混合する。この混合物の分量（1.5mL）を滅菌3mLバイアルに入れ、バイアルのヘッドスペースを30℃でペルフルオロペンタンガスに代え、バイアルを密閉する。バイアルを30℃で、約90秒間、3200rpmでESPE Capmix（Seefeld、ドイツ）上で振盪させると、ペルフルオロペンタンガス充填ターゲット化ベシクルが生成することになろう。

【0429】

実施例33

DSPC、コレステロール及びDPPAを65：27：8のモルパーセント比で、生理食塩水：プロピレングリコール：グリセロール（8：1：1、w/w/w）の溶液中で混合する。全体脂質濃度は、5mg/mLである。この混合物の分量（1.5mL）を滅菌バイアルに入れ、ヘッドスペースをペルフルオロブタンガスに代える。バイアルを密閉し、

10

20

30

40

50

ESPE Capmix (Seefeld、ドイツ) 上で5分間振盪させると、本発明の範囲内のベシクル組成物が得られる。高コレステロール食を与えられているWatanabiウサギにi. v. で、ベシクル組成物0.10mL/Kgの用量を投与する。投与の25分後に、超音波撮像を行うと、ベシクルがアテローム斑に冒されている内皮細胞の領域に蓄積したことが示される。このことは、本発明のベシクル組成物は、内皮細胞のアテローム硬化性領域を診断する際に使用することができることを示すことになる。

【0430】

実施例34

実施例33を繰り返すが、ただし、使用される脂質は、DPPE-PEG-カルボキシレートへのアミド結合を介して共有結合により架橋されるコレステロールアミンとする。脂質混合物は、モルパーセント比82:7:1:10で混合されているDPPC、DPPE-PEG5000、DPPE-PEG-コレステロールアミン及びDPPAを含むことになる。

【0431】

実施例35

実施例33を繰り返すが、ただし、脂質濃度を、約5mg/mLに高め、懸濁媒体が、通常生理食塩水、トレハロース(10mg/mL)及びプルロニックF-68(10mg/mL)の溶液を含む。脂質のこの懸濁液を、Microfluidizer (Microfluidics、Newton、MA)を使用して、16000psiで、全部で10回の通過でマイクロエマルジョン化する。生じたベシクル組成物を凍結乾燥させ、凍結乾燥室のヘッドスペースを、ゆっくりとペルフルオロブタンガスを注入することにより、72時間かけて徐々に、周囲圧力に戻す。生じたガス充填凍結乾燥ベシクルを、使用するまで、無水粉末として貯蔵することとする。

【0432】

実施例36

実施例35を繰り返すが、ただし、脂質濃度を約25mg/mLに高め、懸濁媒体が、通常生理食塩水、ソルビトール(20mg/mL)及びプルロニックF-68(20mg/mL)の溶液を含有する。脂質懸濁液を4℃に冷却し、この混合物に、ペルフルオロペンタンを加えて、溶液1mL当たり8μLのペルフルオロペンタン濃度にする。この混合物を、温度を4℃に維持されているマイクロ流動化装置に20回、16000psiで通過させる。これにより、ペルフルオロペンタン充填ベシクルのベシクル組成物が得られる。この組成物をi. v. で、患者に注入し、内皮細胞をターゲットとするために使用することができるガス充填ベシクルをインビボで形成することとする。i. v. 注入の前に、ベシクル組成物を約30℃以上に加温し、例えば、ESPE Capmix (Seefeld、ドイツ)で、又は他の振盪機又はアマルガメータで振盪することにより、又はペルフルオロペンタン充填ベシクルの組成物を充填されているシリンジのプランジャを引いて、圧力を低下させ、ペルフルオロペンタン液体をペルフルオロペンタンガスに変えることによって、ガス充填ベシクルを得ることもできる。

【0433】

実施例37

12-ヒドロキシドデカン酸を、塩化メタクリロイルでエステル化し、エステルを、無水物に変えて、12-(メタクリロイルオキシ)ドデカン酸無水物を得る。タマゴレシチンに由来するL-アルファ-グリセロホスホコリンを、12-(メタクリロイルオキシ)ドデカン酸無水物でアシル化して、ビス[12-(メタクリロイル)オキシドデカノイル]-L-アルファ-ホスファチジルコリン(1)を得る。粗製ガラガラヘビ毒液(Crotalus adamanteus)に由来するホスホリパーゼA₂を用いて酵素により加水分解し、引き続き、パルミトイル無水物でアシル化すると、1-[2-(メタクリロイルオキシ)ドデカノイル]-2-パルミトイル-L-アルファ-ホスファチジルコリン(2)が得られよう。

【0434】

前記の(2)を、通常生理食塩水と、脂質濃度3mg/mLで混合する。この混合物に、DSPE-PEG-VEGFを濃度0.30mg/mLで加える。混合物の分量(1.5mL)を滅菌3mLバイアルに入れる。バイアルのヘッドスペースを排気し、ペルフルオロプロパンガスに代え、バイアルを密閉し、薄い不透過性フィルムでラッピングする。バイアルを、ESPE Capmix (Seefeld、ドイツ)で約3分間振盪すると、ガス充填ベシクルが得られる。フィルムを除去し、ベシクル組成物に光(254nm)を照射すると、内皮細胞をターゲットとするためのVEGFを支持する重合ガス充填ベシクルが得られよう。

【0435】

実施例38

実施例37を繰り返すが、ただし、脂質(2)をDSPE-PEGと混合する(実施例8参照)。VEGFをこの脂質混合物に混合し、その後、ESPE Capmix (Seefeld、ドイツ)上で振盪し、DSPE-PEGに共有結合により結合する。光重合の後に、VEGFをベシクルを被覆するポリマー脂質膜に直接包埋することとする。

【0436】

実施例39

この実施例は、内部で架橋しており、公開国際出願WO第95/00126号(この記載をここでは全て、参照して援用する)に記載されているようなポリオキシ(C₁~C₄)アルキレン鎖の結合により変性されている表面を有するアルブミンベシクルの調製を広く対象としている。エーテル基であるWO第95/00126号でのアルキレン鎖の末端とは異なり、アルキレン鎖変性剤の末端は反応性基を含む。反応基は、内皮ターゲッティングリガンドを結合するために含まれることになろう。

【0437】

実施例39A

5%ヒトウシ血清アルブミンの水溶液(5mL)を超音波反応容器に、500mL/分の速度で導入する。Sonifier B-30(Branson、FRG)を使用して、混合物を約15分間、エネルギー束100ワット/cm²で音波処理する。反応容器を冷却することにより、温度を22℃に維持する。望ましい場合には、薬剤などの生物活性剤を、この混合物に加える。アルブミン溶液に、グルタルアルデヒドで飽和しているCH₂Cl₂溶液(0.2mL)を加えることにより、架橋を開始する。生じた溶液を約1時間攪拌する。メタノールで、続いてアセトン、最後にn-ヘキサンで洗浄した後に、架橋されたアルブミンベシクルが、褐色の粉末として得られ、これを、真空下に約24時間乾燥させる。生じたベシクルのサイズは、Nicomp sレーザー光粒子走査システムにより、約200nmと決定されよう。

【0438】

実施例39B

強力乳化プロセスを、4ブレードインペラに代え、高濃度、例えば約10から約25%のアルブミンを使用することにより、実施例39Aで調製されたベシクルよりも大きな直径を有するアルブミンベシクルを調製される。架橋は、実施例39Aで前記したように実施することにする。

【0439】

実施例39C

この実施例は、ガス充填アルブミンベシクルの調製を対象としている。

【0440】

滅菌バイアル中に5%アルブミン5mLを入れ、バイアルのヘッドスペースにペルフルオロブタンガスを充填することにより、アルブミンベシクルを調製する。バイアルを、ESPE Capmix (Seefeld、ドイツ)で、3300rpmで約5分間振盪する。架橋は、実施例39Aで前記したように実施することにする。

【0441】

実施例39D

10

20

30

40

50

この実施例は、ガス充填アルブミンベシクルの調製を対象としている。

【0442】

ヒト血清アルブミンの5%溶液及びペルフルオロプロパンガスのヘッドスペースを有するバイアルを音波処理することにより、アルブミンベシクルを調製する。この音波処理は、中間出力設定で、約5分間、液体界面に音波処理装置ホーンチップを最小限浸漬することを含む（Heat Systems Probe、Farmingdale、NY）。アルブミンベシクルを、実施例39Aで前記されているように架橋させることにする。

【0443】

実施例39E

この実施例は、ヘテロ二官能性PEGと前記で調製されたアルブミンベシクルとを結合させることを対象としている。 10

【0444】

α -アミノ、 ω -カルボキシ-PEG5000（Shearwater Polymers）の ω カルボキシ基を、適切なエステル官能基、例えばベンジルエステルで保護する。例えば、アスパラギン酸又はグルタミン酸成分などのタンパク質上の適切なアミノ酸成分を1,1-カルボニルジイミダゾールで活性化させることにより、PEGのアミノ基を、アルブミンベシクルに共有結合により結合させて、10:1重量比のアルブミン:PEGを得る。アミド結合によりPEGとアルブミンとを共有結合させた後に、ベンジルエステル基を除去する。1,1-カルボニルジイミダゾールでPEGのカルボキシレート末端を活性化することにより、aFGFを、遊離のカルボキシル基に結合させることになる。これにより、PEG架橋基によりアルブミンベシクルに結合している内皮ターゲッティングリガンドが得られる。 20

【0445】

もしくは、カルボニルジイミダゾールでaFGFの適切なアミノ酸、例えばアスパラギン酸又はグルタミン酸を活性化し、引き続き、カルボキシル基保護 α -アミノ、 ω -カルボキシ-PEGを加えることにより、結合を行う。保護カルボキシル基を脱保護し、保護されていないカルボキシル基を、カルボニルジイミダゾールで活性化させる。活性化aFGF-PEGを混合し、アルブミンベシクルと反応させることにする。

【0446】

真空下にベシクルを慎重に脱水し、ペルフルオロブタンなどのガスを使用して、周囲圧力まで徐々に戻すことにより、ベシクルにガスを注入する。1種又は複数の界面活性剤、例えばプルロニックF-68を、脱水及びガス注入ステップの前に加えることもできる。 30

【0447】

実施例40

この実施例は、ガス充填クラスレートの調製を対象としている。

【0448】

α -ヒドロキシ、 ω -カルボキシ-PEG2000中の ω カルボキシ基を、適切なエステル官能基、例えばベンジルエステルで保護する。保護された化合物を、 Et_3N 及び CHCl_3 中で、0から5℃で1当量の POCl_3 と反応させて、ヒドロキシ基を塩化リンエステルに変える。次いで、この化合物を過剰の NaHCO_3 と反応させて、対応するリン酸ナトリウム塩（ $\text{PEG-PO}_4\text{Na}_2$ ）を生じさせる。この塩を、 HCl で $\text{pH}3.0$ に酸性化して、対応する酸（ $\text{PEG-PO}_4\text{H}_2$ ）を得る。この生成物を、分画分子量約100を有する膜を使用して、精製水に対して透析する。 40

【0449】

透析した後に、前記のリン酸生成物（2g）を、水（100mL）中のピロリン酸二水素二ナトリウム（ $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ）（8g）と混合する。この溶液を、Buchi噴霧乾燥装置に導入し、噴霧乾燥させた。生じた粒子を、真空下に約1時間、120℃で乾燥させると、中空のPEG-被覆ピロリン酸ベシクルが生じる。これらのベシクルを、水性媒体中に再懸濁させ、ベンジル保護基を除去する。PEGの脱保護されたカルボキシル基を、1,1-カルボニルジイミダゾールで活性化させ、生じた化合物を、内皮細胞をター 50

ゲットとするためにELAMのモノクローナル抗体に結合させる。ターゲットベシクルを含有する水性媒体に、DDPC及びプルロニックF-68を加えて、それぞれ、1mg/mL及び5mg/mLの濃度を生じさせる。ベシクル含有水性媒体を約45℃に加熱し、手で穏やかに攪拌し、回転蒸発機を使用して真空下に乾燥させ、その間、この温度を維持する。生じた乾燥物質を適切な容器に導入し、凍結乾燥させる。ペルフルオロブタンガスを徐々に、容器のヘッドスペースに、周囲圧力が達成されるまで、約48時間かけて注入する。生じたガス充填ピロリン酸クラスレートを使用するまで、凍結乾燥粉末として貯蔵することとする。

【0450】

実施例41

蒸留水(100mL)に、 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (3.68g)を溶かすことにより、0.25Mの Ca^{+2} 溶液を調製する。この溶液のpHを、0.1MのNaOHを使用してpH11に調製する。蒸留水(10mL)にリン酸二水素カリウム(0.75g)を溶かすことにより、この塩(KH_2PO_4)の0.74M溶液を調製する。この溶液に、二官能性PEG, α -フェニルカルボキシエステル, ω -ホスホリルのPEG5000 1.75gを加える。0.1MのNaOHを用いて、pHをpH11に調整する。リン酸二水素カリウム/リン酸PEG溶液を、 CaCl_2 の激しく攪拌されている溶液に滴加する。一粒子光学サイジング及び光学顕微鏡使用により、生じる沈殿物をサイズ調整する。粒子の直径は、約1から2 μm の範囲内である。粒子を濾過し、通常生理食塩水に再懸濁させ、フェニル基を、カルボキシ基から除去する。カルボキシ基を、1,1-カルボニルジイミダゾールで活性化し、これを、ELAMに特異的なモノクローナル抗体と反応させる。Kohler-Milstein(Nature 1975, 256:495、この記載をここでは全て、参照して援用する)の方法による慣用の技術により、モノクローナル抗体を調製する。粒子を、プルロニックF-68の溶液(20mg/mL)に懸濁させ、この懸濁液を適切な容器に導入し、凍結乾燥する。容器のヘッドスペースを、ペルフルオロプロパンガスを用いて、徐々に周囲圧力と平衡させると、ヒドロキシアパタイトガラスレートが得られよう。

【0451】

実施例42

ラットでのインビボ実験を行ったが、これにより、細胞内に遺伝子物質を輸送するための実施例3のカチオン脂質化合物の高い有効性を証明する。この実験によりさらに、遺伝子物質を含有するベシクル組成物で、インビボで特定組織をターゲティングするために超音波エネルギーを使用することの有効性も証明する。 β -ガラクトシダーゼ遺伝子を含有するプラスミドpSV β -gal(Promega, Madison, WI)及び実施例3で調製されたカチオン脂質化合物を、混合により組み合わせた。生じた混合物を、尾静脈を介して、3匹の各SDラット(ラット(A)、(B)及び(C))に注入した。ラット(A)には、超音波を受けさせなかった。各ラット(B)及び(C)に注入している間に、超音波エネルギーを、後肢の内側に適用した。48時間後、ラットを安楽死させ、組織を切除した。組織を、ホルマリン2%中で72時間固定し、薄くスライスし、X-gal溶液に中に入れた。37℃での16時間後、組織を検査した。ラット(A)からの組織は、青色を示し、これは、通常の移入を示している。ラット(B)及び(C)からの組織は、超音波エネルギーが適用された部位でのみ、青色を示した。このことは、遺伝子発現の局在を、本発明の化合物及び方法により達成することができることを示している。

【0452】

実施例43

新鮮なヒトの血液をガーゼストリップ(Tillotson Health Care, Bedford, NH)に塗布し、血餅にした。Tygon管を、1%アガロース(Boehringer Mannheim Biochemical, Indianapolis, Indiana)スタンドオフパッド(standoff pad)に入れた。血餅を支持するストリップを、Tygon管に挿入する。インライン混合素子(Cole-

10

20

30

40

50

Parmer、Chicago、IL)も管に挿入して、乱流を生じさせた。MasterFlex ぜん動性ポンプ(Cole-Parmer)を使用して、リン酸緩衝生理食塩水(Boehringer Mannheim Biochemical)をガーゼストリップにポンプで流した。7.5MHz末梢血管トランスデューサを備えたAcoustic Imaging 5200 超音波装置(Phoenix、AZ)を使用して、超音波撮像を実施した。トランスデューサをリングスタンドに固定し、スタンドオフパッドの下から撮像を実施した。ストリップから、未結合の血餅を洗浄した後に、GPIIb/IIIaをターゲットとするターゲット化ベシクル組成物各1mL及び実施例6からのベシクル組成物(非ターゲット化)を、約2mL/分の流速で、PBS流に注入した。この速度で2分間、ベシクルを結合させ、次いで、流速を、6mL/分に変えて、未結合のベシクルを除去した。6mL/分で洗浄した後に、ターゲットベシクルはガーゼストリップに結合し、非ターゲットベシクルは洗い流された。超音波撮像により、GPIIb/IIIaに対してターゲット化されたベシクルでは、血餅での高いエコー源性が明らかになった。

10

【0453】

Macintosh 660 AV コンピュータ(Apple Computing、Cupertino、CA)を使用して、ビデオデンシトメトリー分析(Videositometric Analysis)をオフラインで行った。血餅の全領域を選択し、ビデオデンシトメトリー単位を測定した。Image 1.55(National Institutes of Health、Washington、DC)を使用して、映像を捕捉し、分析した。

20

【0454】

表 4

ターゲット化ベシクルの長音波後方散乱定量のビデオデンシトメトリー分析

連続的撮像				
	ターゲット化ベシクル (洗浄前)	非ターゲット化ベシクル (洗浄前)	ターゲット化ベシクル (洗浄後)	非ターゲット化ベシクル (洗浄後)
	28.46	17.64	46.01	16.5
	18.44	13.36	39.48	14.44
	14.44	7.62	17.22	7.58
	40.94	16.97	32.85	12.95
	22.86	6.81	19.52	8.08
平均値	25.57	13.9	33.89	12.87
StDev	11.82	4.59	12.34	3.81
間欠的撮像				
	ターゲット化ベシクル (洗浄前)	非ターゲット化ベシクル (洗浄前)	ターゲット化ベシクル (洗浄後)	非ターゲット化ベシクル (洗浄後)
	16.6	12.06	17.83	12.14
	15.47	16.55	20.35	13.7
	19.32	16.13	21.79	16.35
	20.12	--	22.41	8.68
	17.29	13.7	24.15	13.41
平均値	17.88	14.91	20.6	12.72
StDev	2.2	2.48	2.04	3.2

この分析は、コントラスト後映像と共に、コントラスト前ベースライン映像をコレクションし、スーパーインポーズすること、さらにコントラスト後映像からコントラスト前映像をサブトラクションすることを必要とした。このコレクション、スーパーインポーズ及びサブトラクションを、未結合のベシクルを除去するための洗浄の前後にも行った。連続的及び間欠的超音波の両方を使用して、このビデオデンシトメトリー分析を行った。この分析で得られたデータを、次の表に記載するが、数値が大きいほど、コントラストが改善されたことを示している。

【0455】

上の表の考察により、非ターゲット化ベシクルに比較して、ターゲット化ベシクルからの後方散乱が高いことは明らかである。T検定を行ったが、これにより、連続的でも間欠的撮像でも $p < 0.01$ で、非ターゲット化ベシクルに比較して、ターゲット化ベシクルで

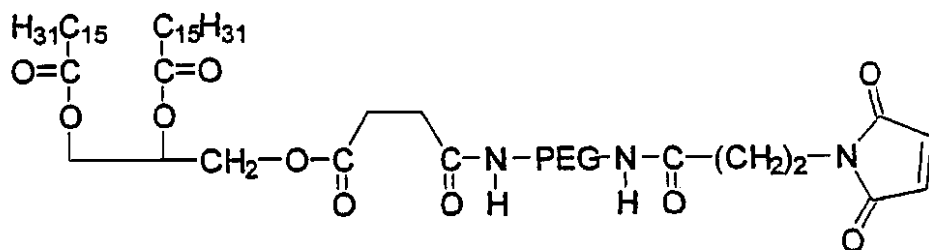
は、ビデオ密度 (video density) 信号で著しい増加が証明された。

【0456】

実施例 4 4

この実施例は、次式を有する DPGS-NH-PEG-NH-マレイミドの調製を対象としている。

【化51】

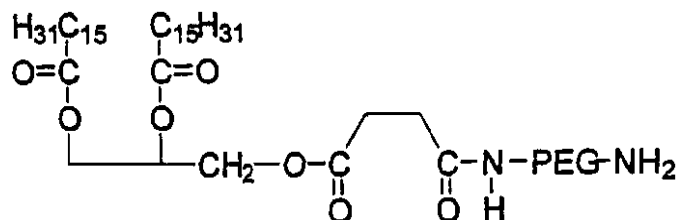


10

【0457】

A. ジパルミトイルグリセロールスクシネート-ポリエチレングリコール-アミン (DPGS-NH-PEG-NH₂) の調製

【化52】



20

丸底フラスコ (100 mL) 中に、DPGS (98 mg、0.147 mmol、1 当量) の CH₂Cl₂ 溶液を加えた。別の丸底フラスコ (100 mL) 中に、H₂H-PEG-NH₂ (PEG-ジアミン) (50 mg、0.147 mmol、1 当量) の CH₂Cl₂ 溶液を加えた。PEG-ジアミン溶液に直ちに、DCC (31 mg、0.15 mmol、1.02 当量) の CHCl₃ (5 mL) 溶液を加えた。DCC 及び PEG-ジアミンからなる生じた混合物を、約 0 から約 5 °C で、DPGS に滴加した。生じた反応混合物を、攪拌しながら室温と平衡させた。24 時間の攪拌の後に、蒸留脱イオン水 (50 mL) を、反応混合物に加え、生じた白色の沈殿物 (ジシクロヘキシル尿素) を、濾過により除去した。底部の有機層を、250 mL 分液漏斗を使用して単離し、乾燥させた (Na₂SO₄)。乾燥させた有機溶液を濾過し、CH₃CN (80 mL) を濾液に加えた。生じた白色沈殿物を濾過により除去し、濾液を、真空濃縮すると、DPGS-NH-PEG-NH₂ 0.44 g が固体生成物として得られた。

30

IR: 1700 cm⁻¹。

TLC: R_f 0.65。

【0458】

B. DPGS-PEG-NH-PEG-NH-マレイミドの調製

丸底フラスコ (100 mL) 中に、ステップ A からの DPGS-NH-PEG-NH₂ (0.44 g、0.13 mmol、1 当量) の CH₂Cl₂ (10 mL) 溶液を加えた。この溶液に、トリエチルアミン (13 mg、0.13 mmol、1 当量) の CH₂Cl₂ 溶液を加えた。この混合物に、N-マレオイル-β-アラニン-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル 34.6 mg の CH₂Cl₂ (10 mL) 溶液を滴加した。室温で一晩攪拌した後に、脱イオン蒸留水 (30 mL) を、反応混合物に加え、攪拌を、さらに 3 時間継続した。底部の有機層を、分液漏斗を使用して単離し、乾燥させた (Na₂SO₄)。有機層を濾過し、濾液を真空濃縮すると、表題化合物 360 mg がロウ状の白色の固体として得られた。

40

50

I R : 1740 cm^{-1} 、 1670 cm^{-1} 、 1100 cm^{-1} 。

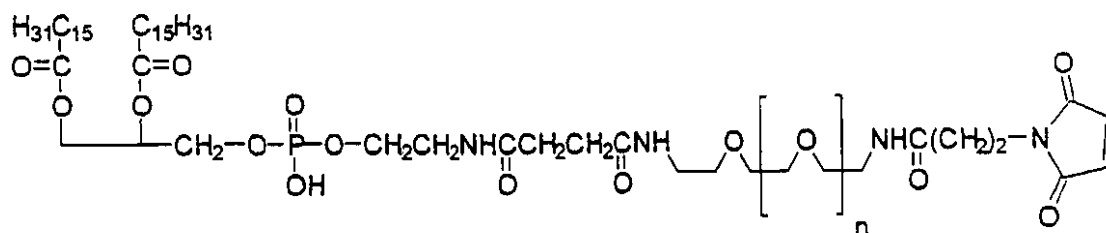
T L C : R_f 0.75。

【0459】

実施例 45

この実施例は、次式を有する 1, 2-ジパルミトイル-s n-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン-N-カルボニルエチレンカルボニル-イミノ-ポリエチレン-グリコールエチルアミノカルボニルエチレンマレイミド (DPPE-NH-PEG-NH-マレイミド) の調製を対象としている。

【化 53】



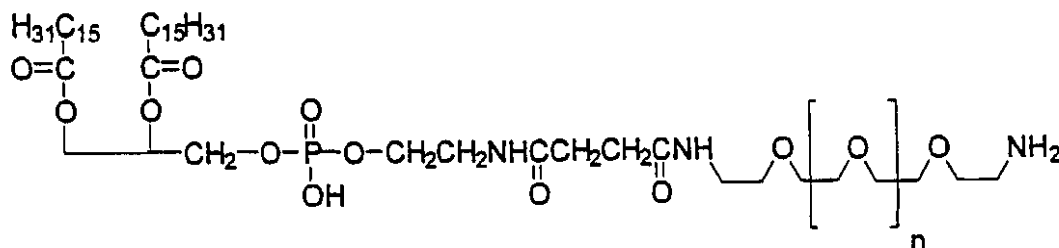
10

【0460】

A. 1, 2-ジパルミトイル-s n-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン-N-カルボニルエチレンカルボニルイミノポリエチレングリコールエチルアミン (DPPE-NH-PEG-NH₂) の調製

20

【化 54】



30

DPPEコハク酸塩 (79 mg) 及び ω , ω' -ジアミノポリエチレングリコール (340 mg) からなる冷 CH_2Cl_2 (20 mL) 溶液 (0 から 5 °C) に、DCC (22 mg) の CH_2Cl_2 (10 mL) 溶液を加える。反応混合物を、0 から 5 °C で 4 時間攪拌し、次いで、室温で一晩攪拌した。水 (10 mL) を加え、反応混合物をさらに 1 時間攪拌した。底部有機層を単離し、真空蒸発器を使用して真空濃縮した。残留物を CH_3CN に溶かし、沈殿物を濾過により除去した。有機溶液を真空濃縮すると、DPPE-NH-PEG-NH-マレイミド 390 mg が白色の固体として得られた。

【0461】

B. DPPE-NH-PEG-NH-マレイミドの調製

ステップ A からの DPPE-NH-PEG-NH₂ (210 mg) 及びトリエチルアミン (20 mg) からなる冷 CH_2Cl_2 (20 mL) 溶液 (0 から 5 °C) に、マレイミドプロピオン酸 N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (26 mg) の CH_2Cl_2 (10 mL) 溶液を加えた。生じた混合物を 0 から 5 °C で 1 時間攪拌し、次いで、室温で一晩攪拌した。水 (10 mL) を加え、生じた混合物を、攪拌しながら希 HCl で pH 3 まで酸性化した。有機層を単離し、水 (10 mL) で洗浄し、乾燥させた (Na_2SO_4)。真空蒸発器を使用して、乾燥するまで真空濃縮すると、表題化合物 (DPPE-NH-PEG-NH-マレイミド) 210 mg が白色の固体として得られた。

40

【0462】

実施例 46

Fab' 又は F (ab')₂ 断片を、脂質-PEG-マレイミド脂質を介して、ガス充填

50

ベシクルに結合した。Pierce (Rockford, IL) からの Fab' 及び/又は F(ab')₂ キットを使用して、抗骨ミオシン (Sigma Chemical, St. Louis, MO) から、Fab' 又は F(ab')₂ 断片を調製した。

【0463】

パパインで抗体を消化することにより、Fab' 断片を調製した。これにより、抗体の Fc 領域から Fab' 断片の両方が分裂する。Fc 断片を次いで、プロテイン A カラムに結合させ、Fab' 断片を集めた。次いで、Fab' 断片を凍結乾燥させ (Labconco Lymph-Lock 12, Kansas City, MO)、脂質-PEG-マレイミド脂質に結合するために調製した。

【0464】

F(ab')₂ 断片を、Fab' 断片と同様に調製した。しかしながら、パパインの代わりに、酵素のペプシンを使用した。ペプシンにより、Fc 領域は分裂し、2つの Fab' 断片が接続したままである。F(ab')₂ 断片を次いで、凍結乾燥させた。

【0465】

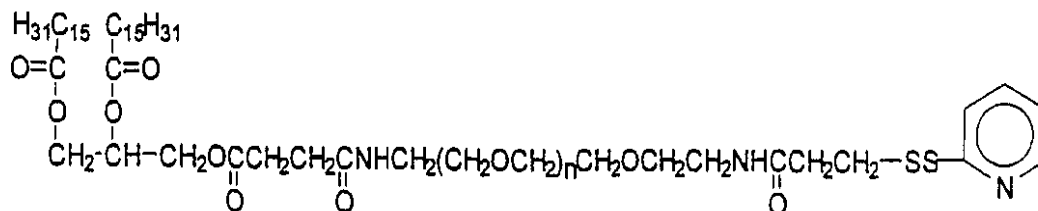
様々な断片を、1 mg/mL の濃度で、カップリング緩衝液 (NaCl 150 mM、MOPS 10 mM、EDTA 0.1 mM、DTPA 50 μM、pH 6.5、物質は全て、Sigma Chemical, St. Louis, MO から得た) 中に再懸濁させることにする。次いで、脂質-PEG-マレイミド脂質 (0.2 から 10 mM) を加え、生じた混合物を 16 時間 4 °C でインキュベーションした。生じた生成物を、ポリアクリルアミド電気泳動ゲルで分析して、Fab' 及び/又は F(ab')₂ 断片が脂質に結合したかどうかを決定する。このことは、分子量の変化を観察することにより決定することができる。次いで、Fab' 又は F(ab')₂ 結合脂質 1 重量% を使用して、ターゲット化ベシクルを調製することとする。

【0466】

実施例 47

この実施例は、次式を有する DPGS-NH-PEG-NH-PDP の調製を対象としている。

【化 55】



【0467】

ジパルミトイルグリセロールスクシネート-ポリエチレングリコール-アミン (DPGS-NH-PEG-NH₂) を、実施例 44、ステップ A での手順を使用して調製した。DPGS-NH-PEG-NH₂ (440 mg、0.13 mmol) 及びトリエチルアミン (13 mg、0.13 mmol) を、CH₂Cl₂ (10 mL) に溶かした。この溶液に、3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸 N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (PDP) (31 mg) の CH₂Cl₂ (10 mL) 溶液を加えた。室温で一晩攪拌した後に、脱イオン水 (30 mL) を、反応混合物に加え、攪拌をさらに 3 時間継続した。底部有機層を、分液漏斗を使用して単離し、乾燥させた (Na₂SO₄)。有機層を濾過し、濾液を真空濃縮すると、表題化合物 (DPGS-NH-PEG-NH-PDP) 360 mg がロウ状の白色の固体として得られた。

【0468】

実施例 48

この実施例は、次式を有する DPPE-NH-PEG-NH-PDP の合成を対象としている。

10

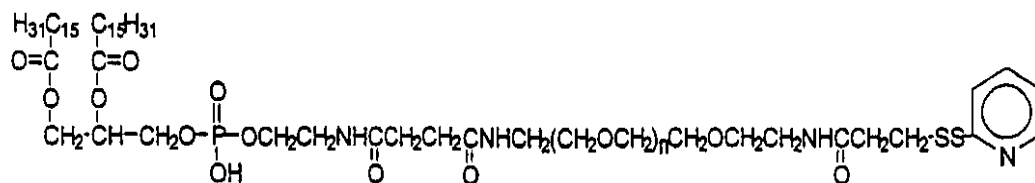
20

30

40

50

【化 5 6】



【 0 4 6 9】

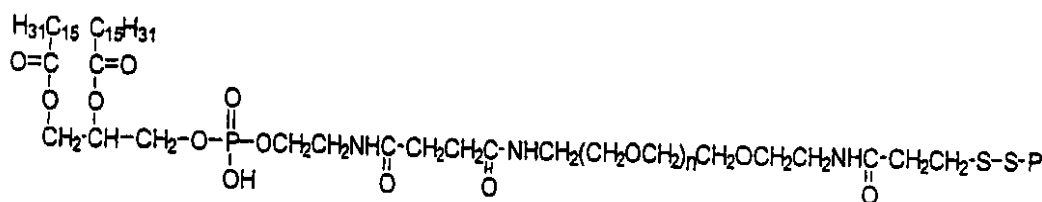
1, 2 ジパルミトイル-sn-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン-N-カルボニルエチレン-カルボニルイミノポリエチレングリコールエチルアミン (DPPE-NH-PEG-NH₂) を、実施例 45、ステップ A に記載されている手順を使用して調製した。この物質 (210 mg) 及びトリエチルアミン (20 mg) を、CH₂Cl₂ (20 mL) 中で混合した。この溶液を、3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸 N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (PDP) (31 mg) の CH₂Cl₂ (10 mL) 溶液に加えた。生じた混合物を、0 から 5℃ で 1 時間攪拌し、次いで、室温で一晩攪拌した。蒸留水 (10 mL) を加え、生じた混合物を、攪拌しながら希 HCl で、pH 3 まで酸性化した。有機層を単離し、水 (10 mL) で洗浄し、乾燥させた (Na₂SO₄)。有機層を濾過し、回転蒸発器を使用して、乾燥するまで真空濃縮させると、表題の化合物 (DPPE-NH-PEG-NH-PDP) 210 mg が白色の固体として得られた。

【 0 4 7 0】

実施例 49

この実施例は、次式を有する、本発明の範囲内の脂質-親水性ポリマー-タンパク質複合体の調製を対象としている。

【化 5 7】



式中、「P」は、-プロテイン A である。

【 0 4 7 1】

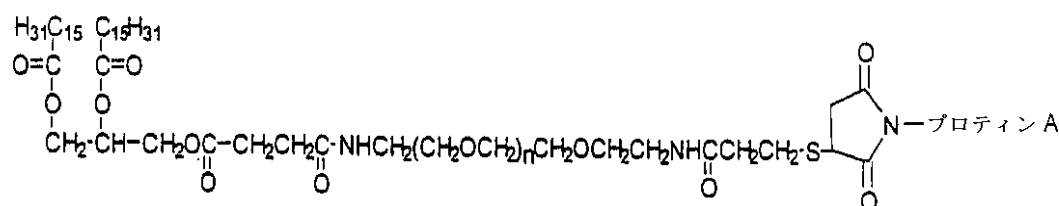
DPPE-NH-PEG-NH-PDP 中の -S-S- ジスルフィド結合のイオウ原子とタンパク質のスルフヒドリル基とを反応させることにより、実施例 48 からの化合物をプロテイン A と架橋させる。生じた化合物は、タンパク質支持リポソームなどのタンパク質支持ベシクルを生じさせる際に利用することができる。

【 0 4 7 2】

実施例 50

この実施例は、次式を有する、本発明の範囲内の脂質-親水性ポリマー-タンパク質複合体の調製を対象としている。

【化 5 8】



【 0 4 7 3】

10

20

30

40

50

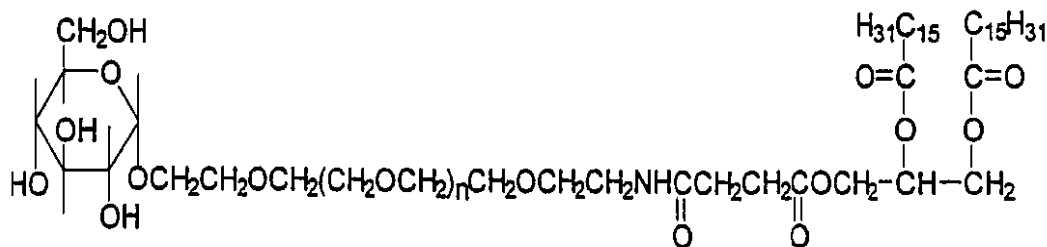
実施例 47 からの化合物 (DPGS-NH-PEG-NH-PDP) を、マレイミド標識されたプロテイン A とカップリングさせると、上式の化合物が得られよう。

【0474】

実施例 51

この実施例は、次式を有する DPGS-NH-PEG-グルコースの調製を対象としている。

【化 59】



10

【0475】

A. NH₂-PEG-グルコースの調製

臭化 2, 3, 4, 6-テトラ-O-ベンジル-α-D-グルコピラノシル (0.6 g) を、C. A. A. van Broeckel and J. H. van Boom, Tetrahedron, 41, 4545 (1985) の手順に従い調製した。ω-トリフルオロアセチルアミノポリエチレングリコール (3.5 g) と混合されている DMF 中で活性化された分子ふるいを使用することにより、混合物の乾燥を開始するが、前者は、ω-アミノポリエチレングリコール及びトリ酢酸無水物及びジイソプロピルエチルアミン (DIEA) (1.2 mL) から調製した。生じた溶液を 4 日間窒素下に攪拌した。溶液を CHCl₃ (150 mL) で希釈し、10% NaHCO₃ (50 mL) 及び水で洗浄した。有機層を真空濃縮し、生じた残留物を炭酸ナトリウムメタノール-H₂O 溶液で、室温で 2 日間処理した。溶剤を真空除去し、残留物を、CHCl₃ で 2 回抽出した。合わせたクロロホルム抽出物を、真空濃縮し、生じた残留物をメタノール中に溶かし、炭素上の 10% パラジウム (0.45 g) 上で、4 気圧及び室温で水素化した。触媒を濾別し、濾液を真空濃縮すると、NH₂-PEG-グルコース (3 g) が白色の固体として得られた。生成物をシリカゲルカラムで精製し、クロロホルム-メタノール-水の定組成溶離剤を用いて溶離した。

20

30

【0476】

B. DPGS-NH-PEG-グルコースの調製

ステップ A からの NH₂-PEG-グルコース (1 g)、トリエチルアミン (0.5 g) 並びにアセトニトリル及び水からなる溶液 (50:50) を混合し、実施例 13A からの DPGS-スクシンイミド (0.15 g) のアセトニトリル (10 mL) 冷溶液 (0~5℃) に加えた。生じた混合物を室温で 2 日間攪拌し、アセトニトリルを蒸発させた。生じた残留物を水で、50 mL まで希釈し、500 MWCO 膜で透析し、凍結乾燥させると、表題化合物 (DPGS-NH-PEG-グルコース) が白色の固体として得られた。

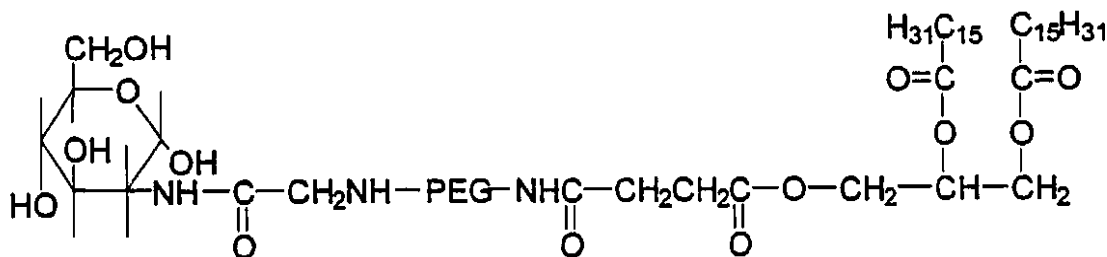
40

【0477】

実施例 52

この実施例は、次式を有する DPGS-NH-PEG-NH-マンノースの調製を対象としている。

【化 60】

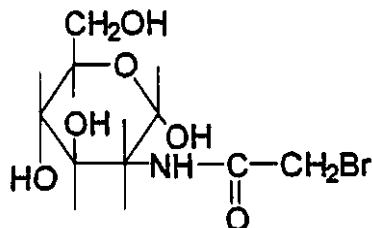


【0478】

A. α-ブromoアセチルアミノ-D-マンノースの調製

10

【化61】



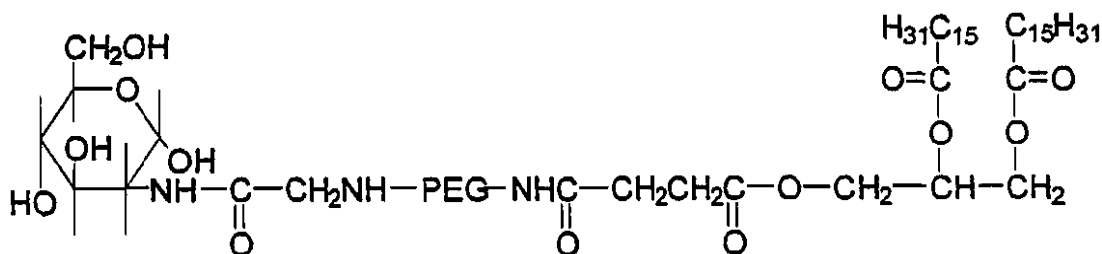
塩酸D-マンノサミン（2.1 g）、トリエチルアミン（3 g）及びDMF（50 mL）を混合し、攪拌しながら、臭化α-ブromoアセチル（2 g）のCH₂Cl₂冷溶液（0～5℃）に加えた。生じた混合物を室温で8時間攪拌し、次いで、氷水（50 mL）中に注いだ。この水性混合物を1時間攪拌し、次いで、乾燥するまで真空濃縮した。生じた残留物を、水及びエタノールの混合物から再結晶させると、α-ブromoアセチルアミノ-D-マンノースが白色の固体（2.1 g）として得られた。

20

【0479】

B. DPGS-NH-PEG-NH-マンノースの調製

【化62】



30

ステップAからのα-ブromoアセチルアミノ-D-マンノース（0.3 g）、実施例44AからのDPGS-NH-PEG-NH₂（4 g）、炭酸ナトリウム（0.2 g）及びKI（20 mg）を、水及びエタノールからなる混合物（1：1）中で混合した。生じた混合物を40℃に8時間加熱した。エタノールを回転蒸発器上で蒸発させ、水性残留物を、500 MWCO膜で透析し、凍結乾燥させると、表題化合物（DPGS-NH-PEG-NH-マンノース）4 gを白色の固体として得た。

40

【0480】

次の実施例は、ターゲット化ベシクルの調製を対象としている。

【0481】

実施例53

アルブミンベシクル（又はアルブミンコートされたガスバブル）を、8を上回るpHを有する緩衝液に懸濁させた。この懸濁液に、CH₃CN中の3-（2-ピリジル）ジチオプロピオン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（SPDP）を、0から5℃で加えた。生じた混合物を室温で2日間インキュベーションし、500 MWCOの膜で透析すると、ピリジルジチオプロピオノイルを支持するアルブミンベシクルが得られた。次いで、

50

マレイミドフェニルブチレート複合抗体 (MPB-AB) を、表面変性アルブミンベシクルと共にインキュベーションすると、アルブミンベシクルに架橋した抗体が得られた。

【0482】

実施例 54

ポリグルタミン酸ベシクル (又はポリグルタミン酸コートされたガスバブル) を、水に懸濁させた。この懸濁液に、水中の N, N-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド塩酸エチル (EDC) を 0 から 5 °C で加える。生じた混合物を穏やかに 4 時間攪拌し、次いで、ペプチド溶液 (pH 8 から 9.5 の緩衝液) を加えた。この混合物を室温で 2 日間インキュベーションし、500 MWCO の膜で透析すると、ペプチド複合ポリグルタミン酸ベシクルが得られた。

10

【0483】

実施例 55

実施例 53 を繰り返したが、ただし、アルブミンベシクルの代わりに、シアノメタクリル酸メチル (2-シアノ-2-プロペン酸、メチルエステル) 及びメタクリル酸 ω-アミノ-テトラエチレングリコリルからなるコポリマーから処方されたベシクルを使用した。

【0484】

実施例 56

この実施例は、脂質-ポリマー-ペプチド複合体及びそのターゲット化ベシクルの調製を対象としている。

【0485】

丸底フラスコに、t-ブチルオキシカルボニル (t-Boc) 保護基を有する α-アミノ、ω-カルボキシ PEG-4000 を 1 当量導入した。これを、N-メチルピロリドン中のカルボニルジイミダゾール (CDI) (1 当量) 及びヒドロキシベンゾトリアゾール (1 当量) を加えることにより活性化した。この溶液に、アミノ末端上で脱保護されているペプチド Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val を加えた。生じた溶液を攪拌し、定期的に、メチレンブルー又はニンヒドリンを用いる分析により、遊離アミノ基に関してチェックした。遊離アミノ末端の証拠がもはや無くなったら、塩化メチレン中のトリフルオロ酢酸を加えることにより、混合物全体の脱保護を実施する。PEG からの遊離アミンを次いで、標準的な方法により単離した。別のフラスコに、DPPE (1 当量) の DMF 溶液及びカルボニルジイミダゾール (1 当量) を導入した。攪拌を、分子ふるい (4

20

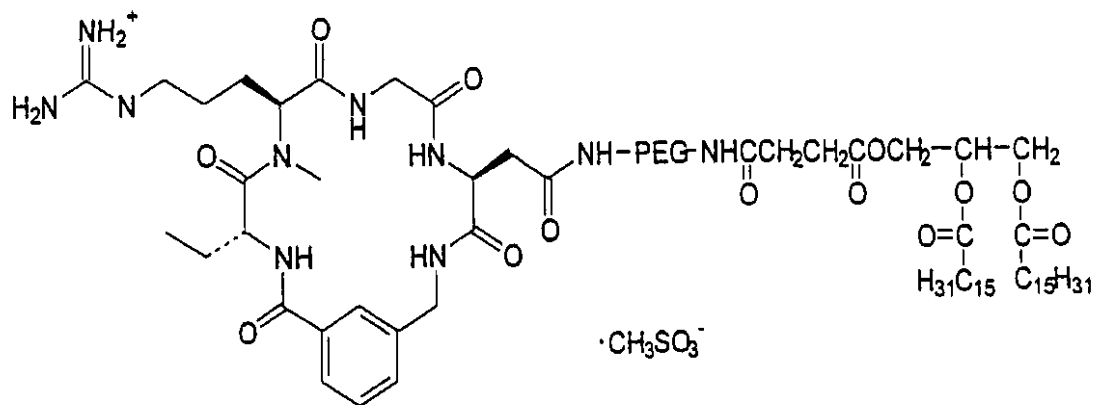
30

【0486】

実施例 57

この実施例は、次式を有する DPGS-PEG-環式ペプチドの調製を対象としている。

【化 63】



10

【0487】

環式 [D-2-アミノブチリル-N-2-メチル-L-アルギニル-グリシル-L-アスパルチル-3-(アミノメチル安息香酸)] を、通常のペプチド合成方法論を使用して調製した。この環式ペプチド 66 mg の水 (20 mL) 溶液に、水 (10 mL) 中の N, N-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド塩酸エチル (EDC) を 0 から 5 °C に加えた。生じた混合物を 0 から 5 °C で 4 時間、続いて室温で 8 時間攪拌した。この溶液に、CH₃CN (10 mL) 中の実施例 44A からの DPGS-NH-PEG-NH₂ (400 mg) を 0 から 5 °C で加えた。室温で一晩攪拌した後に、反応混合物を真空濃縮し、水性残留物を 1000 MWCO 膜を介して透析した。凍結乾燥すると、前記の化合物 (410 mg) が白色の固体として得られた。

20

【0488】

実施例 58

この実施例は、環式ペプチドでターゲット化されたベシクルの調製を対象としている。

【0489】

環式 [D-2-アミノブチリル-N-2-メチル-L-アルギニル-グリシル-L-アスパルチル-3-(アミノメチル安息香酸)] (66 mg) の水 (20 mL) 溶液に、水 (10 mL) 中の N, N-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド塩酸エチル (EDC) を 0 から 5 °C で加えた。生じた混合物を 0 から 5 °C で 4 時間、続いて室温で 8 時間攪拌した。次いで、反応混合物を、アルブミンベシクルの懸濁液に 0 から 5 °C に加えた。生じた混合物を室温で 2 日間インキュベーションし、濾過し、1000 の MWCO を有する膜を使用して透析すると、ポルフィリンターゲットングリガンドでターゲット化されたアルブミンベシクルが得られた。

30

【0490】

実施例 59

実施例 58 を繰り返すが、ただし、アルブミンベシクルの代わりに、シアノメタクリル酸メチル (2-シアノ-2-プロペン酸、メチルエステル) 及び ω-アミノ-テトラエチレングリコリルメタクリレートからなるコポリマーから処方されたベシクルを使用した。

【0491】

実施例 60

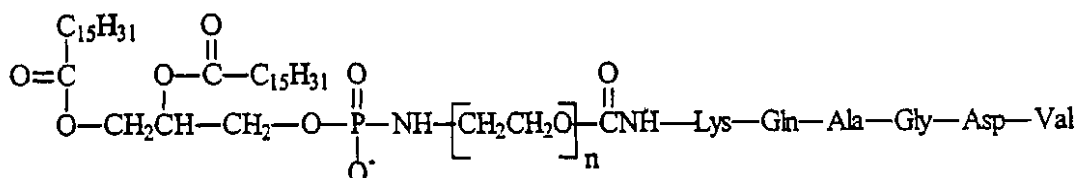
前記の合成方法論を使用して、次の各化合物を調製した。

【0492】

A. 次式を有する DPPA-PEG-KQAGDV

【化 64】

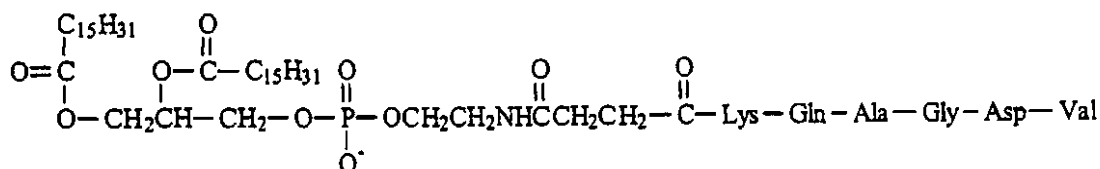
40



【 0 4 9 3 】

B. 次式を有する D P P E - スクシニル - K Q A G D V

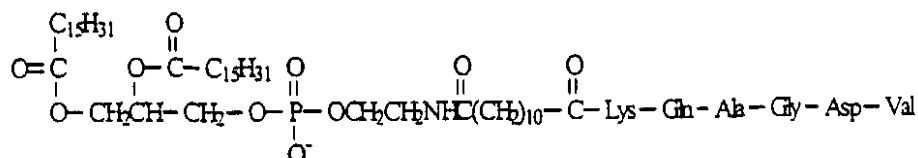
【化 6 5】



【 0 4 9 4 】

C. 次式を有する D P P E - ドデカニル - P E G - K Q A G D V

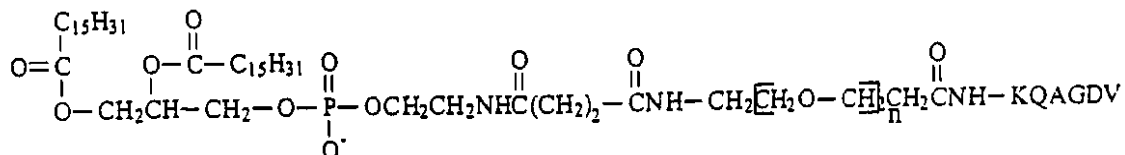
【化 6 6】



【 0 4 9 5 】

D. 次式を有する D P P E - スクシニル - P E G - K Q A G D V

【化 6 7】



[上式中、K Q A G Dは、

【化 6 8】

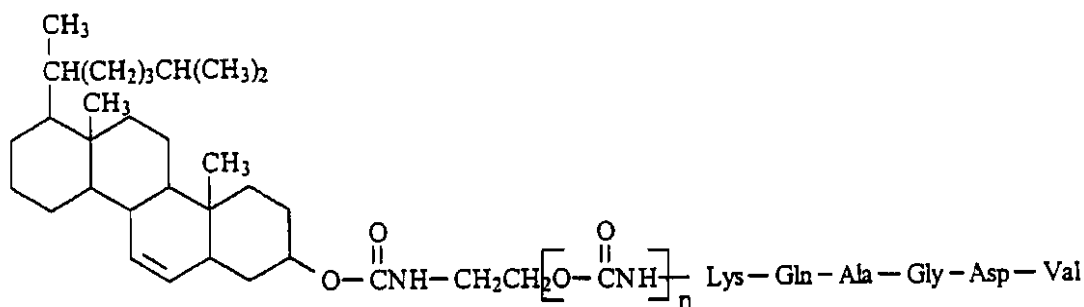
Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val

である]。

【 0 4 9 6 】

E. 次式を有するコレステリル—PEG—KQAGDV

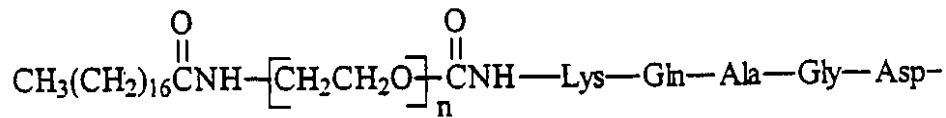
【化 6 9】



【0497】

F. 次式を有するステアロイル-PEG-KQAGDV

【化70】



【0498】

実施例61

10

この実施例は、本発明の範囲内のターゲット化ベシクルの調製を対象としている。

【0499】

ターゲット化脂質DPGS-PEG-KQAGDV（1.25重量%）及び脂質DPPE（6重量%マイナスDPGS-PEG-KQAGDVの重量）、DPPE-PEG5000（40重量%マイナスDPGS-PEG-KQAGDVの重量）及びDPPC（54重量%マイナスDPGS-PEG-KQAGDVの重量）を、蒸発フラスコに導入した。トルエン及びメタノールからなる混合物（60：40v/v）の分量を加えて、脂質を溶かし、フラスコ中の脂質をすすぐ。フラスコを回転蒸発器に置き、フラスコ中の溶液が澄明になるまで、55℃±5℃に加温した。回転蒸発器に真空を適用して、溶液を濃縮すると、粘性なゲルが得られた。次いで、フラスコを磁気攪拌プレートに置き、攪拌棒をフラスコ中に入れた。メチルtertブチルエーテル（MTBE）をフラスコに加えて、固体物質を沈殿させ、固体混合物を25℃±5℃に冷却した。生じた白色の固体を、真空濾過により集め、MTBEで洗浄し、真空炉に入れ、一定の重量になるまで45℃±5℃で少なくとも4時間乾燥させた。ここで検討した手順を使用して、脂質混合物からベシクルを調製した。使用しない場合には、脂質混合物を気密容器中、-15℃±5℃で貯蔵した。

20

【0500】

実施例62

この実施例には、先行技術の造影剤に対する本発明のターゲット化造影剤の比較試験の記載が含まれている。

【0501】

30

試験システム

図1に記載のタイプの試験系を、この実施例では使用した。ポリエチレン管（Pharmed、Cole-Parmer）を、2%寒天oscからなるブロックに通した。寒天は、寒天を水中で加熱し、プラスチック製鋳型（寸法=8cm×10cm）に注ぐことにより調製されたブロックであった。寒天oscは、Boehringer Mannheim（Indianapolis、Indiana）から購入した。Master-Flex、Cole-Parmerポンプにより、ぜん動流を生じさせた。正常な男性ボランティアからヒトの血液を採取し、この血液を、綿パイピング物質上で血餅にし、ナイロンフィラメントが備え付けられている#6ゲージ釣り針に固定した。ナイロンフィラメントを、ポリエチレン管血餅に通して、血餅が、寒天ブロック内の管の中央に位置するようにした。造影剤を、血餅の上流から注入し、ポンプを使用して、生理食塩水を、血餅を越して1ml当たり50ccの速度で30秒間循環させ、その後、速度を、1分当たり150ccの速度まで高めた。直線アレー第2調波トランスデューサ（2から4MHz）を使用して、基本モードで運転して、Sonos model No. 5500 Hewlett Packard臨床超音波装置を用いて、超音波撮像を行った。超音波を、血餅に向けられているトランスデューサの焦点帯域で、0.2の機械指数で連続的に行った。該当領域を、血餅上に当て、シグナル強度を、造影剤の注入前、造影剤の注入後2分後から5分後まで測定した。

40

【0502】

比較試験で使用された造影剤

50

10

20

20

30

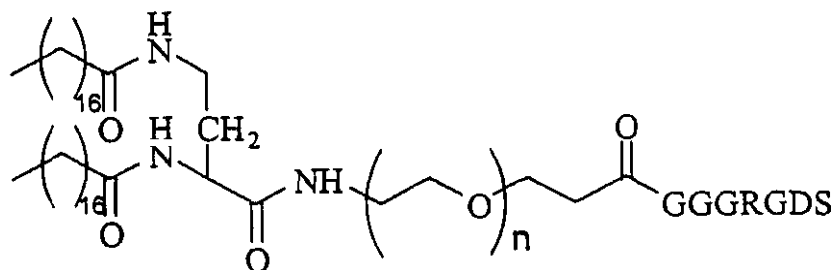
30

40

40

40

50



[上式中、nは、約60から約80の整数である。]

【0506】

試薬

次の試薬を、この実施例では使用した。

Fmoc保護基を除去するために、1-メチル-2-ピロリドン(NMP)中の20%ピペリジン(v/v)。

カップリング剤：NMP中、1Mの1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)；NMP中、1MのN,N'-ジイソプロピルカルボ(corb)ジイミド(DIC)。

洗浄溶剤：ジクロロメタン；メタノール。

樹脂：N-(9-フルオレニルメトキシカルボニル)-保護(Fmoc)アミノ酸Wang樹脂。 10

Kaiser試薬：1mMの水性KCN 2mlをピリジンで100mlまで希釈；無水エタノール10ml中のニンヒドリン500mg；無水エタノール20ml中のフェノール80g。

【0507】

1級アミンを試験するために、少量のペプチド樹脂を、小さい試験管に入れる。それぞれKaiser試薬2滴を加え、試験管を、油浴中に2分間置く。澄明な黄色の溶液は、1級アミンに対する強い陰性反応を示しているが、暗青色溶液(ニンヒドリン陽性)は、1級アミンに対する強い陽性反応を示している。

【0508】

20

手順

Fmoc-L-Serine Wang樹脂から開始し、20%ピペリジン/NMP溶液を使用して、Fmoc保護基を、アミノ酸-樹脂から脱離させた。20分後、Kaiser(ニンヒドリン)試薬を使用して、樹脂を遊離アミン基に関して試験した。暗青色結果が観察された。ジクロロメタン及びメタノールでの交互洗浄を使用して、樹脂を洗浄した。次いで、配列(Asp)中の次のアミノ酸の3当量を固体として加え、続いて、それぞれ3当量の1MのHOBT/NMP及び1MのDIC/NMP溶液を加えた。樹脂を被覆するために十分なNMPを加えた。攪拌のために、N₂ガスを反応容器の底部から約1時間バブル導入した。次いで、前記のようなジクロロメタン及びメタノールでの交互洗浄を使用して、樹脂を洗浄した。別のKaiser試験を行ったが、これは、予測されたように、陰性(黄色)であった。 30

【0509】

次いで、前記のステップを、GGGRGDSペプチド配列が完了するまで、次のアミノ酸基それぞれで繰り返した。

【0510】

次いで、末端Fmoc基を、ピペリジン溶液を用いて最後のアミノ酸から除去した。被覆するために十分なNMPと共に、さらにそれぞれ3当量の1MのHOBT/NMP及び1MのDIC/NMP溶液と共に、1当量のFmoc- α -アミノ、 ω -カルボキシーPEG3400を加えた。反応を24時間から72時間進行させた。さらなるHOBT(固体)及びDIC(未希釈)をほぼ24時間目に加えた。PEG溶液を排出させ、貯蔵し、樹脂を洗浄し、次いで、N₂上で乾燥させた。増量を使用して、カップリングが進行したと判定した。次いで、処理前に樹脂を無水酢酸及びトリエチルアミンでキャップした。 40

【0511】

3当量のN-ビス-Fmoc-L-2,4-ジアミノブチル酸(Fmoc-DAB(Fmoc)-OH)及びそれぞれ3当量の1MのHOBT/NMP及び1MのDIC/NMP溶液を加え、2から4時間反応させた。ニンヒドリン陰性を確認するために、Kaiser試薬でさらにチェックした後、反応溶液を濾別し、樹脂を洗浄した。

【0512】

次いで、Fmoc基をピペリジン溶液で除去した。Kaiser試薬でのチェックにより再び、ニンヒドリン陽性が示された。次いで、N,N'-ジメチルホルムアミド(DMF) 50

に溶解された6当量のステアリン酸を加えた。さらに、6当量の1MのHOB T / N M P及び1MのD I C / N M P溶液を加えた。数時間後、過剰のステアリン酸を洗浄した。最終洗浄及びK a i s e r試薬での試験の後に、生成物は再び、予測されたようにニンヒドリン陰性であった。

【0513】

樹脂からの分離及び精製

攪拌しながら、樹脂をトリフルオロ酢酸及び水の溶液（90：10、v：v）に加えた。樹脂を15～20分間攪拌し、樹脂を目の粗いガラス漏斗で濾過した。次いで、濾液を水で希釈し、水性NaOH（約1から5N）で約pH7に中和した。これを、1000分画分子量（M W C O）透析バッグで透析して、低分子量副生成物を除去した。濾液を、乾燥するまで真空濃縮した。次いで、生成物を、適切な溶剤に溶かし、H₂O：メタノール勾配を使用するV y d a c、T P - 1 0 1 0 C - 1 8逆相カラムで精製した。精製された生体複合体を、M A L D I質量分析法、N M R及びアミノ酸分析により同定した。

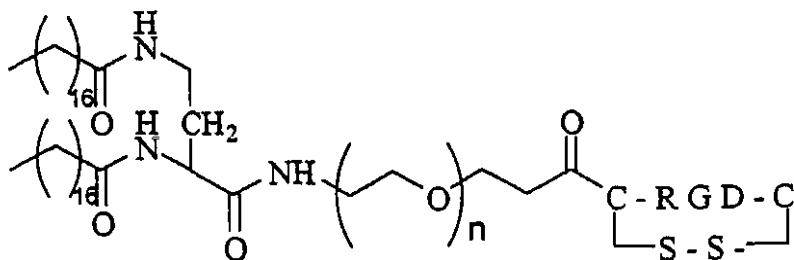
10

【0514】

実施例64

この実施例は、次式を有する本発明の生体複合体であるN，N'-ジステアロイルルージアミノブチル-PEG3400-CRGDCの合成を記載している。

【化72】



20

【0515】

この合成は、実施例63に記載の手順と同様の手順に従うが、ただし、トリフルオロ酢酸を用いる分離は、捕捉剤（即ち、フェノール、エタンジチオール及びチオアニソール）を伴うか、これを使用する。さらに、濾過し、真空濃縮した後に、生成物をpH8に調整し、この混濁した溶液に、0.01Nのフェリシアン化カリウムK₃Fe(CN)₆（A l d r i c h、M i l w a u k e e、W i s.）を滴加した。次いで、樹脂を目の粗いガラス漏斗で濾過し、濾液を1000M W C Oスペクトル / P o r（登録商標）透析膜（S p e c t r u m L a b o r a t o r i e s, I n c.、R a n c h o D o m i n g u e z、C a l i f. 90220-6435）で透析した。次いで、生成物を適切な溶剤に溶かし、H₂O：メタノール勾配を使用するV y d a c、T P - 1 0 1 0 C - 1 8逆相カラムで精製した。精製された生体複合体を再び、M A L D I質量分析法、N M R及びアミノ酸分析により同定した。

30

【0516】

実施例65

この実験は、実施例63に記載の生体複合体を利用するターゲット化ベシクル組成物のインビトロ試験を記載している。

40

【0517】

実施例63の生体複合体を含むターゲット化脂質ベシクルを、D P P C（82モル%）、D P P E - P E G 5 0 0 0（8モル%）及びD P P A（8モル%）からなる乾燥脂質混合物及び実施例63からの化合物を使用して処方した。物質を95：5重量%比（脂質ブレンド：生体複合体）で混合し、凍結乾燥させた。次いで、物質を5mg / mlで、8：1：1の通常生理食塩水：プロピレングリコール：グリセロールに再懸濁させ、バイアル1個当たり1.5mlで2ml血清バイアルに入れた。ヘッドスペースを、ペルフルオロブ

50

ロパンに代えた。次いで、変更された歯科用アマルガム機上で、4200rpmで60秒間（ESPE、Secfeld、ドイツ）、バイアルを振盪すると、実施例63の生体複合体を含有するペルフルオロプロパンガス充填ターゲット化ベシクルを含有する組成物が生じた。

【0518】

マイクロバブルのサイズ及び濃度を、Accusizer Model No. 770粒子寸法測定器（Particle Sizing Systems、Goleta、California）で求めた。ガス充填ベシクルは、実施例62で製造されたものと同様のサイズを有し、平均直径は約2ミクロンであり、粒子濃度は1mL当たりバブル約15億個であった。

10

【0519】

実施例62に記載されている試験システムを使用した。得られた画像を、図5に示す。ベースライン映像を最初に得た（図5C）。次いで、実施例63からのターゲット化ベシクル処方物（0.5mL）を、1分あたり6mLの流速設定で注入した。流速を、この速度で、30秒間維持した。次いで、流速を、1分あたり30mLまで2分間高め、次いで、1分あたり6mLに戻して、図5Dに示されている映像を得た。投与前及び非ターゲット化ベシクル処方物で行われた対照の両方に比較して、血餅吸収ファントムの優れた可視化が得られた（図5B）。この実験により、本発明の生体複合化合物及びターゲット化ベシクル組成物を使用すると、血栓の優れた可視化が得られることが証明されている。

【0520】

本明細書で引用又は記載されている各特許、特許出願及び刊行物の記載をここでは全て、参照して援用する。

20

【0521】

ここに記載されている変更に加えて、本発明の様々な変更が、前記の記載から、当技術分野の専門家には明らかであろう。このような変更も、添付の請求項の範囲内に該当するものとする。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明の実施形態による造影剤をインビトロで評価するためのシステムの略図を示す図である。

30

【図2】

先行技術の造影剤に暴露する前及びその後の、インビトロでの血餅の超音波シグナル強度の痕跡を示すグラフである。

【図3】

本発明の実施形態による造影剤に暴露する前及びその後の、インビトロでの血餅の超音波シグナル強度の痕跡を示すグラフである。

【図4】

本発明の別の実施形態による造影剤に暴露する前及びその後の、インビトロでの血餅の超音波シグナル強度の痕跡を示すグラフである。

【図5】

本発明によるベシクル組成物及び先行技術による造影剤を投与する前及びその後の、血餅吸収ファントムの超音波映像を示す写真である。本発明の方法及び組成物を使用すると、血餅の位置及び範囲の可視化に著しい改善が観察された。

40

【図5A】

造影剤を投与する前の血餅吸収ファントムのベースライン超音波映像の写真である。

【図5B】

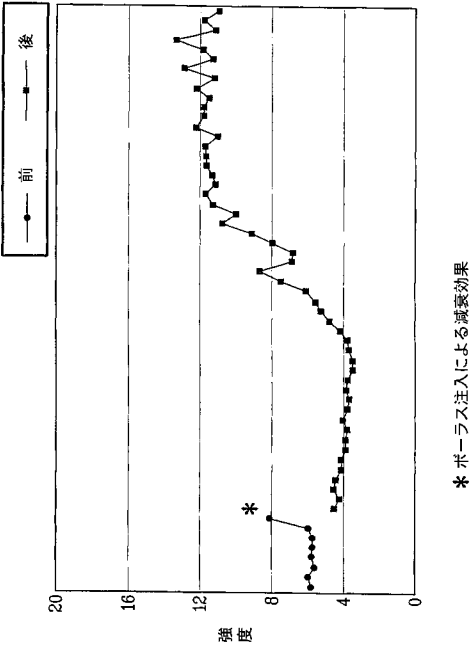
先行技術の非ターゲット化ベシクル造影剤を投与した後の図5Aでのファントムの超音波映像の写真である。

【図5C】

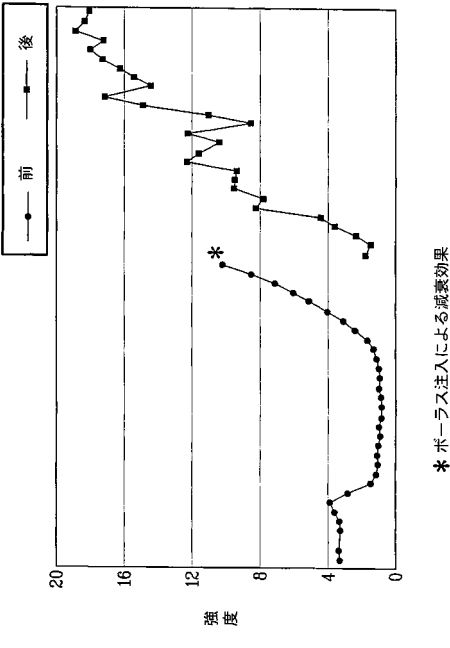
造影剤を投与する前の、血餅吸収ファントムの繰り返しベースライン超音波映像の写真で

50

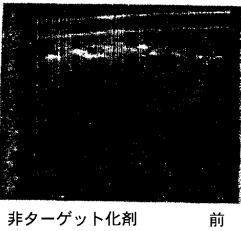
【図 3】



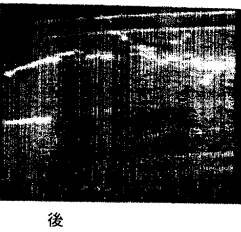
【図 4】



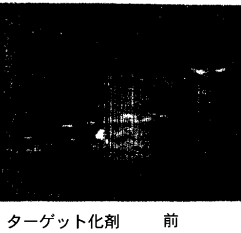
【図 5 A】



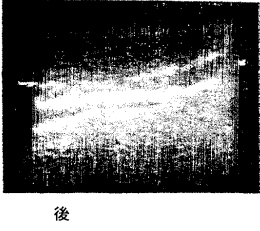
【図 5 B】



【図 5 C】



【図 5 D】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
10 May 2002 (10.05.2002)

PCT

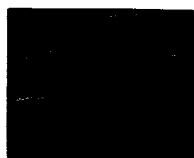
(10) International Publication Number
WO 02/36161 A2

- (51) International Patent Classification⁷: A61K 41/00, (US). SCHUMANN, Patricia, A.; 3560 North Camino De Oeste, Tucson, AZ 85745 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/32308 (74) Agents: MILLER, Suzanne, E. et al.; Woodcock Washburn Kurtz Mackiewicz & Norris LLP, 46th Floor, One Liberty Place, Philadelphia, PA 19103 (US).
- (22) International Filing Date: 17 October 2001 (17.10.2001)
- (25) Filing Language: English (81) Designated States (national): AU, CA, JP.
- (26) Publication Language: English (84) Designated States (regional): European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (30) Priority Data: 09/699,679 30 October 2000 (30.10.2000) US
- (71) Applicant: IMARX THERAPEUTICS, INC. [US/US]; 1635 East 18th Street, Tucson, AZ 85719 (US).
- (72) Inventors: UNGER, Evan, C.; 13365 E. Camino La Ce- badilla, Tucson, AZ 85749 (US). MATSUNAGA, Terry, O.; 3370 North Calle De Catalina, Tucson, AZ 85749
- Published: — without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: NOVEL TARGETED COMPOSITIONS FOR DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC USE



Nontargeted agent Pre



Post



Targeted agent Pre



Post

(57) Abstract: Novel targeted compositions which may be used for diagnostic and therapeutic use. The compositions may comprise lipid, protein or polymer gas-filled vesicles which further comprise novel compounds of the general formula L-P-T, wherein L comprises a hydrophobic compound, P comprises a hydrophilic polymer, and T comprises a targeting ligand which targets tissues, cells or receptors, including myocardial cells, endothelial cells, epithelial cells, tumor cells and the glycoprotein GPIIb/IIIa receptor. The compositions can be used in conjunction with diagnostic imaging, such as ultrasound, as well as therapeutic applications, such as therapeutic ultrasound.

WO 02/36161 A2

WO 02/36161

PCT/US01/32308

**NOVEL TARGETED COMPOSITIONS
FOR DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC USE**

Field of the Invention

The present invention relates to novel targeted compositions and the use thereof. More particularly, the present invention relates to novel compounds and targeted compositions comprising those compounds, and methods for using those compositions for diagnostic imaging and/or for the administration of bioactive agents.

Background of the Invention

A variety of imaging techniques have been used to diagnose diseases. Included among these imaging techniques is X-ray imaging. In X-rays, the images produced reflect the different densities of structures and tissue in the body of the patient. To improve the diagnostic usefulness of this imaging technique, contrast agents may be employed to increase the density of tissues of interest relative to surrounding tissues. Examples of such contrast agents include, for example, barium and iodinated compounds, which may be used for X-ray studies of the gastrointestinal region, including the esophagus, stomach, intestines and rectum. Contrast agents may also be used for computed tomography (CT) and computer assisted tomography (CAT) studies to improve visualization of tissue of interest, for example, the gastrointestinal tract. Magnetic resonance imaging (MRI) is another imaging technique which, unlike X-rays, does not involve ionizing radiation. MRI may be used for producing cross-

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 2 -

sectional images of the body in a variety of scanning planes such as, for example, axial, coronal, sagittal or orthogonal. MRI employs a magnetic field, radio frequency energy and magnetic field gradients to make images of the body. The contrast or signal intensity differences between tissues mainly reflect the T1 (longitudinal) and T2 (transverse) relaxation values and the proton density, which generally corresponds to the free water content, of the tissues. To change the signal intensity in a region of a patient by the use of a contrast medium, several possible approaches are available. For example, a contrast medium may be designed to change either the T1, the T2 or the proton density.

Generally speaking, MRI requires the use of contrast agents. If MRI is performed without employing a contrast agent, differentiation of the tissue of interest from the surrounding tissues in the resulting image may be difficult. In the past, attention has focused primarily on paramagnetic contrast agents for MRI. Paramagnetic contrast agents involve materials which contain unpaired electrons. The unpaired electrons act as small magnets within the main magnetic field to increase the rate of longitudinal (T1) and transverse (T2) relaxation. Paramagnetic contrast agents typically comprise metal ions, for example, transition metal ions, which provide a source of unpaired electrons. However, these metal ions are also generally highly toxic. In an effort to decrease toxicity, the metal ions are typically chelated with ligands.

Metal oxides, most notably iron oxides, have also been employed as MRI contrast agents. While small particles of iron oxide, for example, particles having a diameter of less than about 20 nm, may have desirable paramagnetic relaxation properties, their predominant effect is through bulk susceptibility. Nitroxides are another class of MRI contrast agent which are also paramagnetic. These have relatively low relaxivity and are generally less effective than paramagnetic ions.

The existing MRI contrast agents suffer from a number of limitations. For example, increased image noise may be associated with certain contrast agents, including contrast agents involving chelated metals. This noise generally arises out of intrinsic peristaltic motions and motions from respiration or cardiovascular action. In addition, the signal intensity for contrast agents generally depends upon the concentration of the agent as well as the pulse sequence employed. Absorption of contrast agents can complicate interpretation of the images, particularly in the distal portion of the small intestine, unless

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 3 -

sufficiently high concentrations of the paramagnetic species are used. See, e.g., Kommesser et al., *Magnetic Resonance Imaging*, 6:124 (1988).

Other contrast agents may be less sensitive to variations in pulse sequence and may provide more consistent contrast. However, high concentrations of particulates, such as ferrites, can cause magnetic susceptibility artifacts which are particularly evident, for example, in the colon where the absorption of intestinal fluid occurs and the superparamagnetic material may be concentrated.

Toxicity is another problem which is generally associated with currently available contrast agents, including contrast agents for MRI. For example, ferrites often cause symptoms of nausea after oral administration, as well as flatulence and a transient rise in serum iron. The gadolinium ion, which is complexed in Gd-DTPA, is highly toxic in free form. The various environments of the gastrointestinal tract, including increased acidity (lower pH) in the stomach and increased alkalinity (higher pH) in the intestines, may increase the likelihood of decoupling and separation of the free ion from the complex.

Ultrasound is another valuable diagnostic imaging technique for studying various areas of the body, including, for example, the vasculature, such as tissue microvasculature. Ultrasound provides certain advantages over other diagnostic techniques. For example, diagnostic techniques involving nuclear medicine and X-rays generally involves exposure of the patient to ionizing electron radiation. Such radiation can cause damage to subcellular material, including deoxyribonucleic acid (DNA), ribonucleic acid (RNA) and proteins. Ultrasound does not involve such potentially damaging radiation. In addition, ultrasound is relatively inexpensive relative to other diagnostic techniques, including CT and MRI, which require elaborate and expensive equipment.

Ultrasound involves the exposure of a patient to sound waves. Generally, the sound waves dissipate due to absorption by body tissue, penetrate through the tissue or reflect off of the tissue. The reflection of sound waves off of tissue, generally referred to as backscatter or reflectivity, forms the basis for developing an ultrasound image. In this connection, sound waves reflect differentially from different body tissues. This differential reflection is due to various factors, including the constituents and the density of the particular tissue being observed. Ultrasound involves the detection of the differentially

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 4 -

reflected waves, generally with a transducer that can detect sound waves having a frequency of one megahertz (MHZ) to ten MHZ. The detected waves can be integrated into an image which is quantitated and the quantitated waves converted into an image of the tissue being studied.

5 As with the diagnostic techniques discussed above, ultrasound also generally involves the use of contrast agents. Exemplary contrast agents include, for example, suspensions of solid particles, emulsified liquid droplets, and gas-filled bubbles. See, e.g., Hilmann et al., U.S. Patent No. 4,466,442, and published International Patent Applications WO 92/17212 and WO 92/21382. Widder et al., published application EP-A-
10 0 324 938, discloses stabilized microbubble-type ultrasonic imaging agents produced from heat-denaturable biocompatible protein, for example, albumin, hemoglobin, and collagen.

The quality of images produced from ultrasound has improved significantly. Nevertheless, further improvement is needed, particularly with respect to images involving vasculature in tissues that are perfused with a vascular blood supply.
15 Accordingly, there is a need for improved ultrasound techniques, including improved contrast agents which are capable of providing medically useful images of the vasculature and vascular-related organs.

The reflection of sound from a liquid-gas interface is extremely efficient. Accordingly, bubbles, including gas-filled bubbles, are useful as contrast agents. The term
20 "bubbles", as used herein, refers to vesicles which are generally characterized by the presence of one or more membranes or walls surrounding an internal void that is filled with a gas or precursor thereto. Exemplary bubbles include, for example, liposomes, micelles and the like. As discussed more fully hereinafter, the effectiveness of bubbles as contrast agents depends upon various factors, including, for example, the size and/or elasticity of
25 the bubble.

With respect to the effect of bubble size, the following discussion is provided. As known to the skilled artisan, the signal which is reflected off of a bubble is a function of the radius (r^6) of the bubble (Rayleigh Scatterer). Thus, in the frequency range of diagnostic ultrasound, a bubble having a diameter of 4 micrometer (μm) possesses about
30 64 times the scattering ability of a bubble having a diameter of 2 μm . Thus, generally speaking, the larger the bubble, the greater the reflected signal.

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 5 -

However, bubble size is limited by the diameter of capillaries through which the bubbles must pass. Generally, contrast agents which comprise bubbles having a diameter of greater than 10 μm can be dangerous since microvessels may be occluded. Accordingly, it is desired that greater than about 99% of the bubbles in a contrast agent

5 have a diameter of less than 10 μm . Mean bubble diameter is important also, and should be greater than 1 μm , with greater than 2 μm being preferred. The volume weighted mean diameter of the bubbles should be about 7 to 10 micrometer.

The elasticity of bubbles is also important. This is because highly elastic bubbles can deform, as necessary, to "squeeze" through capillaries and/or to permit the

10 flow of blood around the bubbles. This decreases the likelihood of occlusion. The effectiveness of a contrast agent which comprises bubbles is also dependent on the bubble concentration. Generally, the higher the bubble concentration, the greater the reflectivity of the contrast agent.

Another important characteristic which is related to the effectiveness of

15 bubbles as contrast agents is bubble stability. As used herein, particularly with reference to gas-filled bubbles, "bubble stability" refers to the ability of bubbles to retain gas entrapped therein after exposure to a pressure greater than atmospheric pressure. To be effective as contrast agents, bubbles generally need to retain greater than 50% of entrapped gas after exposure to pressure of 300 millimeters (mm) of mercury (Hg) for about one minute.

20 Particularly effective bubbles retain 75% of the entrapped gas after being exposed for one minute to a pressure of 300 mm Hg, with an entrapped gas content of 90% providing especially effective contrast agents. It is also highly desirable that, after release of the pressure, the bubbles return to their original size. This is referred to generally as "bubble resilience."

25 Bubbles which lack desirable stability provide poor contrast agents. If, for example, bubbles release the gas entrapped therein *in vivo*, reflectivity is diminished. Similarly, the size of bubbles which possess poor resilience will be decreased *in vivo*, also resulting in diminished reflectivity.

The stability of bubbles disclosed in the prior art is generally inadequate for

30 use as contrast agents. For example, the prior art discloses bubbles, including gas-filled liposomes, which comprise lipid-containing walls or membranes. See, e.g., Ryan et al.,

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 6 -

U.S. Patent Nos. 4,900,540 and 4,544,545; Tickner et al., U.S. Patent No. 4,276,885; Klaveness et al., WO 93/13809 and Schneider et al., EPO 0 554 213 and WO 91/15244. Lanza et al., WO 93/20802 discloses acoustically reflective oligolamellar liposomes, which are multilamellar liposomes with increased aqueous space between bilayers or have liposomes nested within bilayers in a nonconcentric fashion, and thus contain internally separated bilayers. Their use as ultrasonic contrast agents to enhance ultrasonic imaging, and in monitoring a drug delivered in a liposome administered to a patient, is also described. D'Arrigo, U.S. Patent Nos. 4,684,479 and 5,215,680 disclose gas-in-liquid emulsions and lipid-coated microbubbles, respectively.

Many of the bubbles disclosed in the prior art have undesirably poor stability. Thus, the prior art bubbles are more likely to rupture *in vivo* resulting, for example, in the untimely release of any therapeutic and/or diagnostic agent contained therein. Various studies have been conducted in an attempt to improve bubble stability. Such studies have included, for example, the preparation of bubbles in which the membranes or walls thereof comprise proteins, such as albumin, or materials which are apparently strengthened via crosslinking. See, e.g., Klaveness et al., WO 92/17212, in which there are disclosed bubbles which comprise proteins crosslinked with biodegradable crosslinking agents. A presentation was made by Moseley et al., at a 1991 Napa, California meeting of the Society for Magnetic Resonance in Medicine, which is summarized in an abstract entitled "Microbubbles: A Novel MR Susceptibility Contrast Agent." The microbubbles described by Moseley et al. comprise air coated with a shell of human albumin. Alternatively, bubble membranes can comprise compounds which are not proteins but which are crosslinked with biocompatible compounds. See, e.g., Klaveness et al., WO 92/17436, WO 93/17718 and WO 92/21382.

Prior art techniques for stabilizing bubbles, including the use of proteins in the outer membrane or crosslinking of the membrane components, suffer from various drawbacks. For example, the crosslinking described above generally involves the use of new materials, including crosslinked proteins or other compounds, for which the metabolic fate is unknown. In addition, crosslinking requires additional chemical process steps, including isolation and purification of the crosslinked compounds. Moreover, the use in bubble membranes of proteins, such as albumin, and crosslinking of the bubble membrane

WO 02/36161

PCT/US01/32308

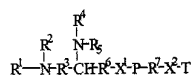
- 7 -

components, can impart rigidity to the walls of the bubbles. This results in bubbles having reduced elasticity and, therefore, a decreased ability to deform and pass through capillaries. Thus, there is a greater likelihood of occlusion of vessels with prior art contrast agents that involve proteins and/or crosslinking.

- 5 Accordingly, new and/or better stabilized contrast agents and methods for providing same are needed. The present invention is directed to this, as well as other, important ends.

Summary of the Invention

- 10 The present invention is directed, in part, to novel compounds having the formula



(IV)

wherein:

- 15 X¹ and X² are independently a direct bond or a linking atom or group selected from the group consisting of -O-, -S-, -N(R⁸)-, -C(=X³)-, -C(=X³)-N(R⁸)-, -N(R⁸)-C(=X³)- and -C(=X³)-N(R⁸)-C(=X³)-;
- X³ is -O- or -S-;
- R¹ is acyl of from about 7 to about 23 carbons;
- R² is hydrogen or lower alkyl;
- 20 R³ is a direct bond or alkylene of from 1 to about 10 carbons;
- R⁴ is acyl of from about 7 to about 23 carbons;
- R⁵ is hydrogen or lower alkyl;
- R⁶ and R⁷ are independently a direct bond or alkylene of from 1 to about 10 carbons;
- 25 R⁸ is hydrogen or lower alkyl;
- P is a hydrophilic polymer; and

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 8 -

T is a targeting ligand which targets cells or receptors selected from the group consisting of myocardial cells, endothelial cells, epithelial cells, tumor cells and the glycoprotein GPIIb/IIIa receptor.

Also provided are targeted vesicle compositions and formulations for therapeutic or diagnostic use *in vivo*. The compositions and formulations comprise, in an aqueous carrier, lipid, protein or polymer gas filled vesicles, as well as the compounds immediately above.

Other embodiments of the invention are directed to methods for using the compositions and formulations in diagnostic and therapeutic applications. These and other aspects of the invention will become more apparent from the following detailed description.

Brief Description of the Drawings

For the purpose of illustrating embodiments of the invention, there is shown in the drawings forms which are presently preferred. It should be understood, however, that this invention is not limited to the precise arrangements and instrumentalities shown.

Figure 1 is a schematic representation of a system for the *in vitro* evaluation of contrast agents in accordance with embodiments of the present invention.

Figure 2 is a trace of ultrasound signal intensity of an *in vitro* blood clot before and after exposure to a contrast agent of the prior art.

Figure 3 is a trace of ultrasound signal intensity of an *in vitro* blood clot before and after exposure to a contrast agent in accordance with an embodiment of the present invention.

Figure 4 is a trace of ultrasound signal intensity of an *in vitro* blood clot before and after exposure to a contrast agent in accordance with an alternate embodiment of the present invention.

Figure 5 includes photographs of ultrasound images of a clot-soaked phantom before and after the administration of a vesicle composition according to the present invention and contrast agents according to the prior art. Specifically, Figure 5A is a photograph of a baseline ultrasound image of a clot-soaked phantom before the administration of contrast agent. Figure 5B is a photograph of an ultrasound image of the

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 9 -

phantom in Figure 5A after administration of a non-targeted vesicle contrast agent of the prior art. Figure 5C is a photograph of a repeat baseline ultrasound image of clot-soaked phantom before the administration of contrast agent. Figure 5D is a photograph of an ultrasound image of the phantom in Figure 5C following administration of a targeted vesicle composition according to the present invention. Significantly improved visualization of the position and extent of the clot is observed when the methods and compositions of the present invention are employed.

Detailed Description of the Invention

As employed above and throughout the disclosure, the following terms, unless otherwise indicated, shall be understood to have the following meanings.

"Lipid" refers to a synthetic or naturally-occurring compound which is generally amphipathic and biocompatible. The lipids typically comprise a hydrophilic component and a hydrophobic component. Exemplary lipids include, for example, fatty acids, neutral fats, phosphatides, glycolipids, surface-active agents (surfactants), aliphatic alcohols, waxes, terpenes and steroids. In certain preferred embodiments, the lipids which may be incorporated in the compositions described herein contain no sulfhydryl groups or disulfide linkages.

"Lipid composition" refers to a composition which comprises a lipid compound, typically in an aqueous medium. Exemplary lipid compositions include suspensions, emulsions and vesicle compositions.

"Lipid formulation" refers to a lipid composition which also comprises a bioactive agent.

"Vesicle" refers to a spherical entity which is generally characterized by the presence of one or more walls or membranes which form one or more internal voids. Vesicles may be formulated, for example, from lipids, including the various lipids described herein, proteinaceous materials, or polymeric materials, including natural, synthetic and semi-synthetic polymers. Preferred vesicles are those which comprise walls or membranes formulated from lipids. In these preferred vesicles, the lipids may be in the form of a monolayer or bilayer, and the mono- or bilayer lipids may be used to form one or more mono- or bilayers. In the case of more than one mono- or bilayer, the mono- or

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 10 -

bilayers may be concentric. Lipids may be used to form a unilamellar vesicle (comprised of one monolayer or bilayer), an oligolamellar vesicle (comprised of about two or about three monolayers or bilayers) or a multilamellar vesicle (comprised of more than about three monolayers or bilayers). Similarly, the vesicles prepared from proteins or polymers may comprise one or more concentric walls or membranes. The walls or membranes of vesicles prepared from proteins or polymers may be substantially solid (uniform), or they may be porous or semi-porous. In certain preferred embodiments, the vesicles contain no sulfhydryl groups or disulfide linkages. The vesicles described herein include such entities commonly referred to as, for example, liposomes, micelles, bubbles, microbubbles, microspheres, lipid-, polymer- and/or protein-coated bubbles, microbubbles and/or microspheres, microballoons, aerogels, clathrate bound vesicles, and the like. The internal void of the vesicles may be filled with a liquid (including, for example, an aqueous liquid), a gas, a gaseous precursor, and/or a solid or solute material, including, for example, a targeting ligand and/or a bioactive agent, as desired.

15 "Liposome" refers to a generally spherical cluster or aggregate of amphipathic compounds, including lipid compounds, typically in the form of one or more concentric layers, for example, monolayers and/or bilayers. They may also be referred to herein as lipid vesicles. The liposomes may be formulated, for example, from ionic lipids and/or non-ionic lipids. Liposomes which are formulated from non-ionic lipids may also be referred to as "niosomes."

20 "Micelle" refers to colloidal entities formulated from lipids. In certain preferred embodiments, the micelles comprise a monolayer or hexagonal H₂ phase configuration. In other preferred embodiments, the micelles may comprise a bilayer configuration.

25 "Aerogel" refers to generally spherical entities which are characterized by a plurality of small internal voids. The aerogels may be formulated from synthetic materials (for example, a foam prepared from baking resorcinol and formaldehyde), as well as natural materials, such as polysaccharides or proteins.

30 "Clathrate" refers to a solid, semi-porous or porous particle which may be associated with vesicles. In preferred form, the clathrates may form a cage-like structure containing cavities which comprise the vesicles. One or more vesicles may be bound to

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 11 -

the clathrate. A stabilizing material may, if desired, be associated with the clathrate to promote the association of the vesicle with the clathrate. Suitable materials from which clathrates may be formulated include, for example, porous apatites, such as calcium hydroxyapatite, and precipitates of polymers and metal ions, such as alginate acid

5 precipitated with calcium salts.

The vesicles of the present invention preferably contain a gas or gaseous precursor. "Gas filled vesicle" refers to vesicles in which there is encapsulated a gas. "Gaseous precursor filled vesicle" refers to vesicles in which there is encapsulated a gaseous precursor. The vesicles may be minimally, partially or substantially completely

10 filled with the gas and/or gaseous precursor. In certain preferred embodiments, the vesicles may be substantially or completely filled with the gas and/or gaseous precursor. The term "substantially", as used in reference to the gas and/or gaseous precursor filled vesicles, means that greater than about 50% of the internal void volume of the vesicle consists of a gas. Preferably, greater than about 60% of the internal void of the

15 substantially filled vesicles consists of a gas, with greater than about 70% being more preferred. Even more preferably, greater than about 80% of the internal void of the substantially filled vesicles consists of a gas, with greater than about 90% being still more preferred. In particularly preferred embodiments, greater than about 95% of the internal void of the vesicles consists of a gas, with about 100% being especially preferred.

20 Although not considered a preferred embodiment of the present invention, the vesicles may also contain, if desired, no or substantially no gas or gaseous precursor.

"Vesicle composition" refers to a composition, typically in an aqueous medium, which comprises vesicles.

"Vesicle formulation" refers to a vesicle composition which also comprises

25 a bioactive agent. Suitable vesicles or vesicle species for use in vesicle formulations include, for example, gas filled vesicles and gaseous precursor filled vesicles.

"Emulsion" refers to a lipoidal mixture of two or more liquids and is generally in the form of a colloid. The lipids may be heterogeneously dispersed throughout the emulsion. Alternatively, the lipids may be aggregated in the form of, for example,

30 clusters or layers, including mono- or bilayers.

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 12 -

"Suspension" refers to a mixture of finely divided liquid or solid particles floating in a liquid which can remain stable for extended periods of time.

"Hexagonal H II phase structure" refers to a generally tubular aggregation of lipids in liquid media, for example, aqueous media, in which the hydrophilic portion(s) of the lipids generally face inwardly in association with a liquid environment inside the tube. The hydrophobic portion(s) of the lipids generally radiate outwardly and the complex assumes the shape of a hexagonal tube. A plurality of tubes is generally packed together in the hexagonal phase structure.

"Patient" refers to animals, including mammals, preferably humans.

The phrases "internal region of a patient" and "region of interest" refer to the entire patient or to a particular area or portion of the patient. Internal regions of a patient and regions of interest may include, for example, areas being imaged with diagnostic imaging and/or areas being treated with a bioactive agent. Exemplary of such areas include, for example, the heart region, including myocardial tissue, as well as other bodily tissues, including the vasculature and circulatory system and cancerous tissue. The phrase "vasculature," as used herein, denotes the blood vessels in the body or in an organ or part of the body.

"Bioactive agent" refers to a substance which may be used in connection with an application that is therapeutic or diagnostic in nature, such as in methods for diagnosing the presence or absence of a disease in a patient and/or in methods for the treatment of disease in a patient. As used herein, "bioactive agent" refers also to substances which are capable of exerting a biological effect *in vitro* and/or *in vivo*. The bioactive agents may be neutral or positively or negatively charged. Examples of suitable bioactive agents include diagnostic agents, pharmaceuticals, drugs, synthetic organic molecules, proteins, peptides, vitamins, steroids and genetic material, including nucleosides, nucleotides and polynucleotides.

"Diagnostic agent" refers to any agent which may be used in connection with methods for imaging an internal region of a patient and/or diagnosing the presence or absence of a disease in a patient. Exemplary diagnostic agents include, for example, contrast agents for use in connection with ultrasound, magnetic resonance imaging or

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 13 -

computed tomography of a patient including, for example, the lipid and/or vesicle compositions described herein.

"Polymer", as used herein, refers to molecules formed from the chemical union of two or more repeating units. Accordingly, included within the term "polymer" may be, for example, dimers, trimers and oligomers. The polymer may be synthetic, naturally-occurring or semisynthetic. In preferred form, the term "polymer" refers to molecules which comprise 10 or more repeating units. In certain preferred embodiments, the polymers which may be incorporated in the compositions described herein contain no

10 "Thickening agent" refers to any of a variety of generally hydrophilic materials which, when incorporated in the lipid and/or vesicle compositions described herein, may act as viscosity modifying agents, emulsifying and/or solubilizing agents, suspending agents, and tonicity raising agents. It is contemplated that the thickening agents may be capable of aiding in maintaining the stability of the compositions due to

15 such properties.

"Dispersing agent" refers to a surface-active agent which, when added to a suspending medium of colloidal particles, including, for example, certain of the lipid and/or vesicle compositions described herein, may promote uniform separation of particles. In certain preferred embodiments, the dispersing agent may comprise a polymeric siloxane

20 compound.

"Genetic material" refers generally to nucleotides and polynucleotides, including deoxyribonucleic acid (DNA) and ribonucleic acid (RNA). The genetic material may be made by synthetic chemical methodology known to one of ordinary skill in the art, or by the use of recombinant technology, or by a combination of the two. The DNA and

25 RNA may optionally comprise unnatural nucleotides and may be single or double stranded. "Genetic material" refers also to sense and anti-sense DNA and RNA, that is, a nucleotide sequence which is complementary to a specific sequence of nucleotides in DNA and/or RNA.

"Pharmaceutical" or "drug" refers to any therapeutic or prophylactic agent

30 which may be used in the treatment (including the prevention, diagnosis, alleviation, or cure) of a malady, affliction, disease or injury in a patient. Therapeutically useful peptides,

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 14 -

polypeptides and polynucleotides may be included within the meaning of the term pharmaceutical or drug.

"Stabilizing material" refers to any material which is capable of improving the stability of compositions as described herein including, for example, emulsions, suspensions, dispersions and vesicle compositions. The improved stability involves, for example, the maintenance of a relatively balanced condition, and may be exemplified, for example, by increased resistance against destruction, decomposition, degradation and the like. In the case of preferred embodiments involving vesicles, especially gas filled vesicles, the stabilizing compounds may serve to improve the stability of the vesicles, for example, by minimizing or substantially (including completely) preventing the escape of gas entrapped within vesicles which may occur, for example, from rupture and/or coalescence of vesicles. The term "substantially", as used in reference to the prevention of the escape of entrapped gas, means that greater than about 50% of the gas is maintained entrapped. Preferably, greater than about 60% of the gas is maintained entrapped, with greater than about 70% being more preferred. Even more preferably, greater than about 80% of the gas is maintained entrapped, with greater than about 90% being still more preferred. In particularly preferred embodiments, greater than about 95% of the gas is maintained entrapped. If desired, the gas may be completely maintained entrapped (i.e., about 100% of the gas is maintained entrapped). The stabilizing compounds may comprise discrete, individual compounds (monomers), or may comprise polymers. In the case of preferred embodiments involving lipids, the stabilizing materials may be associated covalently and/or non-covalently with the lipid compounds. Broadly speaking, the stabilizing compounds may comprise, for example, surfactants, film-forming materials, membranes and/or membrane forming materials. Exemplary stabilizing compounds which may be employed in the methods and compositions of the present invention include lipids, proteins and polymers. Encompassed also in the definition of "stabilizing material" are certain of the present bioactive agents. The stabilizing material may be neutral or positively or negatively charged. Preferred among the neutral stabilizing materials are polar materials. In certain embodiments, the stabilizing compounds may be substantially (including completely) crosslinked. The terms "crosslink", "crosslinked" and "crosslinking", as used herein, generally refers to the linking of two or more stabilizing

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 15 -

compounds, including lipid, protein and polymer stabilizing compounds, by one or more bridges. The bridges, which may be composed of one or more elements, groups or compounds, generally serve to join an atom from a first stabilizing compound molecule to an atom of a second stabilizing molecule. The crosslink bridges may involve covalent and/or non-covalent associations. Any of a variety of elements, groups and/or compounds may form the bridges in the crosslinks, and the stabilizing compounds may be crosslinked naturally or through synthetic means. For example, crosslinking may occur in nature in materials formulated from peptide chains which are joined by disulfide bonds of cystine residues, as in keratins, insulin, and other proteins. Alternatively, crosslinking may be effected by suitable chemical modification, such as, for example, by combining a compound, such as a stabilizing material, and a chemical substance that may serve as a crosslinking agent, which are caused to react, for example, by exposure to heat, high-energy radiation, ultrasonic radiation, and the like. Examples include, for example, crosslinking with sulfur which may be present, for example, as sulfhydryl groups in cysteine residues, to provide disulfide linkages, crosslinking with organic peroxides, crosslinking of unsaturated materials by means of high-energy radiation, crosslinking with dimethylol carbamate, and the like. The term "substantially", as used in reference to crosslinked stabilizing compounds, means that greater than about 50% of the stabilizing compounds contain crosslinking bridges. In certain embodiments, preferably greater than about 60% of the crosslinked stabilizing compounds contain crosslinking bridges, with greater than about 70% being more preferred. Even more preferably, greater than about 80% of the crosslinked stabilizing compounds contain crosslinking bridges, with greater than about 90% being still more preferred. In certain particularly preferred embodiments, greater than about 95% of the crosslinked stabilizing compounds contain crosslinking bridges. If desired, the substantially crosslinked stabilizing compounds may be completely crosslinked (i.e., about 100% of the crosslinked stabilizing compounds contain crosslinking bridges). In the most preferred embodiments, the stabilizing compounds may be substantially (including completely) non-crosslinked. The term "substantially", as used in reference to non-crosslinked stabilizing compounds, means that greater than about 50% of the stabilizing compounds are devoid of crosslinking bridges. Preferably, greater than about 60% of the stabilizing compounds are devoid of crosslinking bridges, with greater

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 16 -

than about 70% being more preferred. Even more preferably, greater than about 80% of the stabilizing compounds are devoid of crosslinking bridges, with greater than about 90% being still more preferred. In particularly preferred embodiments, greater than about 95% of the stabilizing compounds are devoid of crosslinking bridges. If desired, the

- 5 substantially non-crosslinked stabilizing compounds may be completely non-crosslinked (i.e., about 100% of the stabilizing compounds are devoid of crosslinking bridges).

"Vesicle stability" refers to the ability of gas-filled vesicles to retain the gas entrapped therein after being exposed, for about one minute, to a pressure of about 300 mm Hg. Vesicle stability is measured in percent (%), this being the fraction of the amount of
10 gas which is originally entrapped in the vesicle and which is retained after release of the pressure. Vesicle stability includes reference also to "vesicle resilience" which refers to the ability of a vesicle to return to its original size after release of the pressure.

"Covalent association" refers to an intermolecular association or bond which involves the sharing of electrons in the bonding orbitals of two atoms.

- 15 "Non-covalent association" refers to intermolecular interaction among two or more separate molecules which does not involve a covalent bond. Intermolecular interaction is dependent upon a variety of factors, including, for example, the polarity of the involved molecules, the charge (positive or negative), if any, of the involved molecules, and the like. Non-covalent associations are preferably selected from the group consisting
20 of ionic interaction, dipole-dipole interaction and van der Waal's forces and combinations thereof.

"Ionic interaction" or "electrostatic interaction" refers to intermolecular interaction among two or more molecules, each of which is positively or negatively charged. Thus, for example, "ionic interaction" or "electrostatic interaction" refers to the
25 attraction between a first, positively charged molecule and a second, negatively charged molecule. Exemplary ionic or electrostatic interactions include, for example, the attraction between a negatively charged stabilizing material, for example, genetic material, and a positively charged lipid, for example, a cationic lipid, such as lauryltrimethylammonium bromide.

- 30 "Dipole-dipole interaction" refers generally to the attraction which can occur among two or more polar molecules. Thus, "dipole-dipole interaction" refers to the

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 17 -

attraction of the uncharged, partial positive end of a first polar molecule, commonly designated as δ^+ , to the uncharged, partial negative end of a second polar molecule, commonly designated as δ^- . Dipole-dipole interactions are exemplified, for example, by the attraction between the electropositive head group, for example, the choline head group, of phosphatidylcholine and an electronegative atom, for example, a heteroatom, such as oxygen, nitrogen or sulphur, which is present in a stabilizing material, such as a polysaccharide. "Dipole-dipole interaction" refers also to intermolecular hydrogen bonding in which a hydrogen atom serves as a bridge between electronegative atoms on separate molecules and in which a hydrogen atom is held to a first molecule by a covalent bond and to a second molecule by electrostatic forces.

"Van der Waal's forces" refers to the attractive forces between non-polar molecules that are accounted for by quantum mechanics. Van der Waal's forces are generally associated with momentary dipole moments which are induced by neighboring molecules and which involve changes in electron distribution.

"Hydrogen bond" refers to an attractive force, or bridge, which may occur between a hydrogen atom which is bonded covalently to an electronegative atom, for example, oxygen, sulfur, nitrogen, and the like, and another electronegative atom. The hydrogen bond may occur between a hydrogen atom in a first molecule and an electronegative atom in a second molecule (intermolecular hydrogen bonding). Also, the hydrogen bond may occur between a hydrogen atom and an electronegative atom which are both contained in a single molecule (intramolecular hydrogen bonding).

"Hydrophilic interaction" refers to molecules or portions of molecules which may substantially bind with, absorb and/or dissolve in water. This may result in swelling and/or the formation of reversible gels.

"Hydrophobic interaction" refers to molecules or portions of molecules which do not substantially bind with, absorb and/or dissolve in water.

"Biocompatible" refers to materials which are generally not injurious to biological functions and which will not result in any degree of unacceptable toxicity, including allergenic responses and disease states.

"In combination with" refers, in certain embodiments, to the incorporation of a targeting ligand in a composition of the present invention, including lipid

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 18 -

compositions and vesicle compositions. "In combination with" may refer also to the incorporation of a bioactive agent in a composition of the present invention, including lipid compositions and vesicle compositions. The bioactive agent and/or targeting ligand may be combined with the present compositions in any of a variety of ways. If desired, the

5 bioactive agent and/or targeting ligand may be associated covalently with one or more components of the present compositions such as, for example, lipid compounds, proteins, polymers and/or vesicles or other optional stabilizing materials. Also, if desired, there may be substantially no covalent association of the bioactive agent and/or targeting ligand with the other components of the present compositions such as, for example, the lipid

10 compounds, proteins, polymers and/or vesicles or other optional stabilizing materials. The term "substantially no", as used herein in reference to the lack of covalent association of bioactive agent and/or targeting ligand with other components of the compositions such as, for example, lipid compounds, proteins, polymers and/or vesicles, may mean that less than about 50% such as, for example, from about 0% to less than about 50% (and all

15 specific percentages and combinations and subcombinations of ranges of percentages therein) of the bioactive agent and/or targeting ligand may be covalently associated with other components of the compositions. Preferably, less than about 40% of the bioactive agent and/or targeting ligand may be covalently associated with other components of the compositions, with less than about 30% being more preferred. Even more preferably, less

20 than about 20% of the bioactive agent and/or targeting ligand may be covalently associated with other components of the compositions, with less than about 10% being yet more preferred. In still more preferred embodiments, there may be completely no (*i.e.*, 0%) covalent association of the bioactive agent and/or targeting ligand with other components of the compositions.

25 Bioactive agent and/or targeting ligand which have substantially no covalent association with other components of the compositions may sometimes be referred to herein as "unbound" or "free" bioactive agent and/or targeting ligand. In such compositions, the bioactive agent and/or targeting ligand may, if desired, be associated non-covalently with other components of the compositions such as, for example, the lipid

30 compounds, proteins, polymers and/or vesicles or other optional stabilizing materials. In addition, if desired, there may be substantially no non-covalent association of the unbound

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 19 -

or free bioactive agent and/or targeting ligand with other components of the compositions including, for example, lipid compounds, proteins, polymers and/or vesicles. The term "substantially no", as used herein in reference to the lack of non-covalent association of bioactive agent and/or targeting ligand with other components of the compositions such as, 5 for example, lipid compounds, proteins, polymers and/or vesicles, may mean that less than about 50% such as, for example, from about 0% to less than about 50% (and all specific percentages and combinations and subcombinations of ranges of percentages therein) of the unbound or free bioactive agent and/or targeting ligand may be associated non-covalently with other components of the compositions. Preferably, less than about 40% of 10 the unbound or free bioactive agent and/or targeting ligand may be associated non-covalently with other components of the compositions, with less than about 30% being more preferred. Even more preferably, less than about 20% of the unbound or free bioactive agent and/or targeting ligand may be associated non-covalently with other components of the compositions, with less than about 10% being yet more preferred. In 15 still more preferred embodiments, there may be completely no (*i.e.*, 0%) non-covalent association of the unbound or free bioactive agent and/or targeting ligand with other components of the compositions.

In the case of vesicle compositions, the bioactive agent and/or targeting ligand may be entrapped within the internal void of the vesicle. The bioactive agent and/or 20 targeting ligand may also be integrated within the layer(s) or wall(s) of the vesicle, for example, by being interspersed among lipids which are contained within the vesicle layer(s) or wall(s). In addition, it is contemplated that the bioactive agent and/or targeting ligand may be located on the surface of a vesicle. In any case, the bioactive agent and/or targeting ligand may interact chemically with the walls of the vesicles, including, for 25 example, the inner and/or outer surfaces of the vesicle and may remain substantially adhered thereto. Such interaction may take the form of, for example, covalent association or non-covalent association. In certain embodiments, the interaction may result in the stabilization of the vesicle.

"Targeting ligand" refers to any material or substance which may promote 30 targeting of tissues and/or receptors *in vivo* with the compositions of the present invention. The targeting ligand may be synthetic, semi-synthetic, or naturally-occurring. Materials or

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 20 -

substances which may serve as targeting ligands include, for example, proteins, including antibodies, glycoproteins and lectins, peptides, polypeptides, saccharides, including mono- and polysaccharides, vitamins, steroids, steroid analogs, hormones, cofactors, bioactive agents, and genetic material, including nucleosides, nucleotides and polynucleotides.

5 A "precursor" to a targeting ligand refers to any material or substance which may be converted to a targeting ligand. Such conversion may involve, for example, anchoring a precursor to a targeting ligand. Exemplary targeting precursor moieties include maleimide groups, disulfide groups, such as ortho-pyridyl disulfide, vinylsulfone groups, azide groups, and α -iodo acetyl groups.

10 "Peptide" refers to a nitrogenous compound which may contain from about 2 to about 100 amino acid residues. In certain preferred embodiments, the peptides which may be incorporated in the compositions described herein contain no sulfhydryl groups or disulfide linkages.

15 "Protein" refers to a nitrogenous compound which may contain more than about 100 amino acid residues. In certain preferred embodiments, the proteins which may be incorporated in the compositions described herein contain no sulfhydryl groups or disulfide linkages.

"Coat" or "coating" refers to the interaction of the stabilizing material with the lipid and/or vesicles and may involve covalent and/or non-covalent association.

20 "Tissue" refers generally to specialized cells which may perform a particular function. It should be understood that the term "tissue," as used herein, may refer to an individual cell or a plurality or aggregate of cells, for example, membranes or organs. The term "tissue" also includes reference to an abnormal cell or a plurality of abnormal cells. Exemplary tissues include, for example, myocardial tissue (also referred to
25 as heart tissue or myocardium), including myocardial cells and cardiomyocytes, membranous tissues, including endothelium and epithelium, laminae, connective tissue, including interstitial tissue, and tumors.

"Receptor" refers to a molecular structure within a cell or on the surface of the cell which is generally characterized by the selective binding of a specific substance.
30 Exemplary receptors include, for example, cell-surface receptors for peptide hormones, neurotransmitters, antigens, complement fragments, and immunoglobulins and cytoplasmic

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 21 -

receptors for steroid hormones. An exemplary receptor within the context of the present invention is the glycoprotein GPIIb/IIIa, which is a platelet integrin.

"Endothelial cells" or "endothelium" refers to an aggregate of cells and/or tissue which may be normal and/or diseased and which may comprise a single layer of flattened transparent endothelial cells that may be joined edge to edge or in an overlapping fashion to form a membrane. Endothelial cells are found on the free surfaces of the serous membranes, as part of the lining membrane of the heart, blood vessels, and lymphatics, on the surface of the brain and spinal cord, and in the anterior chamber of the eye.

Endothelium originates from the embryonic mesoblast and includes heart tissue, including infarcted heart tissue, cardiovascular, the peripheral vasculature, such as arteries, veins, and capillaries (the location of which is noted as peripheral to the heart), blood clots and the region surrounding atherosclerotic plaque.

"Epithelial cells" or "epithelium" refers to an aggregate of cells and/or tissue which may be normal and/or diseased and which may comprise one or more layers of cells that may be united together by an interstitial cementitious substance supported on a basement-membrane. Epithelium may be classified into various classes, including, for example, a single layer of cells (simple epithelium); more than a single layer of cells (stratified epithelium); and about three or four layers of cells that are fitted together substantially without the appearance of stratification. The different forms of simple epithelium are usually referred to as squamous, pavement, columnar, glandular, spheroidal and/or ciliated. Epithelium originates from the embryonic epiblast or hypoblast. Epithelium includes heart tissue, including infarcted heart tissue, cardiovascular, the peripheral vasculature, such as arteries, veins, and capillaries, blood clots and the region surrounding atherosclerotic plaque.

"Myocardial" refers generally to heart tissue, including cardiomyocyte, myocardial, endocardial and epicardial cells. The term "myocardial" includes reference to infarcted heart tissue, the cardiovascular, the peripheral vasculature, such as arteries, veins, and capillaries (the location of which is noted as peripheral to the heart), blood clots, thrombi, and the region surrounding atherosclerotic plaque.

"Cardiac region" refers generally to the heart and surrounding tissues, structures and blood vessels, including the coronary arteries.

- "Tumor cells" or "tumor" refers to an aggregate of abnormal cells and/or tissue which may be associated with diseased states that are characterized by uncontrolled cell proliferation. The disease states may involve a variety of cell types, including, for example, endothelial, epithelial and myocardial cells. Included among the disease states are neoplasms, cancer, leukemia and restenosis injuries.
- "Alkyl" refers to an aliphatic hydrocarbon group which may be straight, branched or cyclic having 1 to about 50 carbon atoms in the chain, and all combinations and subcombinations of ranges therein. "Lower alkyl" refers to an alkyl group having 1 to about 8 carbon atoms, with lower alkyl of from 1 to about 4 carbons being preferred.
- "Higher alkyl" refers to an alkyl group having about 10 to about 20 carbon atoms. The alkyl group may be optionally substituted with one or more alkyl group substituents which may be the same or different, where "alkyl group substituent" includes halo, aryl, hydroxy, alkoxy, aryloxy, alkylloxy, alkylthio, arylthio, aralkyloxy, aralkylthio, carboxy, alkoxycarbonyl, oxo and cycloalkyl. There may be optionally inserted along the alkyl group one or more oxygen, sulphur or substituted or unsubstituted nitrogen atoms, wherein the nitrogen substituent is lower alkyl. "Branched" refers to an alkyl group in which a lower alkyl group, such as methyl, ethyl or propyl, is attached to a linear alkyl chain. Exemplary alkyl groups include methyl, ethyl, *i*-propyl, *n*-butyl, *t*-butyl, *n*-pentyl, heptyl, octyl, decyl, dodecyl, tridecyl, tetradecyl, pentadecyl and hexadecyl. Preferred alkyl groups include the lower alkyl groups of 1 to about 4 carbons and the higher alkyl groups of about 12 to about 16 carbons. Preferred alkyl groups include also alkyl groups which are substituted with one or more halo atoms. Fluoroalkyl groups are preferred among the halo-substituted alkyl groups, including, for example, fluoroalkyl groups of the formula $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_n(\text{CH}_2)_m$, wherein each of *m* and *n* is independently an integer from 0 to about 22.
- Exemplary fluoroalkyl groups include perfluoromethyl, perfluoroethyl, perfluoropropyl, perfluorobutyl, perfluorocyclobutyl, perfluoropentyl, perfluorohexyl, perfluoroheptyl, perfluorooctyl, perfluorononyl, perfluorodecyl, perfluoroundecyl and perfluorododecyl. Exemplary cyclic hydrocarbon groups (that is, cycloalkyl groups) include, for example, cyclopentyl, cyclohexyl and cycloheptyl groups. Exemplary cyclic hydrocarbon groups also include cycloalkenyl groups such as, for example, cyclopentenyl and cyclohexenyl, as

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 23 -

well as hydrocarbon groups comprising fused cycloalkyl and/or cycloalkenyl groups including for example, steroid groups, such as cholesterol.

"Alkenyl" refers to an alkyl group containing at least one carbon-carbon double bond. Exemplary alkenyl groups include, for example, vinyl, allyl, butenyl, 5 pentenyl, decenyl and dodecenyl groups.

"Alkoxy" refers to an alkyl-O- group where alkyl is as previously described. Exemplary alkoxy groups include, for example, methoxy, ethoxy, propoxy, butoxy and heptoxy.

"Alkylene" refers to a straight or branched bivalent aliphatic hydrocarbon 10 group having from 1 to about 30 carbon atoms, and all combinations and subcombinations of ranges therein. "Lower alkylene" refers to an alkylene group having 1 to about 4 carbon atoms. The alkylene group may be straight, branched or cyclic. The alkylene group may be also optionally unsaturated and/or substituted with one or more "alkyl group substituents." There may be optionally inserted along the alkylene group one or more 15 oxygen, sulphur or substituted or unsubstituted nitrogen atoms, wherein the nitrogen substituent is alkyl as previously described. Exemplary alkylene groups include methylene ($-\text{CH}_2-$), ethylene ($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), propylene ($-(\text{CH}_2)_3-$), cyclohexylene ($-\text{C}_6\text{H}_{10}-$), $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$, $-(\text{CF}_2)_n(\text{CH}_2)_m-$, wherein n is an integer from about 1 to about 22 and m is an integer from 0 to about 22, $-(\text{CH}_2)_n-\text{N}(\text{R})-(\text{CH}_2)_m-$, wherein each of 20 m and n is independently an integer from 0 to about 30 and R is hydrogen or alkyl, methylenedioxy ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-$) and ethylenedioxy ($-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-$). It is preferred that the alkylene group has about 1 to about 3 carbon atoms.

"Acyl" refers to a straight or branched alkyl-C=O group. "Thioacyl" refers to a straight or branched alkyl-C=S group. Preferred acyl and thioacyl groups have from 25 about 5 to about 30 carbon atoms (where the number of carbon atoms includes the carbon atom of the $-\text{C}(=\text{O})$ group), and all combinations and subcombinations of ranges therein.

The present invention is directed, in part, to lipid and/or vesicle compositions. Embodiments are provided which comprise a lipid compositions comprising a lipid, a targeting ligand which may target tissues, cells and/or receptors *in* 30 *vivo* and which may be attached to the lipid via a linking group, and a gas or gaseous precursor. Embodiments are also provided herein which comprise vesicle compositions

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 24 -

comprising, in an aqueous carrier, vesicles comprising lipids, proteins or polymers, a targeting ligand which may target tissues, cells and/or receptors *in vivo*, and a gas or gaseous precursor. In these latter embodiments, the targeting ligand may be attached to the vesicles, including the lipids, proteins or polymers from which the vesicles are formulated, via a linking group. In connection with lipid compositions, and especially lipid compositions in the form of vesicle compositions, it may be advantageous to prepare the lipid compositions at a temperature below the gel to liquid crystalline phase transition temperature of the involved lipids. This phase transition temperature is the temperature at which a lipid bilayer will convert from a gel state to a liquid crystalline state. See, for example, Chapman *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1974 249, 2512-2521.

It is generally believed that vesicles which are prepared from lipids that possess higher gel state to liquid crystalline state phase transition temperatures tend to have enhanced impermeability at any given temperature. See Derek Marsh, *CRC Handbook of Lipid Bilayers* (CRC Press, Boca Raton, FL 1990), at p. 139 for main chain melting transitions of saturated diacyl-sn-glycero-3-phosphocholines. The gel state to liquid crystalline state phase transition temperatures of various lipids will be readily apparent to those skilled in the art and are described, for example, in Gregoriadis, ed., *Liposome Technology*, Vol. I, 1-18 (CRC Press, 1984). The following table lists some of the representative lipids and their phase transition temperatures.

TABLE 1	
Saturated Diacyl-sn-Glycero-3-Phosphocholines: Main Chain Melting Transition Temperatures	
Number of Carbons in Acyl Chains	Main Phase Transition Temperature (° C)
1,2-(12:0)	-1.0
1,2-(13:0)	13.7
1,2-(14:0)	23.5

TABLE 1	
Saturated Diacyl-sn-Glycero-3-Phosphocholines: Main Chain Melting Transition Temperatures	
Number of Carbons in Acyl Chains	Main Phase Transition Temperature (° C)
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

See, for example, Derek Marsh, *CRC Handbook of Lipid Bilayers*, p. 139 (CRC Press, Boca Raton, FL 1990).

It may be possible to enhance the stability of vesicles by incorporating in the present lipid and/or vesicle compositions at least a minor amount, for example, about 1 to about 10 mole percent, based on the total amount of lipid employed, of a negatively charged lipid. Suitable negatively charged lipids include, for example, phosphatidylserine, phosphatidic acid, and fatty acids. Without intending to be bound by any theory or

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 26 -

theories of operation, it is contemplated that such negatively charged lipids provide added stability by counteracting the tendency of vesicles to rupture by fusing together. Thus, the negatively charged lipids may act to establish a uniform negatively charged layer on the outer surface of the vesicle, which will be repulsed by a similarly charged outer layer on other vesicles which are proximate thereto. In this way, the vesicles may be less prone to come into touching proximity with each other, which may lead to a rupture of the membrane or skin of the respective vesicles and consolidation of the contacting vesicles into a single, larger vesicle. A continuation of this process of consolidation will, of course, lead to significant degradation of the vesicles.

10 The lipid materials used, especially in connection with vesicle compositions, are also preferably flexible. This means, in the context of the present invention, that the vesicles can alter their shape, for example, to pass through an opening having a diameter that is smaller than the diameter of the vesicle.

A wide variety of lipids are believed to be suitable for incorporation in the lipid compositions. With particular reference to vesicle compositions, for example, micelles and/or liposomes, any of the materials or combinations thereof which are known to those skilled in the art as suitable for their preparation may be used. The lipids used may be of either natural, synthetic or semi-synthetic origin. As noted above, suitable lipids generally include, for example, fatty acids, neutral fats, phosphatides, glycolipids, aliphatic alcohols and waxes, terpenes, sesquiterpenes, and steroids.

Exemplary lipids which may be used to prepare the present lipid compositions included, for example, fatty acids, lysolipids, including lysophospholipids, phosphocholines, such as those associated with platelet activation factors (PAF) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL), including 1-alkyl-2-acetoxy-sn-glycero 3-phosphocholines, and 1-alkyl-2-hydroxy-sn-glycero 3-phosphocholines, which target blood clots; phosphatidylcholine with both saturated and unsaturated lipids, including dioleoylphosphatidylcholine; dimyristoylphosphatidylcholine; dipentadecanoylphosphatidylcholine; dilauroylphosphatidylcholine; dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC); distearoylphosphatidylcholine (DSPC); and diarachidonylphosphatidylcholine (DAPC); phosphatidylethanolamines, such as dioleoylphosphatidylethanolamine, dipalmitoylphosphatidylethanolamine (DPPE) and distearoylphosphatidylethanolamine

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 27 -

(DSPE); phosphatidylserine; phosphatidylglycerols, including distearoylphosphatidylglycerol (DSPG) and dipalmitoyl-glycerolsuccinate (DPGS); phosphatidylinositol; sphingolipids such as sphingomyelin; sphingosines; glycolipids such as ganglioside GM1 and GM2; glucolipids; sulfatides; glycosphingolipids; phosphatidic acids, such as

5 dipalmitoylphosphatidic acid (DPPA) and distearoylphosphatidic acid (DSPA); palmitic acid; stearic acid; arachidonic acid; oleic acid; lipids bearing polymers, such as chitin, hyaluronic acid, polyvinylpyrrolidone or polyethylene glycol (PEG), also referred to herein as "pegylated lipids", with preferred lipids bearing polymers including DPPE-PEG (DPPE-PEG), which refers to the lipid DPPE having a PEG polymer attached thereto, including,

10 for example, DPPE-PEG5000, which refers to DPPE having attached thereto a PEG polymer having a mean average molecular weight of about 5000; lipids bearing sulfonated mono-, di-, oligo- or polysaccharides; steroids, such as for example, cholesterol, cholesterol sulfate, cholesterol hemisuccinate and cholesterol amines; tocopherol hemisuccinate; lipids with ether and ester-linked fatty acids; polymerized lipids (a wide

15 variety of which are well known in the art); diacetyl phosphate; dicetyl phosphate; stearylamine; cardiolipin; phospholipids with short chain fatty acids of about 6 to about 8 carbons in length; synthetic phospholipids with asymmetric acyl chains, such as, for example, one acyl chain of about 6 carbons and another acyl chain of about 12 carbons; ceramides; non-ionic liposomes including niosomes such as polyoxyalkylene (e.g.,

20 polyoxyethylene) fatty acid esters, polyoxyalkylene (e.g., polyoxyethylene) fatty alcohols, polyoxyalkylene (e.g., polyoxyethylene) fatty alcohol ethers, polyoxyalkylene (e.g., polyoxyethylene) sorbitan fatty acid esters (such as, for example, the class of compounds referred to as TWEEN®, including, for example, TWEEN® 20, TWEEN® 40 and TWEEN®

25 80, commercially available from ICI Americas, Inc., Wilmington, DE), glycerol polyethylene glycol oxystearate, glycerol polyethylene glycol ricinoleate, alkyloxylated (e.g., ethoxylated) soybean sterols, alkyloxylated (e.g., ethoxylated) castor oil, polyoxyethylene-polyoxypropylene polymers, and polyoxyalkylene (e.g., polyoxyethylene) fatty acid stearates; sterol aliphatic acid esters including cholesterol sulfate, cholesterol butyrate, cholesterol isobutyrate, cholesterol palmitate, cholesterol stearate, lanosterol

30 acetate, ergosterol palmitate, and phytosterol n-butyrate; sterol esters of sugar acids including cholesterol glucuronide, lanosterol glucuronide, 7-dehydro-cholesterol

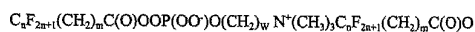
WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 28 -

glucuronide, ergosterol glucuronide, cholesterol gluconate, lanosterol gluconate, and ergosterol gluconate; esters of sugar acids and alcohols including lauryl glucuronide, stearoyl glucuronide, myristoyl glucuronide, lauryl gluconate, myristoyl gluconate, and stearoyl gluconate; esters of sugars and aliphatic acids including sucrose laurate, fructose laurate, sucrose palmitate, sucrose stearate, gluconic acid, gluconic acid and polyuronic acid; saponins including sarsasapogenin, smilagenin, hederagenin, oleanolic acid, and digitoxigenin; glycerol dilaurate, glycerol trilaurate, glycerol dipalmitate, glycerol and glycerol esters including glycerol tripalmitate, glycerol distearate, glycerol tristearate, glycerol dimyristate, glycerol trimyristate; long chain alcohols including n-decyl alcohol, lauryl alcohol, myristyl alcohol, cetyl alcohol, and n-octadecyl alcohol; 6-(5-cholesten-3 β -yloxy)-1-thio- β -D-galactopyranoside; digalactosyldiglyceride; 6-(5-cholesten-3 β -yloxy)-hexyl-6-amino-6-deoxy-1-thio- β -D-galactopyranoside; 6-(5-cholesten-3 β -yloxy)hexyl-6-amino-6-deoxy-1-thio- α -D-mannopyranoside; 12-(((7'-diethylamino-coumarin-3-yl)-carbonyl)methylamino)-octadecanoic acid; N-[12-(((7'-diethylamino-coumarin-3-yl)-carbonyl)methylamino)-octadecanoyl]-2-aminopalmitic acid; cholesteryl(4'-trimethylammonio)butanoate; N-succinyldioleoylphosphatidylethanolamine; 1,2-dioleoyl-sn-glycerol; 1,2-dipalmitoyl-sn-3-succinylglycerol; 1,3-dipalmitoyl-2-succinylglycerol; 1-hexadecyl-2-palmitoylglycerophosphoethanolamine and palmitoylhomocysteine, and/or any combinations thereof. In preferred embodiments, the stabilizing materials comprise phospholipids, including one or more of DPPC, DPPE, DPPA, DSPC, DSPE, DSPG, and DAPC.

Examples of suitable fluorinated lipids include but are not limited to compounds of the formula:

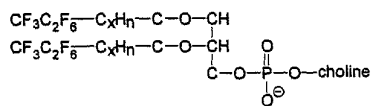


wherein m is 0 to about 18, n is 1 to about 12; and w is 1 to about 8. Examples of and methods for the synthesis of these, as well as other fluorinated lipids useful in the present invention, are set forth in Unger, U.S. Patent No. 5,997,898, Reiss et al. U.S. Patent No. 5,344,930, Frezard, F., et al., *Biochem Biophys Acta*, 1192:61-70 (1994), and Frezard, F., et al., *Art. Cells Blood Subs and Immob Biotech.*, 22:1403-1408 (1994), the disclosures of each of which are incorporated herein by reference in their entirety. One specific example of a difluoroacyl glycerylphosphatidyl-choline, nonafluorinated diacyl

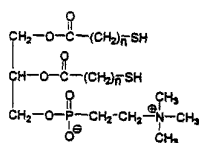
5 free fatty acids may also function in accordance with the scope of the invention.

Examples of polymerized lipids include unsaturated lipophilic chains such as alkenyl or alkynyl, containing up to about 50 carbon atoms. Further examples are phospholipids such as phosphoglycerides and sphingolipids carrying polymerizable groups; and saturated and unsaturated fatty acid derivatives with hydroxyl groups, such as for example triglycerides of d-12-hydroxyoleic acid, including castor oil and ergot oil. Polymerization may be designed to include hydrophilic substituents such as carboxyl or hydroxyl groups, to enhance dispersability so that the backbone residue resulting from biodegradation is water soluble. Suitable polymerizable lipids are also described, for example, by Klavensen et al, U.S. Patent No. 5,336,490, the disclosure of which is hereby incorporated by reference herein in its entirety.

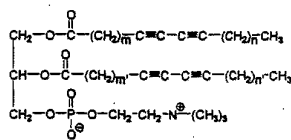
20



(A)



(B)

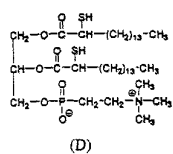


(C)

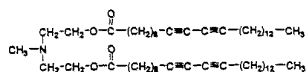
WO 02/36161

PCT/US01/32308

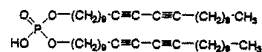
- 30 -



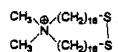
(D)



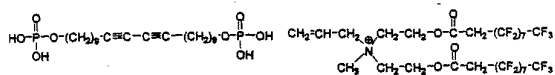
(E)



(F)

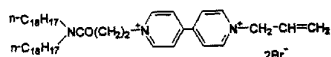


(G)

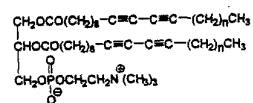


(H)

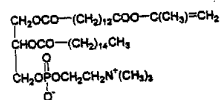
(I)



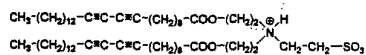
(J)



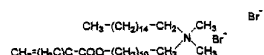
(K)



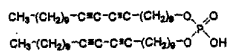
(L)



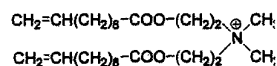
(M)



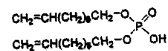
(O)



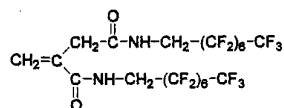
(Q)



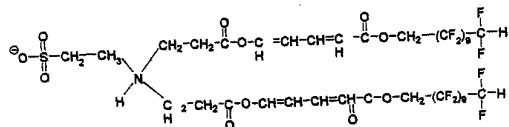
(R)



(T)



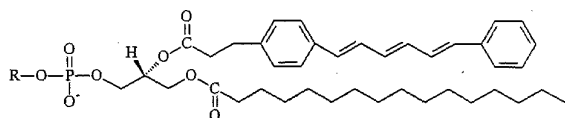
(U)



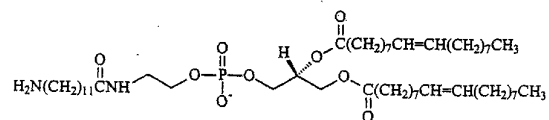
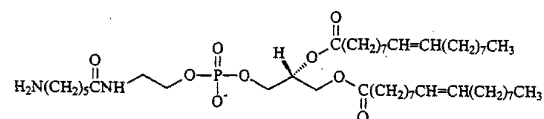
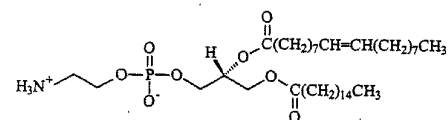
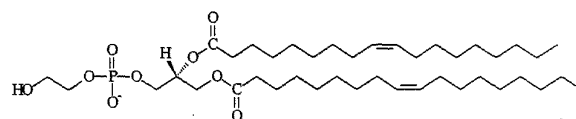
(M)

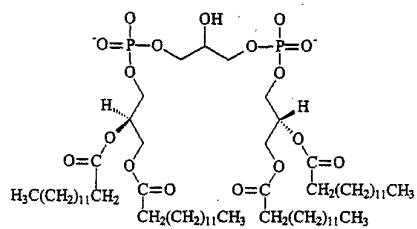
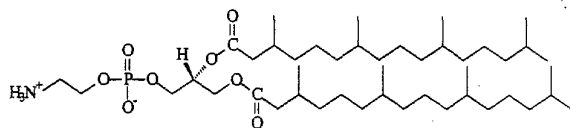
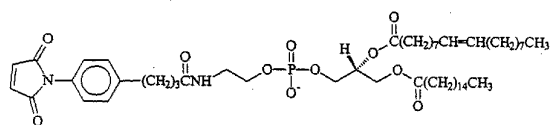
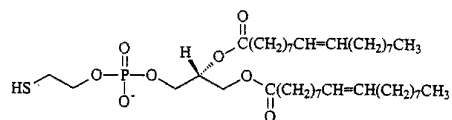
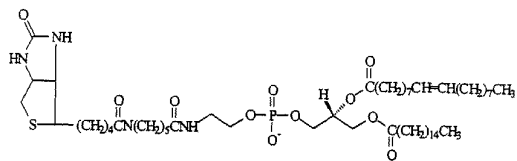
In formula A, above, x is an integer from about 8 to about 18, and n is 2x. Most preferably x is 12 and n is 24. In formulas B, C and K above, m, n, m' and n' are, independently, an integer of from about 8 to about 18, preferably about 10 to about 14.

Other lipids which may be employed in the present compositions include, for example,



where R is choline,

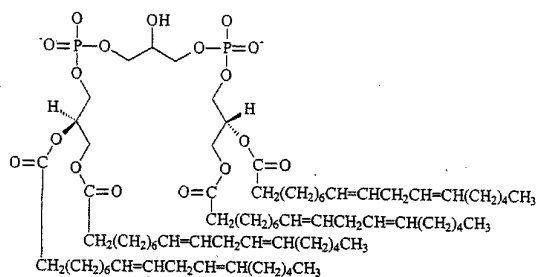




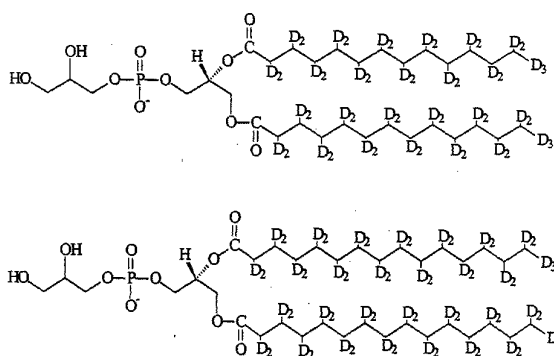
WO 02/36161

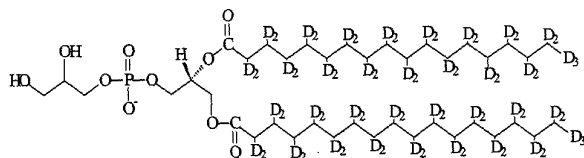
PCT/US01/32308

- 34 -



deuterated lipids, such as





If desired, a cationic lipid may be used, such as, for example, N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride (DOTMA), 1,2-dioleoyloxy-3-(trimethylammonio)propane (DOTAP); and 1,2-dioleoyl-3-(4'-trimethylammonio)-butanoyl-sn-glycerol (DOTB). If a cationic lipid is employed in the lipid compositions, the molar ratio of cationic lipid to non-cationic lipid may be, for example, from about 1:1000 to about 1:100. Preferably, the molar ratio of cationic lipid to non-cationic lipid may be from about 1:2 to about 1:10, with a ratio of from about 1:1 to about 1:2.5 being preferred.

Even more preferably, the molar ratio of cationic lipid to non-cationic lipid may be about 1:1.

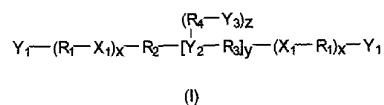
In the case of lipid compositions which contain both cationic and non-cationic lipids, a wide variety of lipids may be employed as the non-cationic lipid. Preferably, this non-cationic lipid comprises one or more of DPPC, DPPE and dioleoylphosphatidylethanolamine. In lieu of the cationic lipids listed above, lipids bearing cationic polymers, such as polylysine or polyarginine, as well as alkyl phosphonates, alkyl phosphinates, and alkyl phosphites, may also be used in the lipid compositions

In certain preferred embodiments of the present invention, the lipid compositions may comprise one or more cationic lipids having the following formula

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 36 -



wherein:

- each of x, y and z is independently an integer from 0 to about 100;
- each X_1 is independently -O-, -S-, -NR₅-, -C(=X₂)-, -C(=X₂)-N(R₃)-,
 -N(R₃)-C(=X₂)-, -C(=X₂)-O-, -O-C(=X₂)- or -X₂-(R₃X₂)P(=X₂)-X₂;
- 5 each X_2 is independently O or S;
- each Y_1 is independently a phosphate residue, N(R₆)_a-, S(R₆)_a-, P(R₆)_a- or
 -CO₂R₆, wherein a is an integer from 1 to 3;
- each Y_2 is independently -N(R₆)_b-, -S(R₆)_b- or -P(R₆)_b-, wherein b is an
 integer from 0 to 2;
- 10 each Y_3 is independently a phosphate residue, N(R₆)_a-, S(R₆)_a-, P(R₆)_a- or
 -CO₂R₆, wherein a is an integer from 1 to 3;
- each of R₁, R₂, R₃ and R₄ is independently alkylene of 1 to about 20
 carbons;
- each R₃ is independently hydrogen or alkyl of 1 to about 10 carbons; and
- 15 each R₆ is independently -[R₇-X₃]_c-R₈ or -R₉-[X₄-R₁₀]_d-Q, wherein:
- each of c and d is independently an integer from 0 to about 100;
- each Q is independently a phosphate residue, -N(R₁₁)_q-, -S(R₁₁)_q-, -P(R₁₁)_q or
 -CO₂R₆, wherein q is an integer from 1 to 3;
- each of X₃ and X₄ is independently -O-, -S-, -NR₅-, -C(=X₂)-,
 20 -C(=X₂)-N(R₃)-, -N(R₃)-C(=X₂)-, -C(=X₂)-O-, -O-C(=X₂)- or -X₂-(R₃X₂)P(=X₂)-X₂;
- each R₇ is independently alkylene of 1 to about 20 carbons;
- each R₈ is independently hydrogen or alkyl of 1 to about 60 carbons;
- each of R₉ and R₁₀ is independently alkylene of 1 to about 20 carbons; and
- each R₁₁ is independently -[R₇-X₃]_c-R₈ or -R₉-[X₄-R₁₀]_d-W, wherein:

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 37 -

each W is independently a phosphate residue, $-N(R_{12})_w$, $-S(R_{12})_w$, $-P(R_{12})_w$ or $-CO_2R_6$, wherein w is an integer from 1 to 3; and

R_{12} is $-[R_7-X_2]_c-R_8$, with the proviso that the compound of formula (I) comprises at least one, and preferably at least two, quaternary salts.

5 Another cationic lipid compound which may be incorporated in the compositions of the present invention is a compound of the formula



wherein:

each Y_1 is independently a phosphate residue, $N(R_2)_a$, $S(R_2)_a$, $P(R_2)_a$ or $-CO_2R_2$, wherein a is an integer from 1 to 3;

10 R_1 is alkylene of 1 to about 60 carbons containing 0 to about 30 $-O-$, $-S-$, $-NR_3-$ or $-X_2-(R_3X_2)P(=X_2)-X_2-$ heteroatoms or heteroatom groups;

R_2 is a residue of the formula $-R_4-[(X_1-R_5)_x-Y_2]_y-R_6$, wherein:

each of x and y is independently an integer from 0 to about 100;

each X_1 is independently a direct bond, $-O-$, $-S-$, $-NR_3-$, $-C(=X_2)-$,

15 $-C(=X_2)-N(R_3)-$, $-N(R_3)-C(=X_2)-$, $-C(=X_2)-O-$, $-O-C(=X_2)-$ or $-X_2-(R_3X_2)P(=X_2)-X_2-$;

each X_2 is independently O or S;

each Y_2 is independently $-S(R_2)_b$, $-N(R_2)_b$ or $-P(R_2)_b$, wherein b is an integer from 0 to 2;

each R_3 is independently hydrogen or alkyl of 1 to about 10 carbons;

20 each of R_4 and R_6 is independently a direct bond or alkylene of 1 to about 30 carbons containing 0 to about 15 $-O-$, $-S-$, $-NR_3-$ or $-X_2-(R_3X_2)P(=X_2)-X_2-$ heteroatoms or heteroatom groups; and

each R_6 is independently hydrogen or alkyl of 1 to about 60 carbons containing 0 to about 30 $-O-$, $-S-$, $-NR_3-$ or $-X_2-(R_3X_2)P(=X_2)-X_2-$ heteroatoms or

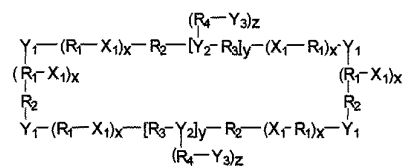
25 heteroatom groups; with the proviso that the compound of formula (II) comprises at least one, and preferably at least two, quaternary salts.

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 38 -

In yet another embodiment, the present lipid compositions may comprise a cationic lipid compound of the formula



(III)

wherein:

- each of x, y and z is independently an integer from 0 to about 100;
- 5 each X_1 is independently -O-, -S-, -NR₅-, -C(=X₂)-, -C(=X₂)-N(R₅)-, -N(R₅)-C(=X₂)-, -C(=X₂)-O-, -O-C(=X₂)- or -X₂-(R₅X₂)P(=X₂)-X₂;
- each X_2 is independently O or S;
- each Y_1 is independently -O-, -N(R₆)_a-, -S(R₆)_a- or -P(R₆)_a-, wherein a is an integer from 0 to 2;
- 10 each Y_2 is independently -N(R₆)_a-, -S(R₆)_a- or -P(R₆)_a-, wherein a is an integer from 0 to 2;
- each Y_3 is independently a phosphate residue, N(R₆)_b-, S(R₆)_b-, P(R₆)_b- or -CO₂R₆, wherein b is an integer from 1 to 3;
- each of R₁, R₂, R₃ and R₄ is independently alkylene of 1 to about 20
- 15 carbons;
- each R₅ is independently hydrogen or alkyl of 1 to about 10 carbons; and
- each R₆ is independently -[R₇-X₃]_c-R₈ or -R₉-[X₄-R₁₀]_d-Q, wherein:
- each of c and d is independently an integer from 0 to about 100;
- each Q is independently a phosphate residue, -N(R₁₁)_q-, -S(R₁₁)_q- or -P(R₁₁)_q- or -CO₂R₁₁, wherein q is an integer from 1 to 3;
- 20 each of X₃ and X₄ is independently -O-, -S-, -NR₅-, -C(=X₂)-, -C(=X₂)-N(R₅)-, -N(R₅)-C(=X₂)-, -C(=X₂)-O-, -O-C(=X₂)- or -X₂-(R₅X₂)P(=X₂)-X₂;

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 39 -

each R_7 is independently alkylene of 1 to about 20 carbons;

each R_8 is independently hydrogen or alkyl of 1 to about 60 carbons;

each of R_9 and R_{10} is independently alkylene of 1 to about 20 carbons; and

each R_{11} is independently $-[R_7-X_3]_c-R_8$ or $-R_9-[X_4-R_{10}]_d-W$, wherein:

5 each W is independently a phosphate residue, $-N(R_{12})_w$, $-S(R_{12})_w$, $-P(R_{12})_w$ or $-CO_2R_{12}$, wherein w is an integer from 1 to 3; and

R_{12} is $-[R_7-X_3]_e-R_8$; with the proviso that the compound of formula (III)

comprises at least one, and preferably at least two, quaternary salts. The cationic lipid compounds which are described generically above are set forth in U.S. Patent No.

10 5,830,430, the disclosures of which are hereby incorporated by reference herein, in their entirety.

In certain preferred embodiments, the lipid compositions comprise phospholipids, particularly one or more of DPPC, DPPE, DPPA, DSPC, DSPE, DSPG, and DAPC (20 carbons).

15 In addition, saturated and unsaturated fatty acids may be employed in the present lipid compositions may include molecules that preferably contain from about 12 carbons to about 22 carbons, in linear or branched form. Hydrocarbon groups consisting of isoprenoid units and/or prenyl groups can be used as well. Examples of saturated fatty acids that are suitable include, for example, lauric, myristic, palmitic, and stearic acids.

20 Suitable unsaturated fatty acids that may be used include, for example, lauroleic, physeteric, myristoleic, palmitoleic, petroselinic, and oleic acids. Examples of branched fatty acids that may be used include, for example, isolauroic, isomyristic, isopalmitic, and isostearic acids. Other lipids which may be employed in the present compositions include those disclosed in Unger et al., U.S. Patent No. 6,090,800 and Unger, U.S. Patent No.

25 6,028,066, the disclosures of which are hereby incorporated herein by reference, in their entireties.

In addition to lipid compositions and/or vesicle compositions formulated from lipids, embodiments of the present invention may also involve vesicles formulated from proteins or derivatives thereof. Vesicles which are formulated from proteins that may
30 be used to prepare the targeted vesicles of the present invention are described, for example, in Feinstein, U.S. Patent Nos. 4,572,203, 4,718,433 and 4,774,958, and Cerny et al., U.S.

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 40 -

Patent No. 4,957,656. Other protein-based vesicles, in addition to those described in the aforementioned patents, would be apparent to one of ordinary skill in the art, once armed with the present disclosure.

In addition to lipid compositions and/or vesicle compositions formulated from lipids and/or proteins, embodiments of the present invention may also involve vesicles formulated from polymers which may be of natural, semi-synthetic (modified natural) or synthetic origin. As used herein, the term polymer denotes a compound comprised of two or more repeating monomeric units, and preferably 10 or more repeating monomeric units. The phrase semi-synthetic polymer (or modified natural polymer), as employed herein, denotes a natural polymer that has been chemically modified in some fashion. Exemplary natural polymers suitable for use in the present invention include naturally occurring polysaccharides. Such polysaccharides include, for example, arabinans, fructans, fucans, galactans, galacturonans, glucans, mannans, xylans (such as, for example, inulin), levan, fucoidan, carrageenan, galatocarlose, pectic acid, pectins, including amylose, pullulan, glycogen, amylopectin, cellulose, dextran, dextrin, dextrose, polydextrose, pustulan, chitin, agarose, keratan, chondroitin, dermatan, hyaluronic acid, alginic acid, xanthan gum, starch and various other natural homopolymer or heteropolymers, such as those containing one or more of the following aldoses, ketoses, acids or amines: erythrose, threose, ribose, arabinose, xylose, lyxose, allose, altrose, glucose, mannose, gulose, idose, galactose, talose, erythrulose, ribulose, xylulose, psicose, fructose, sorbose, tagatose, mannitol, sorbitol, lactose, sucrose, trehalose, maltose, cellobiose, glycine, serine, threonine, cysteine, tyrosine, asparagine, glutamine, aspartic acid, glutamic acid, lysine, arginine, histidine, glucuronic acid, gluconic acid, glucaric acid, galacturonic acid, mannuronic acid, glucosamine, galactosamine, and neuraminic acid, and naturally occurring derivatives thereof. Accordingly, suitable polymers include, for example, proteins, such as albumin. Exemplary semi-synthetic polymers include carboxymethylcellulose, hydroxymethylcellulose, hydroxypropylmethylcellulose, methylcellulose, and methoxycellulose. Exemplary synthetic polymers suitable for use in the present invention include polyethylenes (such as, for example, polyethylene glycol, polyoxyethylene, and polyethylene terephthalate), polypropylenes (such as, for example, polypropylene glycol), polyurethanes (such as, for example, polyvinyl alcohol (PVA)),

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 41 -

polyvinyl chloride and polyvinylpyrrolidone), polyamides including nylon, polystyrene, polylactic acids, fluorinated hydrocarbons, fluorinated carbons (such as, for example, polytetrafluoroethylene), and polymethylmethacrylate, and derivatives thereof. Preferred are biocompatible synthetic polymers or copolymers prepared from monomers, such as

5 acrylic acid, methacrylic acid, ethyleneimine, crotonic acid, acrylamide, ethyl acrylate, methyl methacrylate, 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), lactic acid, glycolic acid, ϵ -caprolactone, acrolein, cyanoacrylate, bisphenol A, epichlorhydrin, hydroxyalkyl-acrylates, siloxane, dimethylsiloxane, ethylene oxide, ethylene glycol, hydroxyalkyl-methacrylates, N-substituted acrylamides, N-substituted methacrylamides, N-vinyl-2-pyrrolidone, 2,4-

10 pentadiene-1-ol, vinyl acetate, acrylonitrile, styrene, p-amino-styrene, p-amino-benzyl-styrene, sodium styrene sulfonate, sodium 2-sulfoxyethylmethacrylate, vinyl pyridine, aminoethyl methacrylates, 2-methacryloyloxy-trimethylammonium chloride, and polyvinylidene, as well polyfunctional crosslinking monomers such as N,N'-methylenebisacrylamide, ethylene glycol dimethacrylates, 2,2'-(p-phenylenedioxy)-diethyl

15 dimethacrylate, divinylbenzene, triallylamine and methylenebis-(4-phenyl-isocyanate), including combinations thereof. Preferable polymers include polyacrylic acid, polyethyleneimine, polymethacrylic acid, polymethylmethacrylate, polysiloxane, polydimethylsiloxane, polylactic acid, poly(ϵ -caprolactone), epoxy resin, poly(ethylene oxide), poly(ethylene glycol), and polyamide (nylon) polymers. Preferable copolymers

20 include the following: polyvinylidene-polyacrylonitrile, polyvinylidene-polyacrylonitrile-polymethylmethacrylate, polystyrene-polyacrylonitrile and poly d-1, lactide co-glycolide polymers. A preferred copolymer is polyvinylidene- polyacrylonitrile. Other suitable biocompatible monomers and polymers will be readily apparent to those skilled in the art, once armed with the present disclosure.

25 As noted above, the present lipid compositions also preferably comprise a gas, such as an inert gas. The gas provides the lipid compositions with enhanced reflectivity, particularly in connection with vesicle compositions in which the gas is entrapped within the vesicles. This may increase their effectiveness as contrast agents.

Preferred gases are gases which are inert and which are biocompatible, that

30 is, gases which are not injurious to biological function. Preferred gases include those selected from the group consisting of air, noble gases, such as helium, rubidium

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 42 -

hyperpolarized xenon, hyperpolarized argon, hyperpolarized helium, neon, argon and xenon, carbon dioxide, nitrogen, fluorine, oxygen, sulfur-based gases, such as sulfur hexafluoride and sulfur tetrafluoride, fluorinated gases, including, for example, partially fluorinated gases or completely fluorinated gases. Exemplary fluorinated gases include the fluorocarbon gases, such as the perfluorocarbon gases, and mixtures thereof. Paramagnetic gases, such as $^{17}\text{O}_2$ may also be used in the lipid compositions.

In preferred embodiments, the gas comprises a fluorinated gas. Such fluorinated gases include materials which contain one, or more than one, fluorine atom. Preferred are gases which contain more than one fluorine atom, with perfluorocarbons (that is, fully fluorinated fluorocarbons) being more preferred. Preferably, the perfluorocarbon gas is selected from the group consisting of perfluoromethane, perfluoroethane, perfluoropropane, perfluorobutane, perfluoropentane, perfluorocyclobutane and mixtures thereof. More preferably, the perfluorocarbon gas is perfluoropropane or perfluorobutane, with perfluorobutane being particularly preferred. Another preferable gas is sulfur hexafluoride. Yet another preferable gas is heptafluoropropane, including 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropane and its isomer, 1,1,2,2,3,3,3-heptafluoropropane. It is contemplated that mixtures of different types of gases, such as mixtures of a perfluorocarbon gas and another type of gas, such as air, can also be used in the compositions of the present invention. Other gases, including the gases exemplified above, would be readily apparent to one skilled in the art based on the present disclosure.

In certain preferred embodiments, a gas, for example, air or a perfluorocarbon gas, is combined with a liquid perfluorocarbon, such as perfluoropentane, perfluorohexane, perfluoroheptane, perfluorooctane, perfluorononane, perfluorooctylbromide (PFOB), perfluorodecalin, perfluorododecalin, perfluorooctyl iodide, perfluorotripropylamine and perfluorotributylamine.

It may also be desirable to incorporate in the lipid compositions a precursor to a gaseous substance. Such precursors include materials that are capable of being converted to a gas *in vivo*. Preferably, the gaseous precursor is biocompatible, and the gas produced *in vivo* is biocompatible also.

Among the gaseous precursors which are suitable for use in compositions described herein are agents which are sensitive to pH. These agents include materials that

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 43 -

are capable of evolving gas, for example, upon being exposed to a pH that is neutral or acidic. Examples of such pH sensitive agents include salts of an acid which is selected from the group consisting of inorganic acids, organic acids and mixtures thereof. Carbonic acid (H_2CO_3) is an example of a suitable inorganic acid, and aminomalonic acid is an example of a suitable organic acid. Other acids, including inorganic and organic acids, would be readily apparent to one skilled in the art based on the present disclosure.

Gaseous precursors which are derived from salts are preferably selected from the group consisting of alkali metal salts, ammonium salts and mixtures thereof. More preferably, the salt is selected from the group consisting of carbonate, bicarbonate, sesquicarbonate, aminomalonate and mixtures thereof.

Examples of suitable gaseous precursor materials which are derived from salts include, for example, lithium carbonate, sodium carbonate, potassium carbonate, lithium bicarbonate, sodium bicarbonate, potassium bicarbonate, magnesium carbonate, calcium carbonate, magnesium bicarbonate, ammonium carbonate, ammonium bicarbonate, ammonium sesquicarbonate, sodium sesquicarbonate, sodium aminomalonate and ammonium aminomalonate. Aminomalonate is well known in the art, and its preparation is described, for example, in Thanassi, *Biochemistry*, Vol. 9, no. 3, pp. 525-532 (1970); Fitzpatrick et al., *Inorganic Chemistry*, Vol. 13, no. 3 pp. 568-574 (1974); and Steimashok et al., *Koordinatsionnaya Khimiya*, Vol. 3, no. 4, pp. 524-527 (1977). The disclosures of these publications are hereby incorporated herein by reference.

In addition to, or instead of, being sensitive to changes in pH, the gaseous precursor materials may also comprise compounds which are sensitive to changes in temperature. Exemplary of suitable gaseous precursors which are sensitive to changes in temperature are the perfluorocarbons. As the artisan will appreciate, a particular perfluorocarbon may exist in the liquid state when the lipid compositions are first made, and are thus used as a gaseous precursor. Alternatively, the perfluorocarbon may exist in the gaseous state when the lipid compositions are made, and are thus used directly as a gas. Whether the perfluorocarbon is used as a liquid or a gas generally depends on its liquid/gas phase transition temperature, or boiling point. For example, a preferred perfluorocarbon, perfluoropentane, has a liquid/gas phase transition temperature (boiling point) of 29.5°C . This means that perfluoropentane is generally a liquid at room temperature (about 25°C),

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 44 -

but is converted to a gas within the human body, the normal temperature of which is about 37°C, which is above the transition temperature of perfluoropentane. Thus, under normal circumstances, perfluoropentane is a gaseous precursor. As a further example, there are the homologs of perfluoropentane, namely perfluorobutane and perfluorohexane. The liquid/gas transition of perfluorobutane is 4°C and that of perfluorohexane is 57°C. Thus, perfluorobutane can be useful as a gaseous precursor, although more likely as a gas, whereas perfluorohexane can be useful as a gaseous precursor because of its relatively high boiling point. As known to one of ordinary skill in the art, the effective boiling point of a substance may be related to the pressure to which that substance is exposed. This relationship is exemplified by the ideal gas law: $PV = nRT$, where P is pressure, V is volume, n is moles of substance, R is the gas constant, and T is temperature. The ideal gas law indicates that as pressure increases, the effective boiling point increases also. Conversely, as pressure decreases, the effective boiling point decreases.

A wide variety of materials can be used as gaseous precursors in the present compositions. It is only required that the material be capable of undergoing a phase transition to the gas phase upon passing through the appropriate temperature. Suitable gaseous precursors include, for example, hexafluoroacetone, isopropyl acetylene, allene, tetrafluoroallene, boron trifluoride, 1,2-butadiene, 2,3-butadiene, 1,3-butadiene, 1,2,3-trichloro-2-fluoro-1,3-butadiene, 2-methyl-1,3-butadiene, hexafluoro-1,3-butadiene, butadiyne, 1-fluorobutane, 2-methylbutane, perfluorobutane, 1-butene, 2-butene, 2-methyl-1-butene, 3-methyl-1-butene, perfluoro-1-butene, perfluoro-2-butene, 4-phenyl-3-butene-2-one, 2-methyl-1-butene-3-yne, butyl nitrate, 1-butyne, 2-butyne, 2-chloro-1,1,1,4,4,4-hexafluorobutyne, 3-methyl-1-butyne, perfluoro-2-butyne, 2-bromo-butyraldehyde, carbonyl sulfide, crotononitrile, cyclobutane, methylcyclobutane, octafluorocyclobutane, perfluorocyclobutene, 3-chlorocyclopentene, perfluorocyclopentane, octafluorocyclopentene, cyclopropane, perfluorocyclopropane, 1,2-dimethyl-cyclopropane, 1,1-dimethyl-cyclopropane, 1,2-dimethylcyclopropane, ethylcyclopropane, methylcyclopropane, diacetylene, 3-ethyl-3-methyl diaziridine, 1,1,1-trifluorodiazethane, dimethyl amine, hexafluorodimethylamine, dimethylethylamine, bis(dimethylphosphine)-amine, perfluorohexane, perfluoroheptane, perfluorooctane, 2,3-dimethyl-2-norbornane, perfluorodimethylamine, dimethyloxonium chloride, 1,3-dioxolane-2-one, 4-methyl-

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 45 -

- 1,1,1,2-tetrafluoroethane, 1,1,1-trifluoroethane, 1,1,2,2-tetrafluoroethane, 1,1,2-trichloro-
 1,2,2-trifluoroethane, 1,1-dichloroethane, 1,1-dichloro-1,2,2,2-tetrafluoroethane,
 1,2-difluoroethane, 1-chloro-1,1,2,2,2-pentafluoroethane, 2-chloro-1,1-difluoroethane,
 1,1-dichloro-2-fluoroethane, 1-chloro-1,1,2,2-tetrafluoroethane, 2-chloro-1,1-
 5 difluoroethane, chloroethane, chloropentafluoroethane, dichlorotrifluoroethane,
 fluoroethane, perfluoroethane, nitropentafluoroethane, nitrosopentafluoroethane,
 perfluoroethylamine, ethyl vinyl ether, 1,1-dichloroethane, 1,1-dichloro-1,2-
 difluoroethane, 1,2-difluoroethane, methane, trifluoromethanesulfonylchloride,
 trifluoromethanesulfonylfluoride, bromodifluoronitrosomethane, bromofluoromethane,
 10 bromochlorofluoromethane, bromotrifluoromethane, chlorodifluoronitromethane,
 chlorodinitromethane, chlorofluoromethane, chlorotrifluoromethane,
 chlorodifluoromethane, dibromodifluoromethane, dichlorodifluoromethane,
 dichlorofluoromethane, difluoromethane, difluoroiodomethane, disilanomethane,
 fluoromethane, iodomethane, iodotrifluoromethane, nitrotrifluoromethane,
 15 nitrosotrifluoromethane, tetrafluoromethane, trichlorofluoromethane, trifluoromethane,
 2-methylbutane, methyl ether, methyl isopropyl ether, methyl lactate, methyl nitrite,
 methyl sulfide, methyl vinyl ether, neopentane, nitrous oxide, 1,2,3-nonadecane-
 tricarboxylic acid 2-hydroxytrimethyl ester, 1-nonene-3-yne, 1,4-pentadiene, *n*-pentane,
 perfluoropentane, 4-amino-4-methylpentan-2-one, 1-pentene, 2-pentene (cis and trans),
 20 3-bromopent-1-ene, perfluoropent-1-ene, tetrachlorophthalic acid, 2,3,6-trimethyl-
 piperidine, propane, 1,1,1,2,2,3-hexafluoropropane, 1,2-epoxypropane, 2,2-difluoro-
 propane, 2-aminopropane, 2-chloropropane, heptafluoro-1-nitropropane, heptafluoro-1-
 nitrosopropane, perfluoropropane, propene, hexafluoropropane, 1,1,1,2,3,3-hexafluoro-2,3-
 dichloropropane, 1-chloropropane, chloropropane-(trans), 2-chloropropane,
 25 3-fluoropropane, propyne, 3,3,3-trifluoropropyne, 3-fluorostyrene, sulfur (di)-decafluoride
 (S_2F_{10}), 2,4-diaminotoluene, trifluoroacetonitrile, trifluoromethyl peroxide, trifluoromethyl
 sulfide, tungsten hexafluoride, vinyl acetylene and vinyl ether.

Perfluorocarbons are both preferred gases and preferred gaseous precursors
 for use in connection with the compositions employed in the methods of the present
 30 invention. Included among such perfluorocarbons are saturated perfluorocarbons,
 unsaturated perfluorocarbons, and cyclic perfluorocarbons. The saturated

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 46 -

perfluorocarbons, which are usually preferred, have the formula C_nF_{2n+2} , where n is from 1 to about 12, preferably about 2 to about 10, more preferably about 3 to about 8, and even more preferably about 3 to about 6. Suitable perfluorocarbons include, for example, perfluoromethane, perfluoroethane, perfluoropropane, perfluorobutane, perfluorocyclobutane, perfluoropentane, perfluorohexane, perfluoroheptane, perfluorooctane and perfluorononane. Preferably, the perfluorocarbon is selected from the group consisting of perfluoropropane, perfluorobutane, perfluorocyclobutane, perfluoropentane, perfluorohexane and perfluorooctane, with perfluorobutane being particularly preferred. Cyclic perfluorocarbons, which have the formula C_nF_{2n} , where n is from 3 to 8, preferably 3 to 6, may also be preferred, and include, for example, hexafluorocyclopropane, octafluorocyclobutane, and decafluorocyclopentane.

In addition to the perfluorocarbons, it may be desirable to utilize stable fluorocarbons which are not completely fluorinated. Such fluorocarbons include heptafluoropropane, for example, 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropane and its isomer, 1,1,2,2,3,3,3-heptafluoropropane.

The gaseous precursor materials may be also photoactivated materials, such as diazonium ion and aminomalonate. As discussed more fully hereinafter, certain lipid and/or vesicle compositions, and particularly vesicle compositions, may be formulated so that gas is formed at the target tissue or by the action of sound on the lipid composition. Examples of gaseous precursors are described, for example, in U.S. Patent Nos. 5,088,499 and 5,149,319, the disclosures of which are hereby incorporated herein by reference, in their entirety. Other gaseous precursors, in addition to those exemplified above, will be apparent to one skilled in the art based on the present disclosure.

The gaseous substances and/or gaseous precursors are preferably incorporated in the lipid and/or vesicle compositions irrespective of the physical nature of the composition. Thus, it is contemplated that the gaseous substances and/or precursors thereto may be incorporated, for example, in lipid compositions in which the lipids are aggregated randomly, as well as in vesicle compositions, including vesicle compositions which are formulated from lipids, such as micelles and liposomes. Incorporation of the gaseous substances and/or precursors thereto in the lipid and/or vesicle compositions may be achieved by using any of a number of methods. For example, in the case of vesicles

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 47 -

based on lipids, the formation of gas filled vesicles can be achieved by shaking or otherwise agitating an aqueous mixture which comprises a gas or gaseous precursor and one or more lipids. This promotes the formation of stabilized vesicles within which the gas or gas precursor is encapsulated.

5 In addition, a gas may be bubbled directly into an aqueous mixture of lipid and/or vesicle-forming compounds. Alternatively, a gas instillation method can be used as disclosed, for example, in U.S. Patent Nos. 5,352,435 and 5,228,446, the disclosures of which are hereby incorporated herein by reference, in their entirety. Suitable methods for incorporating the gas or gas precursor in cationic lipid compositions are disclosed also in
10 U.S. Patent No. 4,865,836, the disclosures of which are hereby incorporated herein by reference. Other methods would be apparent to one skilled in the art based on the present disclosure. Preferably, the gas may be instilled in the lipid and/or vesicle compositions after or during the addition of the stabilizing material and/or during formation of vesicles.

In preferred embodiments, the gaseous substances and/or gaseous precursor
15 materials are incorporated in vesicle compositions, with micelles and liposomes being preferred. As discussed in detail below, vesicles in which a gas or gaseous precursor or both are encapsulated are advantageous in that they provide improved reflectivity *in vivo*.

As discussed more fully hereinafter, it is preferred that the lipid
compositions, and especially the vesicle compositions, be formulated from lipids and
20 optional stabilizing compounds to promote the formation of stable vesicles. In addition, it is also preferred that the lipid and/or vesicle compositions comprise a highly stable gas as well. The phrase "highly stable gas" refers to a gas which has limited solubility and diffusability in aqueous media. Exemplary highly stable gases include perfluorocarbons since they are generally less diffusible and relatively insoluble in aqueous media.
25 Accordingly, their use may promote the formation of highly stable vesicles.

In certain embodiments, it may be desirable to use a fluorinated compound, especially a perfluorocarbon compound, which may be in the liquid state at the temperature of use of the lipid and/or vesicle compositions, including, for example, the *in vivo* temperature of the human body, to assist or enhance the stability of the lipid and/or vesicle
30 compositions, and especially, the gas filled vesicles. Suitable fluorinated compounds include, for example, fluorinated surfactants, such as fluorinated surfactants which are

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 48 -

commercially available as ZONYL® surfactants (the DuPont Company, Wilmington, DE), as well as liquid perfluorocarbons, such as for example, perfluorooctylbromide (PFOB), perfluorodecalin, perfluorododecalin, perfluorooctyl iodide, perfluorotripropylamine, and perfluorotributylamine. In general, perfluorocarbons comprising about six or more carbon
5 atoms will be liquids at normal human body temperature. Among these perfluorocarbons, perfluorooctylbromide and perfluorohexane, which are liquids at room temperature, are preferred. The gas which is present may be, for example, nitrogen or perfluoropropane, or may be derived from a gaseous precursor, which may also be a perfluorocarbon, for example, perfluoropentane. In the latter case, the lipid and/or vesicle compositions may be
10 prepared from a mixture of perfluorocarbons, which for the examples given, would be perfluoropropane (gas) or perfluoropentane (gaseous precursor) and perfluorooctylbromide (liquid). Although not intending to be bound by any theory or theories of operation, it is believed that, in the case of vesicle compositions, the liquid fluorinated compound may be situated at the interface between the gas and the membrane or wall surface of the vesicle.
15 There may be thus formed a further stabilizing layer of liquid fluorinated compound on the internal surface of the stabilizing compound, for example, a biocompatible lipid used to form the vesicle, and this perfluorocarbon layer may also prevent the gas from diffusing through the vesicle membrane. A gaseous precursor, within the context of the present invention, is a liquid at the temperature of manufacture and/or storage, but becomes a gas
20 at least at or during the time of use.

Thus, it has been discovered that a liquid fluorinated compound, such as a perfluorocarbon, when combined with a gas or gaseous precursor ordinarily used to make the lipid and/or vesicle compositions described herein, may confer an added degree of stability not otherwise obtainable with the gas or gaseous precursor alone. Thus, it is
25 within the scope of the present invention to utilize a gas or gaseous precursor, such as a perfluorocarbon gaseous precursor, for example, perfluoropentane, together with a perfluorocarbon which remains liquid after administration to a patient, that is, whose liquid to gas phase transition temperature is above the body temperature of the patient, for example, perfluorooctylbromide. Perfluorinated surfactants, such as ZONYL® fluorinated
30 surfactants, may be used to stabilize the lipid and/or vesicle compositions, and to act, for example, as a coating for vesicles. Preferred perfluorinated surfactants are the partially

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 49 -

fluorinated phosphocholine surfactants. In these preferred fluorinated surfactants, the dual alkyl compounds may be fluorinated at the terminal alkyl chains and the proximal carbons may be hydrogenated. These fluorinated phosphocholine surfactants may be used for making the targeted lipid and/or vesicle compositions of the present invention.

5 In connection with embodiments involving vesicle compositions, the size of the vesicles can be adjusted for the particular intended end use including, for example, diagnostic and/or therapeutic use. The size of the vesicles may preferably range from about 30 nanometers (nm) to about 100 micrometers (μm) in diameter, and all combinations and subcombinations of ranges therein. More preferably, the vesicles have
10 diameters of from about 100 nm to about 10 μm , with diameters of from about 200 nm to about 7 μm being even more preferred. In connection with particular uses, for example, intravascular use, including magnetic resonance imaging of the vasculature, it may be preferred that the vesicles be no larger than about 30 μm in diameter, with smaller vesicles being preferred, for example, vesicles of no larger than about 12 μm in diameter. In certain
15 preferred embodiments, the diameter of the vesicles may be about 7 μm or less, with vesicles having a mean diameter of about 5 μm or less being more preferred, and vesicles having a mean diameter of about 3 μm or less being even more preferred. It is contemplated that these smaller vesicles may perfuse small vascular channels, such as the microvasculature, while at the same time providing enough space or room within the
20 vascular channel to permit red blood cells to slide past the vesicles.

The size of the gas filled vesicles can be adjusted, if desired, by a variety of procedures including, for example, shaking, microemulsification, vortexing, extrusion, filtration, sonication, homogenization, repeated freezing and thawing cycles, extrusion under pressure through pores of defined size, and similar methods.

25 As noted above, compositions employed herein may also include, with respect to their preparation, formation and use, gaseous precursors that can be activated to change from a liquid or solid state into a gas by temperature, pH, light, and energy (such as ultrasound). The gaseous precursors may be made into gas by storing the precursors at reduced pressure. For example, a vial stored under reduced pressure may create a
30 headspace of perfluoropentane or perfluorohexane gas, useful for creating a preformed gas prior to injection. Preferably, the gaseous precursors may be activated by temperature. Set

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 50 -

forth below is a table listing a series of gaseous precursors which undergo phase transitions from liquid to gaseous states at relatively close to normal body temperature (37°C) or below, and the size of the emulsified droplets that would be required to form a vesicle of a maximum size of 10 µm.

TABLE 2

Physical Characteristics of Gaseous Precursors and
Diameter of Emulsified Droplet to Form a 10 µm Vesicle*

Compound	Molecular Weight	Boiling Point (° C)	Density	Diameter (µm) of emulsified droplet to make 10 micron vesicle
perfluoro pentane	288.04	28.5	1.7326	2.9
1-fluorobutane	76.11	32.5	0.67789	1.2
2-methyl butane (isopentane)	72.15	27.8	0.6201	2.6
2-methyl 1-butene	70.13	31.2	0.6504	2.5
2-methyl-2-butene	70.13	38.6	0.6623	2.5
1-butene-3-yne-2-methyl	66.10	34.0	0.6801	2.4
3-methyl-1-butyne	68.12	29.5	0.6660	2.5
octafluoro cyclobutane	200.04	-5.8	1.48	2.8
decafluoro butane	238.04	-2	1.517	3.0
hexafluoro ethane	138.01	-78.1	1.607	2.7

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

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 51 -

The perfluorocarbons, as already indicated, are preferred for use as the gas or gaseous precursors, as well as additional stabilizing components.

As noted above, it is preferred to optimize the utility of the lipid and/or vesicle compositions, especially vesicle compositions formulated from lipids, by using gases of limited solubility. The phrase "limited solubility" refers to the ability of the gas to diffuse out of the vesicles by virtue of its solubility in the surrounding aqueous medium. A greater solubility in the aqueous medium imposes a gradient with the gas in the vesicle such that the gas may have a tendency to diffuse out of the vesicle. A lesser solubility in the aqueous milieu, may, on the other hand, decrease or eliminate the gradient between the vesicle and the interface such that diffusion of the gas out of the vesicle may be impeded. Preferably, the gas entrapped in the vesicle has a solubility less than that of oxygen, that is, about 1 part gas in about 32 parts water. See *Matheson Gas Data Book*, 1966, Matheson Company Inc. More preferably, the gas entrapped in the vesicle possesses a solubility in water less than that of air; and even more preferably, the gas entrapped in the vesicle possesses a solubility in water less than that of nitrogen.

It may be desirable, in certain embodiments, to formulate vesicles from substantially impermeable polymeric materials. In these embodiments, it is generally unnecessary to employ a gas which is highly insoluble also. For example, stable vesicle compositions which comprise substantially impermeable polymeric materials may be formulated with gases having higher solubilities, for example, air or nitrogen.

In addition to, or instead of, the lipid, proteinaceous and/or polymeric compounds discussed above, the compositions described herein may comprise one or more stabilizing materials. Exemplary of such stabilizing materials are, for example, biocompatible polymers. The stabilizing materials may be employed to desirably assist in the formation of vesicles and/or to assure substantial encapsulation of the gases or gaseous precursors. Even for relatively insoluble, non-diffusible gases, such as perfluoropropane or sulfur hexafluoride, improved vesicle compositions may be obtained when one or more stabilizing materials are utilized in the formation of the gas and gaseous precursor filled vesicles. These compounds may help improve the stability and the integrity of the vesicles with regard to their size, shape and/or other attributes.

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 52 -

The terms "stable" or "stabilized", as used herein, means that the vesicles may be substantially resistant to degradation, including, for example, loss of vesicle structure or encapsulated gas or gaseous precursor, for a useful period of time. Typically, the vesicles employed in the present invention have a desirable shelf life, often retaining at least about 90 % by volume of its original structure for a period of at least about two to three weeks under normal ambient conditions. In preferred form, the vesicles are desirably stable for a period of time of at least about 1 month, more preferably at least about 2 months, even more preferably at least about 6 months, still more preferably about eighteen months, and yet more preferably up to about 3 years. The vesicles described herein, including gas and gaseous precursor filled vesicles, may also be stable even under adverse conditions, such as temperatures and pressures which are above or below those experienced under normal ambient conditions.

The stability of the vesicles described herein may be attributable, at least in part, to the materials from which the vesicles are made, including, for example, the lipids, polymers and/or proteins described above, and it is often not necessary to employ additional stabilizing materials, although it is optional and may be preferred to do so. Such additional stabilizing materials and their characteristics are described more fully hereinafter.

The materials from which the vesicles are constructed are preferably biocompatible lipid, protein or polymer materials, and of these, the biocompatible lipids are preferred. In addition, because of the ease of formulation, including the capability of preparing vesicles immediately prior to administration, these vesicles may be conveniently made on site.

The biocompatible polymers useful as stabilizing materials for preparing the gas and gaseous precursor filled vesicles may be of natural, semi-synthetic (modified natural) or synthetic origin. As used herein, the term polymer denotes a compound comprised of two or more repeating monomeric units, and preferably 10 or more repeating monomeric units. The phrase semi-synthetic polymer (or modified natural polymer), as employed herein, denotes a natural polymer that has been chemically modified in some fashion. Exemplary natural polymers suitable for use in the present invention include naturally occurring polysaccharides. Such polysaccharides include, for example,

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 53 -

arabinans, fructans, fucans, galactans, galacturonans, glucans, mannans, xylans (such as, for example, inulin), levan, fucoidan, carrageenan, galatocarlose, pectic acid, pectins, including amylose, pullulan, glycogen, amylopectin, cellulose, dextran, dextrin, dextrose, polydextrose, pustulan, chitin, agarose, keratan, chondroitin, dermatan, hyaluronic acid, 5 alginic acid, xanthan gum, starch and various other natural homopolymer or heteropolymers, such as those containing one or more of the following aldoses, ketoses, acids or amines: erythrose, threose, ribose, arabinose, xylose, lyxose, allose, altrose, glucose, mannose, gulose, idose, galactose, talose, erythrulose, ribulose, xylulose, psicose, fructose, sorbose, tagatose, mannitol, sorbitol, lactose, sucrose, trehalose, maltose, 10 cellobiose, glycine, serine, threonine, cysteine, tyrosine, asparagine, glutamine, aspartic acid, glutamic acid, lysine, arginine, histidine, glucuronic acid, gluconic acid, glucaric acid, galacturonic acid, mannuronic acid, glucosamine, galactosamine, and neuraminic acid, and naturally occurring derivatives thereof. Accordingly, suitable polymers include, for example, proteins, such as albumin. Exemplary semi-synthetic polymers include 15 carboxymethylcellulose, hydroxymethylcellulose, hydroxypropylmethylcellulose, methylcellulose, and methoxycellulose. Exemplary synthetic polymers suitable for use in the present invention include polyethylenes (such as, for example, polyethylene glycol, polyoxyethylene, and polyethylene terephthalate), polypropylenes (such as, for example, polypropylene glycol), polyurethanes (such as, for example, polyvinyl alcohol (PVA)), 20 polyvinyl chloride and polyvinylpyrrolidone), polyamides including nylon, polystyrene, polylactic acids, fluorinated hydrocarbons, fluorinated carbons (such as, for example, polytetrafluoroethylene), and polymethylmethacrylate, and derivatives thereof. Methods for the preparation of vesicles which employ polymers as stabilizing compounds will be readily apparent to those skilled in the art, once armed with the present disclosure, when 25 the present disclosure is coupled with information known in the art, such as that described and referred to in Unger, U.S. Patent No. 5,205,290, the disclosures of which are hereby incorporated herein by reference, in their entirety.

Particularly preferred embodiments of the present invention may involve vesicles which comprise three components: (1) a neutral lipid, for example, a nonionic or 30 zwitterionic lipid, (2) a negatively charged lipid, and (3) a lipid bearing a stabilizing material, for example, a hydrophilic polymer. Preferably, the amount of the negatively

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 54 -

charged lipid will be greater than about 1 mole percent of the total lipid present, and the amount of lipid bearing a hydrophilic polymer will be greater than about 1 mole percent of the total lipid present. Exemplary and preferred negatively charged lipids include phosphatidic acids. The lipid bearing a hydrophilic polymer will desirably be a lipid

5 covalently linked to the polymer, and the polymer will preferably have a weight average molecular weight of from about 400 to about 100,000. Suitable hydrophilic polymers are preferably selected from the group consisting of polyethylene glycol (PEG), polypropylene glycol, polyvinylalcohol, and polyvinylpyrrolidone and copolymers thereof, with PEG polymers being preferred. Preferably, the PEG polymer has a molecular weight of from

10 about 1000 to about 7500, with molecular weights of from about 2000 to about 5000 being more preferred. The PEG or other polymer may be bound to the lipid, for example, DPPE, through a covalent bond, such as an amide, carbamate or amine linkage. In addition, the PEG or other polymer may be linked to a targeting ligand, or other phospholipids, with a covalent bond including, for example, amide, ester, ether, thioester, thioamide or disulfide

15 bonds. Where the hydrophilic polymer is PEG, a lipid bearing such a polymer will be said to be "pegylated." In preferred form, the lipid bearing a hydrophilic polymer may be DPPE-PEG, including, for example, DPPE-PEG5000, which refers to DPPE having a polyethylene glycol polymer of a mean weight average molecular weight of about 5000 attached thereto (DPPE-PEG5000). Other suitable pegylated lipids include, for example,

20 distearoylphosphatidylethanolamine-polyethylene glycol (DSPE-PEG), including DSPE-PEG5000, dipalmitoyl-glycero-succinate-polyethylene glycol (DPGS-PEG), stearyl-polyethylene glycol and cholesteryl-polyethylene glycol.

In certain preferred embodiments of the present invention, the lipid compositions may include about 77.5 mole % DPPC, 12.5 mole % of DPPA, and 10 mole

25 % of DPPE-PEG5000. Also preferred are compositions which comprise about 80 to about 90 mole % DPPC, about 5 to about 15 mole % DPPA and about 5 to about 15 mole % DPPE-PEG5000. Especially preferred are compositions which comprise DPPC, DPPA and DPPE-PEG5000 in a mole % ratio of 82:10:8, respectively. DPPC is substantially neutral, since the phosphatidyl portion is negatively charged and the choline portion is

30 positively charged. Consequently, DPPA, which is negatively charged, may be added to enhance stabilization in accordance with the mechanism described above. DPPE-PEG

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 55 -

provides a pegylated material bound to the lipid membrane or skin of the vesicle by the DPPE moiety, with the PEG moiety free to surround the vesicle membrane or skin, and thereby form a physical barrier to various enzymatic and other endogenous agents in the body whose function is to degrade such foreign materials. The DPPE-PEG may provide
5 more vesicles of a smaller size which are safe and stable to pressure when combined with other lipids, such as DPPC and DPPA, in the given ratios. It is also theorized that the pegylated material, because of its structural similarity to water, may be able to defeat the action of the macrophages of the human immune system, which would otherwise tend to surround and remove the foreign object. The result is an increase in the time during which
10 the stabilized vesicles may function as diagnostic imaging contrast media.

The vesicle compositions may be prepared from other materials, in addition to the materials described above, provided that the vesicles so prepared meet the stability and other criteria set forth herein. These materials may be basic and fundamental, and form the primary basis for creating or establishing the stabilized gas and gaseous precursor
15 filled vesicles. On the other hand, they may be auxiliary, and act as subsidiary or supplementary agents which can enhance the functioning of the basic stabilizing material or materials, or contribute some desired property in addition to that afforded by the basic stabilizing material.

However, it is not always possible to determine whether a given material is
20 a basic or an auxiliary agent, since the functioning of the material in question is determined empirically, for example, by the results produced with respect to producing stabilized vesicles. As examples of how these basic and auxiliary materials may function, it has been observed that the simple combination of a biocompatible lipid and water or saline when shaken will often give a cloudy solution subsequent to autoclaving for sterilization. Such a
25 cloudy solution may function as a contrast agent, but is aesthetically objectionable and may imply instability in the form of undissolved or undispersed lipid particles. Cloudy solutions may be also undesirable where the undissolved particulate matter has a diameter of greater than about 7 μm , and especially greater than about 10 μm . Manufacturing steps, such as sterile filtration, may also be problematic with solutions which contain undissolved
30 particulate matter. Thus, propylene glycol may be added to remove this cloudiness by facilitating dispersion or dissolution of the lipid particles. The propylene glycol may also

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 56 -

function as a wetting agent which can improve vesicle formation and stabilization by increasing the surface tension on the vesicle membrane or skin. It is possible that the propylene glycol can also function as an additional layer that may coat the membrane or skin of the vesicle, thus providing additional stabilization. As examples of such further
5 basic or auxiliary stabilizing materials, there are conventional surfactants which may be used; see D'Arrigo U.S. Patents Nos. 4,684,479 and 5,215,680.

Additional auxiliary and basic stabilizing materials include such agents as peanut oil, canola oil, olive oil, safflower oil, corn oil, or any other oil commonly known to be ingestible which is suitable for use as a stabilizing compound in accordance with the
10 teachings herein. Various auxiliary and basic stabilizing materials are disclosed, for example, in Unger, U.S. Patent No. 5,736,121, the disclosures of which are incorporated herein by reference, in their entirety.

In addition, compounds used to make mixed micelle systems may be suitable for use as basic or auxiliary stabilizing materials, and these include, for example,
15 lauryltrimethylammonium bromide (dodecyl-), cetyltrimethylammonium bromide (hexadecyl-), myristyltrimethylammonium bromide (tetradecyl-), alkyltrimethylammonium chloride (where alkyl is C₁₂, C₁₄ or C₁₆), benzyltrimethylammonium bromide/chloride, benzyltrimethyl hexadecylammonium bromide/chloride, benzyltrimethyl tetradecylammonium bromide/chloride, cetyltrimethylethylammonium
20 bromide/chloride, or cetylpyridinium bromide/chloride.

It has also been found that the gas and gaseous precursor filled vesicles used in the present invention may be controlled according to size, solubility and heat stability by choosing from among the various additional or auxiliary stabilizing materials described herein. These materials can affect these parameters of the vesicles, especially
25 vesicles formulated from lipids, not only by their physical interaction with the membranes, but also by their ability to modify the viscosity and surface tension of the surface of the gas and gaseous precursor filled vesicle. Accordingly, the gas and gaseous precursor filled vesicles used in the present invention may be favorably modified and further stabilized, for example, by the addition of one or more of a wide variety of (a) viscosity modifiers,
30 including, for example, carbohydrates and their phosphorylated and sulfonated derivatives; polyethers, preferably with molecular weight ranges between 400 and 100,000; and di- and

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 57 -

trihydroxy alkanes and their polymers, preferably with molecular weight ranges between 200 and 50,000; (b) emulsifying and/or solubilizing agents including, for example, acacia, cholesterol, diethanolamine, stearates, including glyceryl monostearate, lanolin alcohols, lecithin, mono- and di-glycerides, mono-ethanolamine, oleic acid, oleyl alcohol,

- 5 poloxamer, for example, poloxamer 188, poloxamer 184, and poloxamer 181, polyoxyethylene 50 stearate, polyoxyl 35 castor oil, polyoxyl 10 oleyl ether, polyoxyl 20 cetostearyl ether, polyoxyl 40 stearate, polysorbate 20, polysorbate 40, polysorbate 60, polysorbate 80, propylene glycol diacetate, propylene glycol monostearate, sodium lauryl sulfate, sodium stearate, sorbitan mono-laurate, sorbitan mono-oleate, sorbitan mono-
- 10 palmitate, sorbitan monostearate, stearic acid, trolamine, palmitatesl, and emulsifying wax;
- (c) suspending and/or viscosity-increasing agents, including, for example, acacia, agar, alginic acid, aluminum mono-stearate, bentonite, magma, carbomer 934P, carboxymethylcellulose, calcium and sodium and sodium 12, carrageenan, cellulose, dextran, gelatin, guar gum, locust bean gum, veegum, hydroxyethyl cellulose,
- 15 hydroxypropyl methylcellulose, magnesium-aluminum-silicate, Zeolites®, methylcellulose, pectin, polyethylene oxide, povidone, propylene glycol alginate, silicon dioxide, sodium alginate, tragacanth, xanthan gum, α -d-gluconolactone, glycerol and mannitol; (d) synthetic suspending agents, such as polyethylene glycol (PEG), polyvinylpyrrolidone (PVP), polyvinylalcohol (PVA), polypropylene glycol (PPG), and
- 20 polysorbate; and (e) tonicity raising agents which stabilize and add tonicity, including, for example, sorbitol, mannitol, trehalose, sucrose, propylene glycol and glycerol.

As noted above, the compositions of the present invention further comprise a targeting ligand. Generally speaking, materials which may be employed as targeting ligands include, for example, proteins, including antibodies, glycoproteins and lectins,

- 25 peptides, polypeptides, saccharides, including mono- and polysaccharides, vitamins, steroids, steroid analogs, hormones, cofactors, bioactive agents, and genetic material, including nucleosides, nucleotides and polynucleotides.

- The targeting ligands which may be incorporated in the compositions of the present invention are preferably substances which are capable of targeting receptors and/or
- 30 tissues *in vivo*. With respect to the targeting of tissue, as noted above, the targeting ligands are desirably capable of targeting heart tissue, including myocardial cells, and membranous

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 58 -

tissues, including endothelial and epithelial cells. In the case of receptors, the targeting ligands are desirably capable of targeting GPIIb/IIIa receptors. It is contemplated that preferred targeting ligands for use in targeting tissues and/or receptors, including the tissues and receptors exemplified above, are selected from the group consisting of proteins,

- 5 peptides, saccharides, steroids, steroid analogs, bioactive agents and genetic material, including, for example, antibodies, glycoproteins and lectins, with peptides being preferred. An example of a protein which may be preferred for use as a targeting ligand is Protein A, which is protein that is produced by most strains of *Staphylococcus aureus*. Protein A is commercially available, for example, from Sigma Chemical Co. (St. Louis,
- 10 MO). Protein A may then be used for binding a variety of IgG antibodies. Generally speaking, peptides which are particularly useful as targeting ligands include natural, modified natural, or synthetic peptides that incorporate additional modes of resistance to degradation by vascularly circulating esterases, amidases, or peptidases. One very useful method of stabilization of peptide moieties incorporates the use of cyclization techniques.
- 15 As an example, the end-to-end cyclization whereby the carboxy terminus is covalently linked to the amine terminus via an amide bond may be useful to inhibit peptide degradation and increase circulating half-life. Additionally, a side chain-to-side chain cyclization is also particularly useful in inducing stability. In addition, an end-to-side chain cyclization may be a useful modification as well. In addition, the substitution of an
- 20 L-amino acid for a D-amino acid in a strategic region of the peptide may offer resistance to biological degradation. Suitable targeting ligands, and methods for their preparation, will be readily apparent to one skilled in the art, once armed with the disclosure herein.

- In connection with the targeting of endothelial cells, suitable targeting ligands include, for example, one or more of the following: growth factors, including, for
- 25 example, basic fibroblast growth factor (bFGF), acidic fibroblast growth factor (aFGF), transforming growth factor-alpha (TGF- α), transforming growth factor-beta (TGF- β), platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) vascular endothelial growth factor (VEGF) and human growth factor (HGF); angiogenin; tumor necrosis factors, including tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and tumor necrosis factor-beta (TNF- β);
 - 30 copper-containing polyribonucleotide angiotropin with a molecular weight of about 4,500, as well as low molecular weight non-peptide angiogenic factors, such as 1-butyryl

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 59 -

glycerol; the prostaglandins, including, for example, prostaglandin E₁ (PGE₁) and prostaglandin E₂ (PGE₂); nicotinamide; adenosine; dipyridamole; dobutamine; hyaluronic acid degradation products, such as, for example, degradation products resulting from hydrolysis of β linkages, including hyalobiuronic acid; angiogenesis inhibitors, including, for example, collagenase inhibitors; minocycline; medroxyprogesterone; chitin chemically modified with 6-O-sulfate and 6-O-carboxymethyl groups; angiostatic steroids, such as tetrahydrocortisol; and heparin, including fragments of heparin, such as, for example, fragments having a molecular weight of about 6,000, admixed with steroids, such as, for example, cortisone or hydrocortisone; angiogenesis inhibitors, including angiostatin (AGM-1470 - an angiostatic antibiotic); platelet factor 4; protamine; sulfated polysaccharide peptidoglycan complexes derived from the bacterial wall of an *Arthobacter* species; fungal-derived angiogenesis inhibitors, such as fumagillin derived from *Aspergillus fumigatus*; D-penicillamine; gold thiomalate; thrombospondin; vitamin D₃ analogues, including, for example, 1- α , 25-dihydroxyvitamin D₃ and a synthetic analogue 22-oxa-1- α , 25-dihydroxyvitamin D₃; α -interferon; cytokines, such as the interleukins, including, for example, interleukin-1 (IL-1), interleukin-2 (IL-2), and interleukin-8 (IL-8); granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF); heparin, including low molecular weight fragments of heparin or analogues of heparin; simple sulfated polysaccharides, such as cyclodextrins, including α -, β - and γ -cyclodextrin; tetradecasulfate; transferrin; ferritin; platelet factor 4; protamine; Gly-His-Lys complexed to copper; ceruloplasmin; (12R)-hydroxyeicosatrienoic acid; okadaic acid; lectins; antibodies; CD11a/CD18; and Very Late Activation Integrin-4 (VLA-4).

Endothelial-leukocyte adhesion molecules (ELAM's) are antigens which are expressed by endothelial cells under conditions of stress which then facilitate the migration of the leukocytes across the endothelium lining the vasculature into the surrounding tissues. It is also the surprising discovery that these same endothelial-leukocyte adhesion molecules may be advantageously exploited as receptors for targeting of vesicles. These endothelial cell adhesion molecules belong to a family known as selectins in which the known members, such as GMP-140, all participate in endothelial-leukocyte adhesion and include ELAM-1, LAM-1 and the granule membrane protein 140 (GMP-140) also known as platelet activation-dependent granule-external membrane protein (PADGEM), VCAM-

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 60 -

1/INCAM-110 (Vascular Adhesion Molecule/Inducible Adhesion Molecule) and ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule). The cadherin family of cell adhesion molecules may also be used as targeting ligands, including for example, the E-, N-, and P-cadherins, cadherin-4, cadherin-5, cadherin-6, cadherin-7, cadherin-8, cadherin-9, cadherin-10, and cadherin-11; and most preferably cadherin C-5. Further, antibodies directed to cadherins, such as, for example, the monoclonal antibody Ec6C10, may be used to recognize cadherins expressed locally by specific endothelial cells.

A wide variety of different targeting ligands can be selected to bind to the cytoplasmic domains of the ELAM molecules. Targeting ligands in this regard may include lectins, a wide variety of carbohydrate or sugar moieties, antibodies, antibody fragments, Fab fragments, such as, for example, Fab'2, and synthetic peptides, including, for example, Arginine-Glycine-Aspartic Acid (R-G-D) which may be targeted to wound healing. While many of these materials may be derived from natural sources, some may be synthesized by molecular biological recombinant techniques and others may be synthetic in origin. Peptides may be prepared by a variety of different combinatorial chemistry techniques as are now known in the art. Targeting ligands derived or modified from human leukocyte origin, such as CD11a/CD18, and leukocyte cell surface glycoprotein (LFA-1), may also be used as these are known to bind to the endothelial cell receptor ICAM-1. The cytokine inducible member of the immunoglobulin superfamily, VCAM-1, which is mononuclear leukocyte-selective, may also be used as a targeting ligand. VLA-4, derived from human monocytes, may be used to target VCAM-1. Antibodies and other targeting ligands may be employed to target endoglin, which is an endothelial cell proliferation marker. Endoglin is upregulated on endothelial cells in miscellaneous solid tumors. A targeting ligand which may be used to target endoglin is the antibody TEC-11. R.E. Thorpe and F.J. Burrows, *Breast Cancer Research and Treatment*, Vol. 36, pp. 237-51 (1995).

Endothelial cell activation in the setting of atherosclerosis is used in this invention to target the compositions to regions of arteriosclerosis including, for example, atherosclerotic plaque. One such target that can be used is the inducible mononuclear leukocyte endothelial adhesion molecule recognized by Rb1/9 as an ATHERO-ELAM. The monoclonal antibodies, H4/18 and H18/7, may be used to target endothelial cell

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 61 -

surface antigens which are induced by cytokine mediators. As a preferred embodiment of this invention, gas filled vesicles are targeted to atherosclerotic plaque to non-invasively detect diseased blood vessels before severe damage has occurred, for example, prior to stroke or myocardial infarction, so that appropriate medical or surgical intervention may be implemented. *ATHERO-ELAM* is a preferred target and ligands, such as antibodies, peptides, or lectins or combinations thereof may be used to target this cell surface epitope expressed on endothelial cells in the context of atherosclerosis. Alternatively, lipoproteins or lipoprotein fragments derived from low or high density lipoprotein proteins may be used as targeting ligands. Additionally, cholesterol may be used to target the endothelial cells and localize the lipids, vesicles, and the like, to regions of atherosclerotic plaque. In embodiments which involve the use of cholesterol as a targeting ligand, the cholesterol is preferably unmodified (non-derivatized) with other chemical groups, moieties, ligands, and the like.

A targeting ligand directed toward thrombotic material in the plaque may be used to differentiate between active and inactive regions of atherosclerotic plaque. Active plaques in the process of generating thrombi are more dangerous as these plaques may ultimately occlude a vessel or result in emboli. In this regard, in addition to low molecular weight heparin fragments, other targeting ligands, such as, for example, anti-fibrin antibody, tissue plasminogen activator (t-PA), anti-thrombin antibody and fibrin antibodies directed to platelet activation fractions, may be used to target active plaque with evolving clots. Most preferred targeting ligands are those which will target a plasma membrane associated GPIIb/IIIa in activated platelets in addition to targeting P-selectin, and an antibody or associated antibody fragment directed to GPIIb/IIIa. The present invention is also useful for detecting regions of acute myocardial infarction. Conveniently, by attaching anti-myosin (particularly cardiomyosin) antibody or anti-actin antibodies to the lipids, polymers or stabilizing materials, infarcted myocardium may be detected by the methods of the present invention. For targeting to granulation tissue (healing wounds), many of the above targeting ligands may be useful. The wound healing tripeptide, arginine-glycine-aspartic acid (RGD), may also be used as a targeting ligand in this regard.

As with the endothelial cells discussed above, a wide variety of peptides, proteins and antibodies may be employed as targeting ligands for targeting epithelial cells.

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 62 -

Preferably, a peptide, including synthetic, semi-synthetic or naturally-occurring peptides, with high affinity to the epithelial cell target receptor may be selected, with synthetic peptides being more preferred. In connection with these preferred embodiments, peptides having from about 5 to about 15 amino acid residues are preferred. Antibodies may be
 5 used as whole antibody or antibody fragments, for example, Fab or Fab'2, either of natural or recombinant origin. The antibodies of natural origin may be of animal or human origin, or may be chimeric (mouse/human). Human recombinant or chimeric antibodies are preferred and fragments are preferred to whole antibody.

Examples of monoclonal antibodies which may be employed as targeting
 10 ligands in the present compositions include CALAM 27, which is formed by immunizing BALB/c mice with whole human squamous cell carcinoma of the tongue and forming hybridomas by crossing extracted spleen cells with those of an NS1 syngeneic myeloma cell line. Gioanni, J. et al., *Cancer Research*, Vol. 47, pp. 4417-4424 (1987). CALAM 27 is directed to surface epitopes of both normal and malignant epithelial cells. Normal
 15 lymph nodes generally do not contain cells expressing these epitopes. See *Cancer Research*, Vol. 47, pp. 4417-4424 (1987). Accordingly, lipid and/or vesicle compositions comprising this antibody can be used to target metastases in the lymph nodes. The monoclonal antibody 3C2 may be employed as a targeting ligand for targeting malignant epithelial cells of serious ovarian carcinoma and endometrioid carcinoma. Another
 20 exemplary targeting ligand is Mab 4C7 (see *Cancer Research*, Vol. 45, 2358-2362, 1985), which may be used to target mucinous carcinoma, endometrioid carcinoma and mesonephroid carcinoma. For targeting squamous cell carcinoma in head and neck cancer, Mab E48 (*Biological Abstract*, Vol. 099 Issue. 066 Ref. 082748) may be used as a targeting ligand. For targeting malignant melanoma, the monoclonal antibody 225.28s
 25 (*Pathol. Biol.*, Vol. 38 (8), pp. 866-869, 1990) may be employed.

Targeting ligands may be selected for targeting antigens, including antigens associated with breast cancer, such as epidermal growth factor receptor (EGFR), fibroblast growth factor receptor, erbB2/HER-2 and tumor associated carbohydrate antigens (*Cancer*, Vol. 74 (3) pp. 1006-12 (1994)). CTA 16.88, homologous to cytokeratins 8, 18 and 19, is
 30 expressed by most epithelial-derived tumors, including carcinomas of the colon, pancreas, breast, ovary and lung. Thus, antibodies directed to these cytokeratins, such as 16.88

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 63 -

(IgM) and 88BV59 (IgG3k), which recognize different epitopes on CTA 16.88 (*Semin. Nucl. Med.*, Vol. 23 (2), pp. 165-79 (1993)), may be employed as targeting ligands. For targeting colon cancer, anti-CEA IgG Fab' fragments may be employed as targeting ligands. Chemically conjugated bispecific anti-cell surface antigen, anti-hapten Fab'-Fab antibodies may also be used as targeting ligands. The MG series monoclonal antibodies may be selected for targeting, for example, gastric cancer (*Chin. Med. Sci. J.*, Vol. 6 (1), pp. 56-59 (1991)).

There are a variety of cell surface epitopes on epithelial cells for which targeting ligands may be selected. For example, the protein human papilloma virus (HPV) has been associated with benign and malignant epithelial proliferations in skin and mucosa. Two HPV oncogenic proteins, E6 and E7, may be targeted as these may be expressed in certain epithelial derived cancers, such as cervical carcinoma. See *Curr. Opin. Immunol.* Vol. 6 (5), pp. 746-54 (1994). Membrane receptors for peptide growth factors (PGF-R), which are involved in cancer cell proliferation, may also be selected as tumor antigens. *Anticancer Drugs*, Vol. 5 (4), pp. 379-93 (1994). Also, epidermal growth factor (EGF) and interleukin-2 may be targeted with suitable targeting ligands, including peptides, which bind these receptors. Certain melanoma associated antigens (MAA), such as epidermal growth factor receptor (EGFR) and adhesion molecules (*Tumor Biol.*, Vol. 15 (4), pp. 188-202 (1994)), which are expressed by malignant melanoma cells, can be targeted with the compositions provided herein. The tumor associated antigen FAB-72 on the surface of carcinoma cells may also be selected as a target.

A wide variety of targeting ligands may be selected for targeting myocardial cells. Exemplary targeting ligands include, for example, anticardiomycin antibody, which may comprise polyclonal antibody, Fab'2 fragments, or be of human origin, animal origin, for example, mouse origin, or of chimeric origin. Additional targeting ligands include dipyridamole; digitalis; nifedipine; apolipoprotein; low density lipoproteins (LDL), including α -LDL, vLDL and methyl LDL; ryanodine; endothelin; complement receptor type I; IgG Fc; beta 1-adrenergic; dihydropyridine; adenosine; mineralocorticoid; nicotinic acetylcholine and muscarinic acetylcholine; antibodies to the human alpha 1A-adrenergic receptor; bioactive agents, such as drugs, including the alpha 1-antagonist prazosin; antibodies to the anti-beta-receptor; drugs which bind to the anti-

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 64 -

beta-receptor; anti-cardiac RyR antibodies; endothelin-1, which is an endothelial cell-derived vasoconstrictor peptide that exerts a potent positive inotropic effect on cardiac tissue (endothelin-1 binds to cardiac sarcolemmal vesicles); monoclonal antibodies which may be generated to the T cell receptor alpha-beta receptor and thereby employed to

5 generate targeting ligands; the complement inhibitor sCR1; drugs, peptides or antibodies which are generated to the dihydropyridine receptor; monoclonal antibodies directed towards the antiinterleukin 2 receptor may be used as targeting ligands to direct the present compositions to areas of myocardial tissue which express this receptor and which may be up-regulated in conditions of inflammation; cyclosporine for directing similarly the

10 compositions to areas of inflamed myocardial tissue; methylisobutyl isonitrile; lectins which bind to specific sugars on membranes of cardiac myocytes and cardiac endothelial cells; adrenomedullin (ADM), which is an endogenous hypotensive and vasorelaxing peptide; atrial natriuretic peptide (ANP); C-type natriuretic peptide (CNP), which is a 22 amino acid peptide of endothelial cell origin and is structurally related to atrial natriuretic

15 peptide but genetically distinct, and possesses vasoactive and antimitogenic activity; vasonatin peptide (VNP) which is a chimera of atrial natriuretic peptide (ANP) and C-type natriuretic peptide (CNP) and comprises 27 amino acids; thrombin; endothelium-derived relaxing factor (EDRF); neutral endopeptidase 1 (NEP-1); competitive inhibitors to EDRF, including, for example, NG-monomethyl-L-arginine (L-NMMA); potassium

20 channel antagonists, such as charybdotoxin and glibenclamide; antiheart antibodies, which may be identified in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy but which preferably do not elicit cytolysis in the myocardium; antibodies directed against the adenine nucleotide translocator, the branched-chain keto acid dehydrogenase or cardiac myosin; specific antagonists for the endothelin-A receptor, which may be referred to as BQ-123;

25 and antibodies to the angiotensin II receptor.

Two of the major antigens of heart sarcolemmal are calcium binding glycoproteins which copurify with the dihydropyridine receptor. Antisera may be raised, including polyclonal or monoclonal antibodies, against purified sarcolemma. These antibodies may also be employed as targeted ligands. Purified fractions of the calcium

30 binding glycoproteins may be isolated from the plasma membranes of the sarcolemma and then used to generate antibodies. ANP, which, as noted above, may be used as a targeting

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 65 -

ligand, can be obtained from cultures of human aortic endothelial cells. ANP is generally localized in endothelium, but also may localize to the endothelial or myocardial tissue.

ANP may be prepared, for example, using recombinant techniques, as well as by synthesis of the peptide using peptide synthesis techniques well known to those skilled in the art. It

- 5 is also possible to use an antibody, either polyclonal or monoclonal, directed towards ANP. Similarly, a peptide directed to ANP may be used for targeting endothelial and/or myocardial cells. Both the β and α forms of atrial natriuretic factor may be used as potential targeting ligands for directing the present compositions to myocardial tissue.

- A wide variety of targeting ligands may be employed to direct the present
10 lipid compositions, and particularly vesicle compositions, to the GPIIb/IIIa receptor. In preferred form, the targeting ligand exhibits a binding affinity (K_d) to the GPIIb/IIIa receptor of no greater than about 10^{-3} molar. More preferably, the targeting ligand exhibits a binding affinity (K_d) to the GPIIb/IIIa receptor of less than about 10^{-3} molar such as, for example, binding affinities ranging from about 10^{-9} molar to less than about 10^{-3} molar, and
15 all combinations and subcombinations of ranges of binding affinities therein. Even more preferably, the targeting ligand exhibits a binding affinity (K_d) to the GPIIb/IIIa receptor of from about 10^{-7} molar to about 10^{-5} molar, with a binding affinity of about 10^{-6} molar being especially preferred.

- Compositions which are directed to the GPIIb/IIIa receptor are highly useful
20 for targeting vascular thromboses or clots, and are useful for diagnosing, as well as treating such clots. In certain preferred embodiments, the targeting ligand is a peptide containing the sequence Gly-Asp (GD) such as, for example, Arg-Gly-Asp (RGD). In other preferred embodiments, the targeting ligand is a peptide containing the sequence Ala-Gly-Asp (AGD) such as, for example, peptides containing the sequence Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val
25 (KQAGDV) which is the γ -carboxy sequence of fibrinogen.

- Included among the targeting ligands which are suitable for use in the compositions and methods of the present invention are peptides such as Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS), Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro (GRGDSP), and Gly-Pro-Arg-Pro (GPRP). Pentapeptides containing the sequence Arg-Gly-Asp (RGD) are also useful including, for
30 example, G4120, which is a cyclic peptide containing the amino acid sequence Arg-Gly-Asp (RGD). Also useful are peptides derived from human coagulation Factor XIIIa

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 66 -

including, for example, fragments such as

NKLIVRRGQSFYVQIDFSRPYDPRRD LFRVEYVIGRYPQENKGTYPVPIVSELQSG
KWGAKIVMREDRSVRLSIQSSPKCTVGKFRMYVAVWTPYGVLRTSRNPETD TYIL
FNPWCEDDAVYLDNEKEREEYVLNDIGVIFYGEVNDIKTRSWSYGQF-R' where R'

- 5 is -CONH₂ or -NH₂. In addition, peptides which are fragments of the Factor XIIIa
fragment, which include in their sequence the sequence

NKLIVRRGOSFYVQIDFSRPYDPRRD or

DDAVYLDNEKEREEYVLNDIGVIFYGEVNDIKTRSWSYGQF.

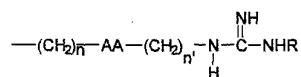
- Additional peptides which may be useful as targeting ligands for targeting
10 the GPIIb/IIIa receptor include, for example, peptides comprising the tripeptide sequence of
arginine-tyrosine-aspartic acid (Arg-Tyr-Asp; also abbreviated RGD), linked from amino-
to-carboxy-terminus and which may bind to the GPIIb/IIIa binding region on activated
platelets. Exemplary of such peptides include, for example, peptides of the general
formula R¹-(X¹)_n-Arg-Tyr-Asp-(Y)_o-(X²)_m-R², wherein each of X¹, X² and Y may
15 independently be one or more amino acid residues while, in certain cases, it is preferred
that Y is other than a serine or alanine residue, and each of m, n and o is independently 0 or
1, provided, in certain cases, that when m is 1, then o is 1, and R¹ is a protected or
unprotected terminal amino group and R² is a protected or unprotected terminal carboxy
group. In a preferred embodiment, X¹ is the peptide Ala-Arg-Arg-Ser-Ser-Pro-Ser-Tyr-Tyr
20 and X² is the peptide Gly-Ala-Gly-Pro-Tyr-Tyr-Ala-Met-Asp-Tyr. Useful peptides include
Arg-Ser-Pro-Ser-Tyr-Tyr-Arg-Tyr-Asp-Gly-Ala-Gly-Pro-Tyr-Tyr-Ala-Met-Asp-Tyr and
Ala-Arg-Arg-Ser-Pro-Ser-Tyr-Tyr-Arg-Tyr-Asp-Gly-Ala-Gly-Pro-Tyr-Tyr-Ala-Met-Asp-
Tyr.

- Synthetic compounds which combine a natural amino acid sequence with
25 synthetic amino acids can also be used as the targeting ligand, such as a fibrinogen receptor
antagonist compound which comprises the sequence XX-Gly-Asp, wherein XX is a
synthetic α-amino acid containing a linear side chain, such as

WO 02/36161

PCT/US01/32308

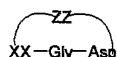
- 67 -



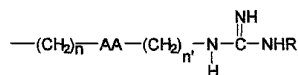
wherein $n + n'$ is 3; AA is a single bond; and R is phenyl or benzyl;

or $\text{---}(\text{CH}_2)_n\text{---AA---}(\text{CH}_2)_{n'}\text{---NHR}$, wherein n is an integer of 1 to 4; n' is an integer of 2 to 4; AA is oxygen, sulfur or a single bond; and R is H, C_{1-6} alkyl, optionally substituted aryl, optionally substituted arylmethyl or optionally substituted cycloalkyl, provided, in certain cases, that when AA is a single bond and R is H, then $n + n'$ is other than 3 or 4.

Another such compound comprises a fibrinogen receptor antagonist of the formula:



wherein XX is a synthetic α -amino acid containing a linear side chain having the formula



wherein $n + n'$ is 3; AA is a single bond; and R is phenyl or benzyl; or

10 $\text{---}(\text{CH}_2)_n\text{---AA---}(\text{CH}_2)_{n'}\text{---NHR}$, wherein n is an integer of 1 to 4; n' is an integer of 2 to 4; AA is oxygen, sulfur or a single bond; and R is H, C_{1-6} alkyl, optionally substituted cycloalkyl, provided that, in certain cases, when AA is a single bond and R is H, then $n + n'$ is other than 3 or 4, and ZZ is a sequence of 1 to 4 optionally substituted amino acids.

15 Other useful peptides for use as targeting ligands include, for example, "Elegantin", which has the following sequence: Gly-Glu-Glu-Cys-Asp-Cys-Gly-Ser-Pro-Glu-Asn-Pro-Cys-Cys-Asp-Ala-Ala-Thr-Cys-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-Ala-Gln-Cys-Ala-Asp-Gly-Leu-Cys-Cys-Asp-Gln-Cys-Arg-Phe-Lys-R'-Arg-Thr-Ile-Cys-Arg-Arg-Ala-Arg-Gly-Asp-Asn-Pro-Asp-Asp-Arg-Cys-Thr-Gly-Gln-Ser-Ala-Asp-Cys-Pro-Arg-Asn-

Gly-Tyr, wherein each of R and R' is independently any amino acid; "Albolabrin", which has the following sequence: Glu-Ala-Gly-Glu-Asp-Cys-Asp-Cys-Gly-Ser-Pro-Ala-Asn-Pro-Cys-Cys-Asp-Ala-Ala-Thr-Cys-Lys-Leu-Leu-Pro-Gly-Ala-Gln-Cys-Gly-Glu-Gly-Leu-Cys-Cys-Asp-Gln-Cys-Ser-Phe-Met-Lys-Lys-Gly-Thr-Ile-Cys-Arg-Arg-Ala-Arg-Gly-Asp-Asp-Leu-Asp-Asp-Tyr-Cys-Asn-Gly-Ile-Ser-Ala-Gly-Cys-Pro-Arg-Asn-Pro-Leu-His-Ala; "Batroxostatin", which has the following sequence: Glu-Ala-Gly-Glu-Glu-Cys-Asp-Cys-Gly-Thr-Pro-Glu-Asn-Pro-Cys-Cys-Asp-Ala-Ala-Thr-Cys-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-Ala-Gln-Cys-Ala-Glu-Gly-Leu-Cys-Cys-Asp-Gln-Cys-Arg-Phe-Lys-Gly-Ala-Gly-Lys-Ile-Cys-Arg-Arg-Ala-Arg-Gly-Asp-Asn-Pro-Asp-Asp-Cys-Thr-Gly-Gln-Ser-Ala-Asp-Cys-Pro-Arg-Phe; and "Flavordin", which has the following sequence: Gly-Gly-Glu-Cys-Asp-Cys-Gly-Ser-Pro-Glu-Asn-Pro-Cys-Cys-Asp-Ala-Ala-Thr-Cys-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-Ala-Gln-Cys-Ala-Asp-Gly-Leu-Cys-Cys-Asp-Gln-Cys-Arg-Phe-Lys-R-R'-Arg-Thr-Ile-Cys-Arg-Ile-Ala-Arg-Gly-Asp-Phe-Pro-Asp-Asp-Arg-Cys-Thr-Gly-Leu-Ser-Ala-Asp-Cys-Pro-Arg-R-Asn-Asp-Leu, wherein each of R and R' is independently any amino acid.

Other ligands useful for targeting the GPIIb/IIIa receptor include synthetic compounds, such as Ac-(D)Phe-Pro-boroArg and the cyclic peptidomimetic cyclo(D-2-aminobutyrate-N-Methyl-L-Arginyl-Glycyl-L-Aspartyl-3-amino-methyl-benzoic acid) methanesulfonate salt. Peptides that can also be used include a library of hexapeptides flanked by cysteine residues (capable of forming cyclic disulfides) and cyclic, disulfide-bonded forms of peptides with the sequence Arg-Gly-Asp or Lys-Gly-Asp, as well as the carboxyl-terminal derived peptide, REYVVMWK. Certain matrix glycoproteins such as Thrombospondin are also useful in this regard. Members of the serpin family of serine protease inhibitors, such as Plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) are other useful ligands. Other synthetic compounds which may be useful for targeting the GPIIb/IIIa receptor include, for example, ticlopidine, clopidogrel, tirofiban, and abciximab and analogs and derivatives thereof.

Generally speaking, it is preferred to employ as targeting ligands for the GPIIb/IIIa receptor a peptide having from about 3 to about 20 amino acids, with peptides having from about 4 to about 15 amino acids being more preferred. Even more preferably, targeting ligands for the GPIIb/IIIa receptor may comprise peptides having from about 4 to

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 69 -

about 8 amino acids, with peptides having from about 4 to about 6 amino acids or about 5 amino acids being still more preferred.

If desired, the peptides may be cyclized, for example, by (1) sidechain-to-sidechain covalent linkages, including, for example, by the formation of a disulfide linkage via the oxidation of two thiol containing amino acids or analogs thereof, including, for example, cysteine or penicillamine; (2) end-to-sidechain covalent linkages, including, for example, by the use of the amino terminus of the amino acid sequence and a sidechain carboxylate group, such as, for example, a non-critical glutamic acid or aspartic acid group. Alternatively, the end-to-sidechain covalent linkage may involve the carboxylate terminus of the amino acid sequence and a sidechain amino, amidine, guanidine, or other group in the sidechain which contains a nucleophilic nitrogen atom, such sidechain groups including, for example, lysine, arginine, homoarginine, homolysine, or the like; (3) end-to-end covalent linkages that are covalent amide linkages, or the like. Such processes are well known to those skilled in the art. The peptides may also be cyclized via the addition of flanking amino acids. For example, in the case of targeting ligands comprising the tripeptide RGD, flanking amino acids may be added to form $(X)_n$ -RGD- $(Y)_n$ where n is an integer of from about 1 to about 100 and X and Y may be any natural or synthetic amino acid and, with the proviso that at least one of the involved amino acids is cysteine or an analog such as penicillamine. These targeting ligands may be cyclized via cysteine sidechains with the cyclization occurring through disulfide bonds. Other modes of cyclization may involve end-to-end covalent linkages involving amino to carboxylate peptide bonds. In addition, X may be lysine and/or arginine and Y may be aspartate or glutamate with condensation of the side chain moieties to form a cyclic amide. Additional permutations include side chain group reactions with terminal amino or carboxyl groups.

In addition, "pseudocyclization" may be employed, in which cyclization occurs via non-covalent interactions, such as electrostatic interactions, which induces a folding of the secondary structure to form a type of cyclic moiety. It is contemplated that metal ions may aid the induction of a "pseudocyclic" formation. This type of pseudocyclic formation may be analogous to "zinc fingers." As known to one of ordinary skill in the art, zinc fingers involve the formation due to electrostatic interactions between a zinc ion (Zn^{2+}) and cysteine, penicillamine and/or homocysteine, of a region in the shape of a loop

(the finger). In the case of homocysteine, the RGD sequence would reside at the tip of the finger. Of course, it is recognized that, in the context of the present invention, any type of stabilizing cyclization would be suitable as long the recognition and binding peptide ligand, such as, for example, RGD, maintains the proper conformation and/or topography to bind to the appropriate receptor in clots with a reasonable Michaelis-Menten constant (k_m) or binding constant. As used herein, the term "conformation" refers to the three-dimensional organization of the backbone of the peptide, peptoid, or pseudopeptide, and the term "topography", as used herein, refers to the three-dimensional organization of the sidechain of the peptide, peptoid, or pseudopeptide.

The targeting ligands may be incorporated in the present compositions in a variety of ways which would be apparent to the skilled artisan, once armed with the teachings of the present application. In certain preferred embodiments, including embodiments involving compositions which comprise lipid compounds, proteins, polymers and/or vesicles, the targeting ligands may be associated with the lipid compounds, proteins, polymers and/or vesicles covalently. In certain alternate preferred embodiments, including embodiments involving compositions which comprise lipid compounds, proteins, polymers and/or vesicles, there may be substantially no covalent association between the targeting ligands and other components of the compositions (*i.e.*, the targeting ligands may be free or unbound). For example, in embodiments involving lipid compounds, proteins, polymers and/or vesicles, the targeting ligand may be associated with the lipid compounds, proteins, polymers and/or vesicles non-covalently. In other preferred embodiments in which the targeting ligands are free and/or unbound, the targeting ligands may be combined with the compositions such that the targeting ligands are neither covalently nor non-covalently associated with the other components of the compositions, including, for example, lipid compounds, proteins, polymers and/or vesicles.

It has been surprisingly and unexpectedly found that free or unbound targeting ligand may promote targeting of the present compositions, such as vesicle compositions, including gas filled vesicles, to a desired target including, for example, blood clots. Without intending to be bound by any theory or theories of operation, it is contemplated that such binding may occur due to association of the targeting ligand with other components of the compositions, such as lipids, including lipids present in the

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 71 -

surface of vesicles, for example, via van der Waal's interactions, electrostatic interactions or some other association process. In the case of preferred embodiments involving lipid compositions containing unbound targeting ligand, it is theorized also that it is possible that a functional group in the targeting ligand, such as, for example, an amino group, may spontaneously associate or bind directly to one of the groups on the lipids, *e.g.*, a phosphatidic acid moiety, to form a phosphoramidate bond.

Thus, in the case of lipid compositions, the targeting ligand may, if desired, be bound, such as via a covalent or non-covalent bond, to at least one of the lipids incorporated in the compositions. In the case of vesicles which are formulated from substances other than lipids, for example, clathrates, aerogels and albumin vesicles, the targeting ligand may be bound covalently or non-covalently to one or more of the materials incorporated in the vesicle walls. For example, the targeting ligand may be covalently attached, for example, to a hydrophilic polymer, which in turn is covalently attached to a hydrophobic compound, to form a bioconjugate, which may then be incorporated into the vesicle walls. Preferably, in the case of lipid compositions which comprise cholesterol, the targeting ligand is bound to the cholesterol substantially only non-covalently, and/or that the targeting ligand is bound covalently to a component of the composition, for example, another lipid, such as a phospholipid, other than the cholesterol. If desired, the targeting ligands may also be bound covalently and/or non-covalently to other stabilizing materials, for example, biocompatible polymers, which may be present in the compositions.

In connection with targeting ligands which may be covalently bound to other components of the present compositions including, for example, lipids, polymers, proteins and/or vesicles, as well as other stabilizing materials, the targeting ligands may preferably include at their distal end a functional group which may be useful, for example, in forming such covalent bonds. Examples of such distal functional groups include, for example, amino (-NH₂), hydroxy (-OH), carboxyl (-COOH), thiol (-SH), phosphate, phosphinate, sulfate and sulfinate. In the case of cyclized targeting ligands, the ligand preferably includes a functional group, such as amino, hydroxy, carboxyl, thiol, phosphate, phosphinate, sulfate or sulfinate, through which the covalent linkage may be established and which is generally not critical for binding to the desired receptor, for example, GPIIb/IIIa receptor. Also in the case of cyclized targeting ligands, the cyclization

WO 02/36161

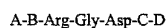
PCT/US01/32308

- 72 -

preferably exposes the backbone conformation and sidechain topography of the targeting ligand such as, for example, the sequences RGD or AGD, such as KQAGDV, to enable binding of the ligand to the receptor, such as the GPIIb/IIIa receptor.

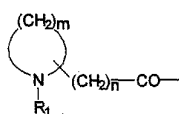
Other suitable targeting ligands include the following compounds: Ac-Cys-Arg-Gly-Asp-Met-Phe-Gly-Cys-CONH₂; Ac-Cys-Arg-Gly-Asp-Met-Leu-Arg-Cys-CONH₂; Ac-Cys-Arg-Gly-Asp-Phe-Leu-Asn-Cys-CONH₂; Ac-Cys-Asn-Thr-Leu-Lys-Gly-Asp-Cys-CONH₂; Ac-Cys-Asn-Trp-Lys-Arg-Gly-Asp-Cys-CONH₂; and Ac-Cys-N-methyl-Arg-Gly-Asp-Pen-CONH₂, where "Pen" refers to penicillamine (β,β-dimethylcysteine).

Other compounds which may be used as targeting ligands include peptides, or derivatives thereof, represented by the formula

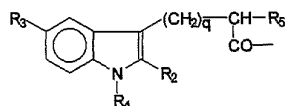


wherein:

A is proline, thioproline, hydroxyproline, dehydroproline, 2-oxo-4-thiazolidine carboxylic acid, N-alkyl glycine or an amino acid derivative of the formula



tryptophan, or a tryptophan derivative of the formula



pyroglutamic acid or 2-azetidinone-4-carboxylic acid

B is serine, glycine, valine, alanine, threonine or β-alanine;

WO 02/36161

PCT/US01/32308

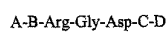
- 73 -

C is an amino acid group having a hydrophobic functional group; and
D is hydroxy or amino;

wherein:

- 5 R_1 is hydrogen, $-(CH_2)_pCH_3$ or $-CO-(CH_2)_pCH_3$,
 R_2 is hydrogen or alkyl;
 R_3 is hydrogen or alkoxy;
 R_4 is hydrogen or alkyl;
 R_5 is hydrogen, amino or acylamino;
 m is an integer of 2 to 5;
 10 n is an integer of 0 to 2;
 p is an integer of 0 to 5; and
 q is an integer of 0 to 3.

Another targeting ligand which may be suitable for use in connection with
the present compositions is a peptide, a peptide derivative, or a salt thereof having the
15 formula



wherein:

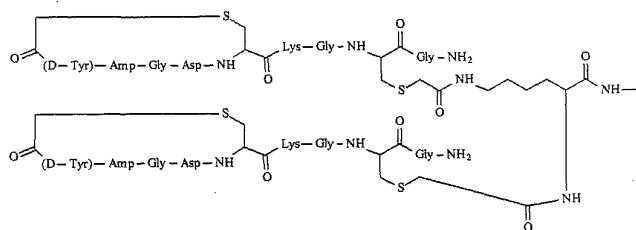
- A is arotic acid or hydroorotic acid;
 B is an amino acid;
 20 C is an amino acid having a hydrophobic functional group; and
 D is hydroxy or amino.

In the above compounds, examples of amino acids having hydrophobic functional groups
in the definition of "C" are tryptophan and phenylalanine. Yet another targeting ligand
which may be suitable for use in the compositions of the present invention is a peptide
25 derivative having the formula

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 74 -

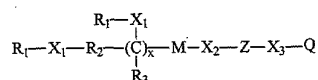


where "Amp" in the above structure is aminomethylphenyl acetic acid. Various peptides which would be suitable for use as a targeting ligand in connection with the present invention, especially for targeting GPIIb/IIIa, are disclosed, for example, in Sato et al., U.S.

- 5 Patent No. 5,498,601 and the following published European Patent Applications: 0 368 486 A2, 0 382 451 A2, and 0 422 938 B1, the disclosures of which are hereby incorporated herein by reference, in their entirety. Other targeting ligands which may be used in the compositions of the present invention, in addition to those exemplified above, would be apparent to one of ordinary skill in the art, once armed with the present disclosure. Other
- 10 suitable targeting ligands include, for example, conjugated peptides, such as, for example, glycoconjugates and lectins, which are peptides attached to sugar moieties. The compositions may comprise a single targeting ligand, as well as two or more different targeting ligands.

There are also provided, in accordance with the present invention,

- 15 compounds having the formula



wherein:

x is 0 or 1;

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 75 -

- each X_1 is independently -O-, -S-, -SO-, -SO₂-, -NR₄-, -X₄-C(=X₃)-, -C(=X₃)-X₄- or -C(=X₃)-;
- each X_2 and X_3 is independently a direct bond, -R₅-X₄-C(=X₃)-, -R₅-C(=X₃)-X₄-, -X₄-C(=X₃)-R₅-, -C(=X₃)-X₄-R₅-, -X₄-R₅-C(=X₃)-X₄-,
- 5 -R₅-X₄-C(=X₃)-R₅-C(=X₃)-X₄- or -R₅-C(=X₃)-X₄-R₅-X₄-C(=X₃)-;
- each X_4 is independently -O-, -NR₄- or -S-;
- each X_5 is independently O or S;
- M is a direct bond, -R₅-X₄-C(=X₃)-, -R₅-C(=X₃)-X₄-,
- R₅-X₄-(YX₃)P(=X₃)-X₄- or -X₄-(YX₃)P(=X₃)-X₄-R₅-;
- 10 Y is hydrogen or a pharmaceutically acceptable counter ion;
- Z is a direct bond or a hydrophilic polymer;
- Q is a targeting ligand or a precursor thereto;
- each R₁ is independently alkyl of 1 to about 50 carbons;
- each R₂ is independently a direct bond or alkylene of 1 to about 30
- 15 carbons;
- each R₃ and R₄ is independently hydrogen or alkyl of 1 to about 10
- carbons; and
- each R₅ is independently a direct bond or alkylene of 1 to about 30
- carbons;
- 20 with the provisos that when three or more of X_1 , X_2 , X_3 , R_2 and M are direct bonds, then Z is a hydrophilic polymer, and when Z is a direct bond, then three or more of X_1 , X_2 , X_3 , R_2 and M are other than direct bonds.
- In the above formula, it is intended that when any symbol appears more than once in a particular formula or substituent, its meaning in each instance is independent
- 25 of the other.
- Also in the above formula, it is intended that when each of two or more adjacent symbols is defined as being a "direct bond" to provide multiple, adjacent direct bonds, the multiple and adjacent direct bonds devolve into a single direct bond. In addition, when x in the above formula is 0, then the groups R₂ and M are linked together,
- 30 and the substituents attached directly to "C" (i.e., X₁-R₁ and R₅) are absent in the defined compound.

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 76 -

In the above formula, each X_1 is independently -O-, -S-, -SO-, -SO₂-, -NR₄-,
-X₄-C(=X₃)-, -C(=X₃)-X₄- or -C(=X₃)-. In preferred embodiments, each X_1 is
independently -X₄-C(=X₃)-, -C(=X₃)-X₄- or -C(=X₃)-. More preferably, each X_1 is
independently -X₄-C(=X₃)- or -C(=X₃)-X₄-. Even more preferably, X_1 is -C(=X₃)-X₄-, for
5 example, -C(=O)-O- or -C(=O)-NH-.

In the above formula, each X_2 and X_3 is independently a direct bond,
-R₅-X₄-C(=X₃)-, -R₅-C(=X₃)-X₄-, -X₄-C(=X₃)-R₅-, -C(=X₃)-X₄-R₅-, -X₄-R₅-C(=X₃)-X₄-,
-R₅-X₄-C(=X₃)-R₅-C(=X₃)-X₄- or -R₅-C(=X₃)-X₄-R₅-X₄-C(=X₃)-. In preferred
embodiments, X_2 and X_3 are independently a direct bond, -R₅-X₄-C(=X₃)-,
10 -R₅-C(=X₃)-X₄-, -X₄-C(=X₃)-R₅-, -C(=X₃)-X₄-R₅-, -X₄-R₅-C(=X₃)-X₄- or
-R₅-X₄-C(=X₃)-R₅-C(=X₃)-X₄-, with -R₅-C(=X₃)-X₄ being more preferred. Even more
preferably, X_2 is a direct bond, -CH₂CH₂-C(=O)-NH- or
-CH₂CH₂NH-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH- and X_3 is a direct bond, -C(=O)-NH-,
-NH-C(=O)-, -NH-C(=O)-CH₂-, -NHCH₂-C(=O)-NH-, -NH-C(=O)-CH₂CH₂- or
15 -(CH₂)_n-C(=O)-NH-, where n is an integer ranging from about 1 to about 20 (and all
combinations and subcombinations of ranges therein), preferably from about 1 to about 15,
more preferably from about 1 to about 10.

In the above formula, each X_4 is independently -O-, -NR₄- or -S-.
Preferably, X_4 is independently -O- or -NR₄-.

20 In the above formula, each X_5 is independently O or S. Preferably, X_5 is O.
In the above formula, M is a direct bond, -R₅-X₄-C(=X₃)-, -R₅-C(=X₃)-X₄-,
-R₅-X₄-(YX₃)P(=X₃)-X₄- or -X₄-(YX₃)P(=X₃)-X₄-R₅-. In certain preferred embodiments, M
is -R₅-X₄-C(=X₃)- or -R₅-X₄-(YX₃)P(=X₃)-X₄-, with M more preferably being
-CH₂O-C(=O) or -CH₂O-(HO)P(=O)-O-. In certain other preferred embodiments, M is
25 -R₅-X₄-C(=X₃)- or -R₅-C(=X₃)-X₄-. In yet other preferred embodiments, M is
-R₅-X₄-(YX₃)P(=X₃)-X₄- or -X₄-(YX₃)P(=X₃)-X₄-R₅- wherein at least one of X_4 or X_5 is S.
In still other preferred embodiments, M is a direct bond.

In the above formula, Z is a direct bond or a hydrophilic polymer.
Preferred hydrophilic polymers are selected from the group consisting of
30 polyalkyleneoxides, polyvinyl alcohol, polyvinylpyrrolidones, polyacrylamides,
polymethacrylamides, polyphosphazenes, poly(hydroxyalkylcarboxylic acids) and

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 77 -

polyoxazolidines. More preferably, Z comprises a polyalkyleneoxide. Even more preferably, Z is a polyalkyleneoxide selected from the group consisting of polyethylene glycol and polypropylene glycol, with polyethylene glycol being still more preferred. In certain other preferred embodiments, Z is a hydrophilic polymer other than

- 5 polyalkyleneoxides, including polyethylene glycol and polypropylene glycol. The molecular weight of Z may vary, depending, for example, on the particular end-use of the compounds. Preferably, Z is a polymer having a molecular weight which ranges from about 100 to about 10,000, and all combinations and subcombinations of ranges therein. More preferably, Z is a polymer having a molecular weight of from about 1,000 to about 10
10 5,000. Also preferred are polymers which exhibit polydispersities ranging from greater than about 1 to about 3, and all combinations and subcombinations of ranges therein. More preferably, Z is a polymer having a polydispersity of from greater than about 1 to about 2, with polydispersities of from greater than about 1 to about 1.5 being even more preferred, and polydispersities of from greater than about 1 to about 1.2 being still more
15 preferred. In alternate preferred embodiments, Z is a direct bond.

- In the above formula, Q is a targeting ligand or a precursor thereto. In embodiments where Q is a targeting ligand, Q is preferably selected from the various targeting ligands discussed in detail above. Thus, for example, Q preferably targets cells or receptors selected from the group consisting of myocardial cells, endothelial cells,
20 epithelial cells, tumor cells and the glycoprotein GPIIb/IIIa receptor. In certain preferred embodiments, Q targets cells or receptors selected from the group consisting of myocardial cells, endothelial cells, epithelial cells and the glycoprotein GPIIb/IIIa receptor. In addition, in embodiments where Q is a targeting ligand, Q is preferably selected from the group consisting of proteins, peptides, saccharides, steroids, steroid analogs, bioactive
25 agents, and genetic material. In these latter embodiments, Q is preferably selected from the group consisting of proteins, peptides and saccharides. In embodiments where Q comprises a peptide, Q preferably comprises the sequences Arg-Gly-Asp (RGD) or Ala-Gly-Asp (AGD), such as Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val (KQAGDV), or Q may be a cyclic peptide, such as, for example, DMP 728. (See, e.g., Mousa et al., *Thrombosis Research*,
30 Vol. 76 (2), pp. 109-119 (1994), the disclosures of which are hereby incorporated herein by reference, in their entirety.) In embodiments where Q comprises a protein, Q is preferably

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 78 -

Protein A. In embodiments where Q comprises a saccharide, Q is preferably a monosaccharide, with mannose and glucose being more preferred. In embodiments where Q is a precursor to a targeting ligand, Q preferably comprises a partially unsaturated or aromatic 5- to 7-membered monocyclic ring containing 1 or 2 N, O or S atoms, and more preferably a maleimide moiety or a pyridyl moiety.

In the above formula, each R_1 is independently alkyl which ranges from 1 to about 50 carbons, and all combinations and subcombinations of ranges therein, or alkenyl of from about 2 to about 50 carbons, and all combinations and subcombinations of ranges therein. Preferably, each R_1 is independently alkyl of greater than 1 to about 40 carbons. More preferably, each R_1 is independently alkyl of about 5 to about 30 carbons. Even more preferably, each R_1 is independently alkyl of about 10 to about 30 carbons, with alkyl of from about 15 to about 28 carbons being yet more preferred. In certain preferred embodiments, R_1 is straight chain alkyl of about 15 to about 17 carbons. R_1 is also preferably fused cycloalkyl and/or cycloalkenyl. In these latter embodiments, R_1 is preferably certain fused cycloalkyl and/or alkenyl of from about 10 to 40 carbons, with fused cycloalkyl and/or alkenyl of from about 20 to 30 carbons being more preferred. A particularly preferred fused cycloalkyl and/or alkenyl group is cholesterol.

In the above formula, each R_2 is independently a direct bond or alkylene which ranges from 1 to about 30 carbons, and all combinations and subcombinations of ranges therein. Preferably, each R_2 is independently alkylene of 1 to about 20 carbons. More preferably, each R_2 is independently alkylene of 1 to about 10 carbons. Even more preferably, each R_2 is independently alkylene of 1 to about 5 carbons, with methylene being especially preferred. In alternate preferred embodiments, R_2 is a direct bond.

In the above formula, each of R_3 and R_4 is independently hydrogen or alkyl which ranges from 1 to about 10 carbons, and all combinations and subcombinations of ranges therein. Preferably, each of R_3 and R_4 is hydrogen or alkyl of 1 to about 5 carbons. More preferably, each of R_3 and R_4 is hydrogen.

In the above formula, each R_5 is independently a direct bond or alkylene which ranges from 1 to about 30 carbons, and all combinations and subcombinations of ranges therein. Preferably, each R_5 is independently a direct bond or alkylene of 1 to about 20 carbons. More preferably, each R_5 is independently a direct bond or alkylene of 1 to

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 79 -

about 10 carbons. Even more preferably, each R_5 is independently a direct bond or alkylene of 1 to about 5 carbons. Still more preferably, each R_5 is a direct bond or $-(CH_2)_x-$, where x is 1 or 2.

In the above compound, when three or more of X_1 , X_2 , X_3 , R_2 and M are direct bonds, then Z is a hydrophilic polymer. Preferably, when two or more of X_1 , X_2 , X_3 , R_2 and M are direct bonds, then Z is a hydrophilic polymer. More preferably, when one or more of X_1 , X_2 , X_3 , R_2 and M are direct bonds, then Z is a hydrophilic polymer.

Also in the above compound, when Z is a direct bond, then three or more of X_1 , X_2 , X_3 , R_2 and M are other than direct bonds. Preferably, when Z is a direct bond, four or more of X_1 , X_2 , X_3 , R_2 and M are other than direct bonds. More preferably, when Z is a direct bond, all of X_1 , X_2 , X_3 , R_2 and M are other than direct bonds.

There are also provided herein compounds of the formula

L-P-T

wherein:

15 L is a hydrophobic compound;
P is a linking group; and
T is a targeting ligand.

Generally speaking, L may be selected from any of a variety of suitable hydrophobic compounds, such as a biocompatible lipid, including the lipids discussed above. In preferred embodiments, L is a lipid selected from the group consisting of lecithins, phosphatidylcholines, phosphatidylserines, phosphatidylinositols, cardiolipins, cholesterolamines, lysophosphatides, erythro-sphingosines, sphingomyelins, ceramides, cerebrosides, saturated phospholipids, unsaturated phospholipids, krill phospholipids, fatty acids and steroids. More preferably, L is a lipid selected from the group consisting of
20 lecithins, phosphatidylcholines, phosphatidylserines, phosphatidylinositols, fatty acids and steroids. Even more preferably, L is a lipid selected from the group consisting of
1,2-diacyl-sn-glycero-3-phosphocholines, 1,2-diacyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamines, 1,2-diacyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerols)], 1,2-diacyl-sn-glycero-3-phosphates, 1,2-diacyl-sn-glycero-3-[phospho-serines], lysophosphatidylcholines,

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 80 -

lysophosphatidylglycerols, 1,2-diacyl-sn-glycerols, 1,2-diacylethylene glycols such as, for example, such as 1,2-dioctanoyl ethylene glycol, 1,2-dicaproyl ethylene glycol, 1,2-dilauroyl ethylene glycol, 1,2-dimyristoyl ethylene glycol, 1,2-dipalmitoyl ethylene glycol and 1,2-dioleoyl ethylene glycol, N-(n-caproylamine)-1,2-diacyl-sn-glycerol-3-phospho-

5 ethanolamines, N-dodecylamine-1,2-diacyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamines, N-succinyl-1,2-diacyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamines, N-glutaryl-1,2-diacyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamines, N-dodecanyl-1,2-diacyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamines, fatty acids, such as stearic acid, and steroids, such as cholesterol.

In other preferred embodiments, L is a protein which comprises albumin.

- 10 In still other preferred embodiments, L is a polymer which comprises synthetic polymers or copolymers prepared from monomers selected from the group consisting of acrylic acid, methacrylic acid, ethyleneimine, crotonic acid, acrylamide, ethyl acrylate, methyl methacrylate, 2-hydroxyethyl methacrylate, lactic acid, glycolic acid, ϵ -caprolactone, acrolein, cyanoacrylate, bisphenol A, epichlorhydrin, hydroxyalkylacrylates, siloxane,
- 15 dimethylsiloxane, ethylene oxide, propylene oxide, ethylene glycol, hydroxyalkyl-methacrylates, N-substituted acrylamides, N-substituted methacrylamides, N-vinyl-2-pyrrolidone, 2,4-pentadiene-1-ol, vinyl acetate, acrylonitrile, styrene, p-amino-styrene, p-aminobenzylstyrene, sodium styrene sulfonate, sodium 2-sulfoxyethyl-methacrylate, vinyl pyridine, aminoethyl methacrylates and 2-methacryloyloxytrimethyl-ammonium
- 20 chloride. Also preferred are compounds where L is a polymer which comprises synthetic polymers or copolymers selected from the group consisting of polyacrylic acid, polyethyleneimine, polymethacrylic acid, polymethylmethacrylate, polysiloxane, polydimethylsiloxane, polylactic acid, poly(ϵ -caprolactone), epoxy resin, poly(ethylene oxide), poly(propylene oxide), poly(ethylene glycol), polyamide, polyvinylidene-
- 25 polyacrylonitrile, polyvinylidene-polyacrylonitrile-polymethylmethacrylate and polystyrene-polyacrylonitrile. Preferred among these polymers is polyvinylidene-polyacrylonitrile copolymer.

In the above compounds, P is a linking group of variable length. In preferred embodiments, P is a hydrophilic polymer. In more preferred embodiments, P is a

- 30 hydrophilic polymer selected from the group consisting of polyalkyleneoxides, polyvinyl alcohol, polyvinylpyrrolidones, polyacrylamides, polymethacrylamides,

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 81 -

polyphosphazenes, poly(hydroxyalkylcarboxylic acids) and polyoxazolidines. More preferably, P is a polyalkyleneoxide polymer, with polyethylene glycol and polypropylene glycol being even more preferred and polyethylene glycol being particularly preferred.

In the above formula, T is a targeting ligand. In preferred embodiments, T is selected from among the various targeting ligands discussed in detail above. Thus, for example, T preferably targets cells or receptors selected from the group consisting of myocardial cells, endothelial cells, epithelial cells, tumor cells and the glycoprotein GPIIb/IIIa receptor. In certain preferred embodiments, T targets cells or receptors selected from the group consisting of myocardial cells, endothelial cells, epithelial cells and the glycoprotein GPIIb/IIIa receptor. In addition, T is preferably selected from the group consisting of proteins, peptides, saccharides, steroids, steroid analogs, bioactive agents, and genetic material. In these latter embodiments, T is preferably selected from the group consisting of proteins, peptides and saccharides. In embodiments where T comprises a peptide, T preferably comprises a sequence Gly-Asp (GD) including, for example, the sequences Arg-Gly-Asp (RGD) or Ala-Gly-Asp (AGD), such as Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val (KQAGDV), or T is a cyclic peptide, such as DMP 728. (*See, e.g.,* Mousa et al., *Thrombosis Research*, Vol. 76 (2), pp. 109-119 (1994), the disclosures of which are hereby incorporated herein by reference, in their entirety.) Also preferred are targeting ligands which target regions of arteriosclerosis, especially atherosclerotic plaque.

In the case of targeting ligands which comprise saccharide groups, suitable saccharide moieties include, for example, monosaccharides, disaccharides and polysaccharides. Exemplary monosaccharides may have six carbon atoms and these saccharides include allose, altrose, glucose, mannose, gulose, idose, galactose, talose, fructose, psicose, verbosc and tagatose. Five carbon saccharids include ribose, arabinose, xylose, lyxose, ribulose and xylulose. Four carbon saccharides include erythrose, threose and erythrulose. Disaccharides include sucrose, lactose, maltose, isomaltose and cellobiose. Saccharide bearing targeting lipids may be synthesized through a multistep organic synthesis approach, as described more fully hereinafter. For example, lipids bearing targeting glucose moieties may be prepared by reacting, for example, α -glucopyranosyl bromide tetrabenzyl with ω -trifluoroacetylaminopolyethyleneglycol to obtain ω -glucopyranosyl tetrabenzyl- ω '-trifluoroacetylaminopolyethyleneglycol. This may

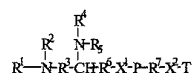
WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 82 -

then be hydrolyzed in a sodium carbonate or potassium carbonate solution and then hydrogenated to obtain ω -glucopyranosyl- ω' -amino-polyethyleneglycol. Aminoglycopyranosyl terminated polyethyleneglycol may then react with N-DPGS-succinimide to form the lipid bearing saccharide DPGS-NH-PEG-Glucose. Also preferred are targeting ligands which target infarcted myocardium. In certain embodiments, the targeting ligands target cancer cells.

In particularly preferred embodiments of the present invention, there are provided compounds having the formula:



(IV)

wherein:

X¹ and X² are independently a direct bond or a linking atom or group selected from the group consisting of -O-, -S-, -N(R⁸)-, -C(=X³)-, -C(=X³)-N(R⁸)-, -N(R⁸)-C(=X³)- and -C(=X³)-N(R⁸)-C(=X³)-;

X³ is -O- or -S-;

R¹ is acyl of from about 7 to about 23 carbons;

R² is hydrogen or lower alkyl;

R³ is a direct bond or alkylene of from 1 to about 10 carbons;

R⁴ is acyl of from about 7 to about 23 carbons;

R⁵ is hydrogen or lower alkyl;

R⁶ and R⁷ are independently a direct bond or alkylene of from 1 to about 10 carbons;

R⁸ is hydrogen or lower alkyl;

P is the residue of a hydrophilic polymer; and

T is a targeting ligand which targets cells or receptors selected from the group consisting of myocardial cells, endothelial cells, epithelial cells, tumor cells and the glycoprotein GPIIb/IIIa receptor.

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 83 -

In the above formula (IV), it is intended that when any symbol appears more than once in a particular formula or substituent, its meaning in each instance is independent of the other.

Also in the above formula (IV), it is intended that when each of two or more adjacent symbols is defined as being a "direct bond" to provide multiple, adjacent direct bonds, the multiple and adjacent direct bonds devolve into a single direct bond.

In the above formula (IV), X^1 and X^2 are independently a direct bond or a linking atom or group selected from the group consisting of -O-, -S-, -N(R⁸)-, -C(=X³)-, -C(=X³)-N(R⁸)-, -N(R⁸)-C(=X³)- and -C(=X³)-N(R⁸)-C(=X³)-. In preferred embodiments, X^1 and X^2 are independently a linking group selected from -C(=X³)-, -C(=X³)-N(R⁸)-, -N(R⁸)-C(=X³)- and -C(=X³)-N(R⁸)-C(=X³)-. In more preferred embodiments, X^1 is -C(=X³)-N(R⁸)-C(=X³)- and X^2 is -C(=X³)-.

In the definition of X^1 and X^2 , X^3 is -O- or -S-. In preferred embodiments, X^3 is -O-.

In the above formula (IV), R^1 is acyl of from about 7 to about 23 carbons. In preferred embodiments, R^1 is acyl of from about 10 to about 22 carbons, with from about 15 to about 20 carbons being more preferred. In even more preferred embodiments, R^1 is acyl of from about 17 to about 19 carbons, with about 18 carbons being particularly preferred.

In the above formula (IV), R^2 is hydrogen or lower alkyl. In preferred embodiments, R^2 is hydrogen.

In the above formula (IV), R^3 is a direct bond or alkylene of from 1 to about 10 carbons. Preferably, R^3 is alkylene of from 1 to about 3 carbons, with methylene being more preferred.

In the above formula (IV), R^4 is acyl of from about 7 to about 23 carbons. In preferred embodiments, R^4 is acyl of from about 10 to about 22 carbons, with from about 15 to about 20 carbons being more preferred. In even more preferred embodiments, R^4 is acyl of from about 17 to about 19 carbons, with about 18 carbons being particularly preferred.

In the above formula (IV), R^5 is hydrogen or lower alkyl. In preferred embodiments, R^5 is hydrogen.

WO 02/36161

PCT/US01/32308

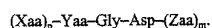
- 84 -

In the above formula (IV), R⁶ and R⁷ are independently a direct bond or alkylene of from 1 to about 10 carbons. Preferably, R⁶ and R⁷ are independently a direct bond or lower alkylene. More preferably, R⁶ is a direct bond and R⁷ is lower alkylene. Even more preferably, R⁷ is ethylene.

5 In the above formula (IV), R⁸ is hydrogen or lower alkyl. In preferred embodiments, R⁸ is hydrogen.

In the above formula (IV), P is a hydrophilic polymer. The hydrophilic polymer may be any of the hydrophilic polymers identified above in connection with the previous discussions involving linking groups. In preferred embodiments, P is a
10 hydrophilic polymer selected from the group consisting of polyalkyleneoxides, polyvinyl alcohol, polyvinylpyrrolidones, polyacrylamides, polymethacrylamides, polyphosphazenes, poly(hydroxyalkylcarboxylic acids) and polyoxazolidines. More preferably, P is a polyalkyleneoxide polymer, with polyethylene glycol (PEG) and polypropylene glycol being even more preferred and polyethylene glycol being particularly preferred. Preferably,
15 the PEG polymer has a molecular weight of from about 1000 to about 7500, and all combinations and subcombinations of ranges and specific molecular weight therein. More preferably, the PEG polymer has a molecular weight of from about 2000 to about 5000, with molecular weights of from about 3000 to about 4000 being even more preferred. In particularly preferred embodiments, the PEG polymer has a molecular weight of about
20 3400.

In the above formula (IV), T is a targeting ligand which targets cells or receptors selected from the group consisting of myocardial cells, endothelial cells, epithelial cells, tumor cells and the glycoprotein GPIIb/IIIa receptor. The targeting ligand may be any of the targeting ligands identified above in connection with the previous discussions
25 involving targeting ligands. In preferred form, the targeting ligand comprises a peptide of the formula:



In the above formula, m and n are independently an integer of from 1 to about 100, and all combinations and subcombinations of ranges therein. In preferred

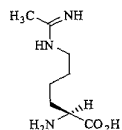
WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 85 -

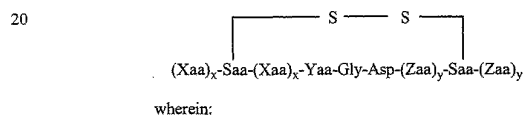
embodiments, m and n are independently an integer of from 1 to about 50, with integers of from 1 to about 20 being more preferred. Even more preferably, m and n are independently an integer of from 1 to about 10, with integers of from 1 to about 5 being still more preferred. In yet more preferred embodiments, n is 1, 2 or 3, with 3 being particularly preferred, and m is 1.

In the above formula, Yaa is selected from Arginine, Homoarginine, and Lysine-N-acetimide, the latter of which has the following formula:



In the above targeting ligand formula, Xaa and Zaa are independently selected from the group consisting of natural amino acids and synthetic amino acids. It is intended that when any symbol appears more than once in a particular formula or substituent, its meaning in each instance is independent of the other. Thus, for example, where n is 3, each Xaa may be either identical or each may be a different amino acid. In certain preferred embodiments, each Xaa is Glycine and Zaa is Serine.

In other preferred embodiments, Xaa and Zaa may be independently selected from sulfur containing amino acids. Suitable sulfur-containing amino acids include, for example, D-Cysteine, L-Cysteine, D-Penicillamine and L-Penicillamine. In such embodiments, the sulfur-containing amino acids may be linked together via a disulfide bridge, as depicted in the following formula:



WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 86 -

each Saa is independently any sulfur-containing amino acid. In the above formula, each x and y may independently be an integer from zero to about 100, and all combinations and subcombinations of ranges therein with integers of from 0 to about 20 being more preferred. Even more preferably, x and y are independently an integer of from 5
 5 0 to about 10, with integers of from 0 to about 5 being still more preferred.

Compounds of formula (IV) may provide desirable advantages including, for example, ease of synthesis, diagnostic efficacy, enhanced biocompatibility, and/or improved targeting efficacy, as discussed below.

The targeting ligand may be incorporated in the present compositions in a
 10 variety of ways. Generally speaking, the targeting ligand may be incorporated in the present compositions by being associated covalently or non-covalently with one or more of the materials which are included in the compositions, including, for example, the hydrophobic portion of the bioconjugates including, for example, lipids, proteins or polymers, as well as any auxiliary stabilizing materials. In preferred form, the targeting
 15 ligand is associated covalently with one or more of the aforementioned materials contained in the present compositions. As noted above, preferred compositions of the present invention comprise lipid, protein or polymer compounds. In these compositions, the targeting ligands are preferably associated covalently with the lipid, protein or polymer compounds.

20 Exemplary covalent bonds by which the targeting ligands are associated with the lipids, proteins, polymers and/or vesicles include, for example, amide (-CONH-); thioamide (-CSNH-); ether (ROR', where R and R' may be the same or different and are other than hydrogen); ester (-COO-); thioester (-COS-); -O-; -S-; -S_n-, where n is greater than 1, preferably about 2 to about 8, and more preferably about 2; carbamates; -NH-; -NR-,
 25 where R is alkyl, for example, alkyl of from 1 to about 4 carbons; urethane; and substituted imidate; and combinations of two or more of these. Covalent bonds between targeting ligands and, for example, lipids, may be achieved through the use of molecules that may act as spacers to increase the conformational and topographical flexibility of the ligand. Examples of such spacers include, for example, succinic acid, 1,6-hexanedioic acid, 1,8-
 30 octanedioic acid, and the like, as well as modified amino acids, such as, for example, 6-aminohexanoic acid, 4-aminobutanoic acid, and the like. In addition, in the case of

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 87 -

targeting ligands which comprise peptide moieties, sidechain-to-sidechain crosslinking may be complemented with sidechain-to-end crosslinking and/or end-to-end crosslinking. Also, small spacer molecules, such as dimethylsuberimide, may be used to accomplish similar objectives. The use of agents, including those used in Schiff's base-type reactions, such as gluteraldehyde, may also be employed. The Schiff's base linkages, which may be reversible linkages, can be rendered more permanent covalent linkages via the use of reductive amination procedures. This may involve, for example, chemical reducing agents, such as lithium aluminum hydride reducing agents or their milder analogs, including lithium aluminum diisobutyl hydride (DIBAL), sodium borohydride (NaBH_4) or sodium cyanoborohydride (NaBH_3CN).

The covalent linking of the targeting ligands to the materials in the present compositions, including the lipids, proteins and/or polymers, may be accomplished using synthetic organic techniques which would be readily apparent to one of ordinary skill in the art, based on the present disclosure. For example, the targeting ligands may be linked to the materials, including the lipids, via the use of well known coupling or activation agents. As known to the skilled artisan, activating agents are generally electrophilic. This electrophilicity can be employed to elicit the formation of a covalent bond. Exemplary activating agents which may be used include, for example, carbonyldiimidazole (CDI), dicyclohexylcarbodiimide (DCC), diisopropylcarbodiimide (DIC), methyl sulfonyl chloride, Castro's Reagent, and diphenyl phosphoryl chloride.

The covalent bonds may involve crosslinking and/or polymerization. Crosslinking preferably refers to the attachment of two chains of polymer molecules by bridges, composed of either an element, a group, or a compound, which join certain carbon atoms of the chains by covalent chemical bonds. For example, crosslinking may occur in polypeptides which are joined by the disulfide bonds of the cystine residue. Crosslinking may be achieved, for example, by (1) adding a chemical substance (cross-linking agent) and exposing the mixture to heat, or (2) subjecting a polymer to high energy radiation. A variety of crosslinking agents, or "tethers", of different lengths and/or functionalities are described, for example, in R.L. Lunblaud, *Techniques in Protein Modification*, CRC Press, Inc., Ann Arbor, MI, pp. 249-68 (1995), the disclosures of which are hereby incorporated herein by reference, in their entirety. Exemplary crosslinkers include, for example, 3,3'-

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 88 -

dithiobis(succinimidylpropionate), dimethyl suberimide, and its variations thereof, based on hydrocarbon length, and bis-N-maleimido-1,8-octane.

In accordance with preferred embodiments, the targeting ligands may be linked or attached to the lipids, proteins or polymers, or other stabilizing materials, via a linking group. A variety of linking groups are available and would be apparent to one skilled in the art, once armed with the present disclosure. Preferably, the linking group comprises a hydrophilic polymer. Suitable hydrophilic linker polymers include, for example, polyalkyleneoxides such as, for example, polyethylene glycol (PEG) and polypropylene glycol (PPG), polyvinylpyrrolidones, polyvinylmethylethers, polyacrylamides, such as, for example, polymethacrylamides, polydimethylacrylamides and polyhydroxypropylmethacrylamides, polyhydroxyethyl acrylates, polyhydroxypropyl methacrylates, polymethyloxazolines, polyethyloxazolines, polyhydroxyethyloxazolines, polyhyhydroxypropyloxazolines, polyvinyl alcohols, polyphosphazenes, poly(hydroxyalkylcarboxylic acids), polyoxazolidines, and polyaspartamide. The hydrophilic polymers are preferably selected from the group consisting of PEG, PPG, polyvinylalcohol and polyvinylpyrrolidone and copolymers thereof, with PEG and PPG polymers being more preferred and PEG polymers being even more preferred. Thus, in embodiments involving lipid compositions which comprise lipids bearing polymers including, for example, DPPE-PEG, the targeting ligand may be linked directly to the polymer which is attached to the lipid to provide, for example, a conjugate of DPPE-PEG-TL, where TL is a targeting ligand. Thus, using the example DPPE-PEG, such as, for example, DPPE-PEG5000, the aforementioned conjugate may be represented as DPPE-PEG5000-TL. The hydrophilic polymer used as a linking group is preferably a bifunctional polymer, for example, bifunctional PEG, such as diamino-PEG. In this case, one end of the PEG group is linked, for example, to a lipid compound, and is bound at the free end to the targeting ligand via an amide linkage. A hydrophilic polymer, for example, PEG, substituted with a terminal carboxylate group on one end and a terminal amino group on the other end, may also be used. These latter bifunctional hydrophilic polymer may be preferred since they possess various similarities to amino acids.

Standard peptide methodology may be used to link the targeting ligand to the lipid when utilizing linker groups having two unique terminal functional groups.

Bifunctional hydrophilic polymers, and especially bifunctional PEGs, may be synthesized using standard organic synthetic methodologies. In addition, many of these materials are available commercially. For example, α -amino, ω -carboxy PEG is commercially available from Shearwater Polymers (Huntsville, AL). An advantage of using a PEG material as the linking group is that the size of the PEG can be varied such that the number of monomeric subunits of ethylene glycol may be as few as, for example, about 5, or as many as, for example, about 500 or even greater. Accordingly, the "tether" or length of the linkage may be varied, as desired. This may be important depending, for example, on the particular targeting ligand employed. For example, a targeting ligand which comprises a large protein molecule may require a short tether, such that it will simulate a membrane bound protein. A short tether would also allow for a vesicle to maintain a close proximity to the cell. This can be used advantageously in connection with vesicles which also comprise a bioactive agent, in that the concentration of bioactive agent which is delivered to the cell may be advantageously increased.

Another suitable linking group which may provide a short tether is glyceraldehyde. Glyceraldehyde may be bound, for example, to DPPE via a Schiff's base reaction. Subsequent Amadori rearrangement can provide a substantially short linking group. The β carbonyl of the Schiff's base may then react with a lysine or arginine of the targeting protein or peptide to form the targeted lipid.

More specifically, the compounds employed in the present compositions, including lipids, proteins and/or polymers, may contain various functional groups, such as, for example, hydroxy, thio and amine groups, which can react with a carboxylic acid or carboxylic acid derivative of the hydrophilic polymeric linker using suitable coupling conditions which would be apparent to one of ordinary skill in the art, once armed with the present disclosure. After the carboxylic acid group (or derivative thereof) reacts with the functional group, for example, hydroxy, thio or amine group to form an ester, thioester or amide group, any protected functional group may be deprotected utilizing procedures which would be well known to those skilled in the art. The term protecting group, as used herein, refers to any moiety which may be used to block reaction of a functional group and which may be removed, as desired, to afford the unprotected functional group. Any of a variety of protecting groups may be employed and these will vary depending, for example, as to

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 90 -

whether the group to be protected is an amine, hydroxyl or carboxyl moiety. If the functional group is a hydroxyl group, suitable protecting groups include, for example, certain ethers, esters and carbonates. Such protecting groups are described, for example, in in Greene, TW and Wuts, PGM "Protective Groups in Organic Synthesis" John Wiley, New York, 2nd Edition (1991), the disclosures of which are hereby incorporated herein by reference, in their entirety. Exemplary protecting groups for amine groups include, for example, t-butyloxycarbonyl (Boc), benzyloxycarbonyl (Cbz), o-nitrobenzyloxycarbonyl and and trifluoroacetate (TFA).

Amine groups which may be present, for example, on a backbone of a polymer which is included in the vesicles, may be coupled to amine groups on a hydrophilic linking polymer by forming a Schiff's base, for example, by using coupling agents, such as glutaraldehyde. An example of this coupling is described by Allcock et al., *Macromolecules* Vol. 19(6), pp. 1502-1508 (1986), the disclosures of which are hereby incorporated herein by reference, in their entirety. If, for example, vesicles are formulated from polylysine, free amino groups may be exposed on the surface of the vesicles, and these free amine groups may be activated as described above. The activated amine groups can be used, in turn, to couple to a functionalized hydrophilic polymer, such as, for example, α -amino- ω -hydroxy-PEG in which the ω -hydroxy group has been protected with a carbonate group. After the reaction is completed, the carbonate group can be cleaved, thereby enabling the terminal hydroxy group to be activated for reaction to a suitable targeting ligand. In certain embodiments, the surface of a vesicle may be activated, for example, by displacing chlorine atoms in chlorine-containing phosphazene residues, such as polydichlorophosphazene. Subsequent addition of a targeting ligand and quenching of the remaining chloride groups with water or aqueous methanol will yield the coupled product.

In addition, poly(diphenoxyphosphazene) can be synthesized (Allcock et al., *Macromolecules* Vol. (1986) 19(6), pp. 1502-1508) and immobilized, for example, on DPPE, followed by nitration of the phenoxy moieties by the addition of a mixture of nitric acid and acetic anhydride. The subsequent nitro groups may then be activated, for example, by (1) treatment with cyanogen bromide in 0.1 M phosphate buffer (pH 11), followed by addition of a targeting ligand containing a free amino moiety to generate a coupled urea

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 91 -

analog, (2) formation of a diazonium salt using sodium nitrite/HCl, followed by addition of the targeting ligand to form a coupled ligand, and/or (3) the use of a dialdehyde, for example, glutaraldehyde as described above, to form a Schiff's base. After linking the DPPE to the hydrophilic polymer and the targeting ligand, the vesicles may be formulated
5 utilizing the procedures described herein.

Aldehyde groups on polymers can be coupled with amines as described above by forming a Schiff's base. An example of this coupling procedure is described in Allcock and Austin *Macromolecules* vol 14, p1616 (1981), the disclosures of which are hereby incorporated herein by reference, in their entirety.

10 In the above procedures, the polymer or terminus of the lipid, for example, phosphatidylglycerol or phosphatidylethanolamine, is preferably activated and coupled to the hydrophilic polymeric linker, the terminus of which has been blocked in a suitable manner. As an example of this strategy, α -amino, ω -carboxy PEG-4000 having a t-Boc protected terminal amino group and a free carboxylate end, may be activated with 1,1'-
15 carbonyldiimidazole in the presence of hydroxybenzotriazole in N-methylpyrrolidone. After the addition of phosphatidylethanolamine, the t-Boc group may be removed by using trifluoroacetic acid (TFA), leaving the free amine. The amine may then be reacted with a targeting ligand which may comprise, for example, a peptide, protein, alkaloid, or other moiety, by similar activation of the ligand, to provide the lipid-linker-targeting ligand
20 conjugate. Other strategies, in addition to those exemplified above, may be utilized to prepare the lipid-linker-targeting ligand conjugates. Generally speaking, these methods employ synthetic strategies which are generally known to those skilled in the art of synthetic organic chemistry.

As known to one of ordinary skill in the art, immunoglobulins typically
25 comprise a flexible region which is identified as the "hinge" region. See, e.g., "Concise Encyclopedia of Biochemistry", Second Edition, Walter de Gruyter & Co., pp. 282-283 (1988). Fab' fragments can be linked to the lipids, polymers, proteins and/or vesicles using the well-defined sites of the thiols of the hinge region. This is a preferred region for coupling Fab' fragments as the potential binding site is remote from the antigen-recognition
30 site. Generally speaking, it may be difficult to utilize the thiols of the hinge group unless they are adequately prepared. In particular, as outlined by Shahinian and Salvias

- (*Biochimica et Biophysica Acta*, Vol 1239 (1995) 157-167) it may be important to reduce the thiol groups so that they are available for coupling, for example, to maleimide derivatized linking groups. Examples of reducing agents commonly used are ethanedithiol, mercaptoethanol, mercaptoethylamine or the more commonly used dithiothreitol, commonly referred to as Cleland's reagent. However, it should be noted that care should be exercised when utilizing certain reducing agents, such as dithiothreitol, as overreduction may result. Discriminating use of reducing agents may be necessary in connection with proteins whose activity or binding capacity may be compromised due to overreduction and subsequent denaturation or conformational change. See, e.g., Shahinian, S. and Salvias, J.R. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1239, 157 - 167.
- F(ab')₂ antibody fragments may be prepared by incubating the antibodies with pepsin (60µg/ml) in 0.1 M sodium acetate (pH 4.2) for 4 h at 37°C. Digestion may be terminated by adding 2 M Tris (pH 8.8) to a final concentration of 80 mM. The F(ab')₂ fragments may then be obtained by centrifugation (10,000 x g, 30 min, 4°C). The supernatant may then be dialyzed at 4°C against 150 mM NaCl, 20 mM phosphate at pH 7.0. This then may be chromatographed on a column of Protein A-Sepharose CL-4B to remove any undigested IgG. The Fab' fragments may then be prepared by extensively degassing the solutions and purging with nitrogen prior to use. The F(ab')₂ fragments may be provided at a concentration of 5 mg/ml and reduced under argon in 30 mM cysteine.
- Alternatively, cysteamine may be employed. 100 mM Tris, pH 7.6 may be used as a buffer for 15 min at 37°C. The solutions may then be diluted 2-fold with an equal volume of the appropriate experimental buffer and spun through a 0.4 ml spin column of Bio-Gel P-6DG. The resulting Fab' fragments may be more efficient in their coupling to maleimide linkers. Note also that the same procedure may be employed with other macromolecules containing cysteine residues for coupling, for example, to the maleimide spacers. Also, peptides may be utilized provided that they contain a cysteine residue. If the peptides have not been made fresh and there is a possibility of oxidation of cysteine residues within the peptide structure, it may be necessary to regenerate the thiol group using the approach outlined above.
- Additional linkers would include other derivatives of lipids useful for coupling to a bifunctional spacer. For example, phosphatidylethanolamine (PE) may be

coupled to a bifunctional agent. For example N-succinimidyl 4-(p-maleimido-phenyl)butyrate (SMPB) and N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithiol) propionate (SPDP), N-succinimidyl trans-4-(N-maleimidylmethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC), and N-succinimidyl 3-maleimidylbenzoate (SMB) may be used among others, to produce, for
5 example the functionalized lipids MPB-PE and PDP-PE.

The free end of the hydrophilic spacer, such as polyethylene glycol ethylamine, which contains a reactive group, such as an amine or hydroxyl group, could be used to bind a cofactor or other targeting ligand. For example, polyethylene glycol ethylamine may be reacted with N-succinimidylbiotin or p-nitrophenylbiotin to introduce
10 onto the spacer a useful coupling group. For example, biotin may be coupled to the spacer and this will readily bind non-covalently proteins. As an example, MPB-PEG-DPPE may be synthesized as follows. DPPE-PEG with a free amino group at the terminus of the PEG will be provided as described previously. Synthesis of the SMPB:PEG-DPPE may then be carried out with 1 equivalent of triethylamine in chloroform at a molar ratio of 1:5
15 SMPB:DPPE-PEG. After 3 hours, the reaction mixture will be evaporated to dryness under argon. Excess unreacted SMPB and major by products will be removed by preparative thin layer chromatography (TLC, silica gel developed with 50% acetone in chloroform). The upper portion of the lipid band can be extracted from the silica with about 20-30% methanol in chloroform (V:V) resulting in the isolation of pure intact MPB-Peg-DPPE.
20 Streptavidin may then be coupled to proteins so that the proteins in turn may then be coupled to the MPB-PEG-DPPE. Briefly SPDP would be incubated with streptavidin at room temperature for 30 minutes and chromatography employed to remove unreacted SPDP. Dithiothreitol (DTT) was added to the reaction mixture and 10 minutes later 2-thiopyridone at a concentration of 343 nM. The remainder of the reaction mixture is
25 reduced with DTT (25 mM for 10 min.). The thiolated product is isolated by gel exclusion. The resulting streptavidin labeled proteins may then be used to bind to the biotinylated spacers affixed to the lipid moieties.

Additional methods which may be employed for covalently linking targeting ligands to the lipids, proteins or polymers, vesicles, or other stabilizing materials, are
30 described, for example, in Unger, et al., U.S. Patent No. 6,090,800 and Unger U.S. Patent

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 94 -

No. 6,028,066, the disclosures of which are incorporated herein by reference, in their entireties.

In preferred embodiments of the present invention, the targeted compounds, namely, targeted lipids, proteins, and polymers, may be incorporated in compositions which are used to form targeted vesicles, including, for example, targeted micelles, targeted liposomes, targeted albumin coated microspheres, and/or targeted polymer coated microspheres. The targeting ligand which is attached to the compounds from which the vesicles are prepared may be directed, for example, outwardly from the surface of the vesicle. Thus, there is provided a targeted vesicle which can be used to target receptors and tissues.

In certain embodiments, the targeting ligands may be incorporated in the present compositions via non-covalent associations. As known to those skilled in the art, non-covalent association is generally a function of a variety of factors, including, for example, the polarity of the involved molecules, the charge (positive or negative), if any, of the involved molecules, the extent of hydrogen bonding through the molecular network, and the like. Non-covalent bonds are preferably selected from the group consisting of ionic interaction, dipole-dipole interaction, hydrogen bonds, hydrophilic interactions, van der Waal's forces, and any combinations thereof. Non-covalent interactions may be employed to bind the targeting ligand to the lipid, or directly to the surface of a vesicle. For example, the amino acid sequence Gly-Gly-His may be bound to the surface of a vesicle, preferably by a linker, such as PEG, and copper, iron or vanadyl ion may then be added. Proteins, such as antibodies which contain histidine residues, may then bind to the vesicle via an ionic bridge with the copper ion, as described in U.S. Patent No. 5,466,467, the disclosures of which are hereby incorporated herein by reference, in their entirety. An example of hydrogen bonding involves cardiolipin lipids which can be incorporated into the lipid compositions.

In preferred embodiments of the present invention, which may involve vesicle compositions, changes, for example, in pH and/or temperature *in vivo*, may be employed to promote a change in location in the targeting ligands, for example, from a location within the vesicle, to a location external to the outer wall of the vesicle. This may promote binding of the targeting ligands to targeting sites, for example, receptors, such as

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 95 -

the GPIIb/IIIa receptor, and tissues, including myocardial, endothelial and epithelial cells, since the targeting ligand has a greater likelihood of exposure to such targeting sites. In addition, high energy ultrasound can be used to promote rupturing of the vesicles. This can also expose the targeting ligand to the desired binding site.

5 The concentration of targeting ligand employed in the present compositions may vary depending, for example, on the particular targeting agent employed, the receptor or tissue being targeted, the other components of the compositions, whether the targeting ligand is associated covalently and/or non-covalently with other components of the compositions, for example, lipids, proteins, polymers or vesicles and the like. Typically, 10 the concentration of targeting ligand in the present compositions may be initiated at lower levels and increased until the desired contrast enhancement effect is achieved. Targeted hydrophobic compounds (i.e., for example, conjugates in which the targeting ligand is linked covalently to, for example, a lipid, as in the case of compounds of the formula L-P-T or compounds of formula (IV), as well as unbound or free targeting ligand (as in, for 15 example, embodiments in which the targeting ligand may be associated non-covalently with a stabilizing compound, such as a lipid), may be employed in the compositions in a concentration which ranges from about 0.05 wt % to about 20 wt % (and all combinations and subcombinations of ranges therein), based on the weight of unbound stabilizing materials employed in the composition. Preferably, the conjugate or free targeting ligand 20 may be employed in the compositions in a concentration from about 0.5 wt % to about 10 wt %, with concentrations of from about 1 wt % to about 5 wt % being more preferred. Even more preferably, the conjugate or free targeting ligand may be employed in the present compositions in a concentration of from about 1 wt % to about 2 wt %, with a concentration of about 1.25 wt % being especially preferred. In other embodiments, 25 concentrations of about 5 wt % may be especially preferred.

As would be apparent to the skilled artisan, once armed with the teachings of the present invention, the concentration of targeted hydrophobic compounds and/or unbound or free targeting ligand that may be employed in the compositions of the present invention may also be expressed in mole %. In this connection, targeted hydrophobic 30 compounds and/or unbound or free targeting ligand may be employed in the compositions of the present invention in a concentration which ranges from 0.05 mole % to about 10

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 96 -

mole % (and all combinations and subcombinations of ranges therein), based on the number of moles of unbound stabilizing materials employed in the composition. Preferably, the conjugate or free targeting ligand may be employed in the compositions in a concentration from about 0.5 mole % to about 5 mole %, with concentrations of from about 1 mole % to about 3 mole % being more preferred. Even more preferably, the conjugate or free targeting ligand may be employed in the present compositions in a concentration of from about 1 mole % to about 2 mole %, with a concentration of about 1.8 mole % being especially preferred.

As noted above, the present lipid and/or vesicle compositions are desirably formulated in an aqueous environment. This can induce the lipid, because of its hydrophobic/hydrophilic nature, to form vesicles, which may be the most stable configuration which can be achieved in such an environment. The diluents which can be employed to create such an aqueous environment include, for example, water, including deionized water or water containing one or more dissolved solutes, such as salts, which preferably do not interfere with the formation and/or stability of the vesicles or their use as diagnostic agents, such as ultrasound contrast agents, MRI contrast agents or CT contrast agents; and normal saline and physiological saline.

The lipid and/or vesicle compositions of the present invention may also comprise additional contrast agents, including conventional contrast agents, which may serve to increase their effectiveness as contrast agents for diagnostic imaging.

Accordingly, it is within the scope of the present invention to provide vesicle compositions which comprise flexible vesicles, for example, vesicles formulated from lipids, or inflexible vesicles, for example, vesicles prepared from polymethyl methacrylate.

It is contemplated that the compositions of the present invention are particularly useful in connection with ultrasound, including diagnostic and therapeutic ultrasound. The use of the present compositions in ultrasound is described throughout the present disclosure.

As noted above, the present compositions may also be employed in connection with computed tomography (CT) imaging. CT suffers from various drawbacks, and is generally less effective as compared to the diagnostic techniques discussed above.

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 97 -

Nevertheless, if a high enough concentration of the present contrast media, and especially gas filled vesicle compositions, is delivered to the region of interest, for example, a blood clot, the clot can be detected on the CT images by virtue of a decrease in the overall density of the clot. In general, a concentration of about 1/10 of 1% of gas filled vesicles or higher
 5 (on a volume basis), may be needed to delivered to the region of interest, including the aforementioned blood clot, to be detected by CT.

Exemplary paramagnetic contrast agents suitable for use in the present compositions include, for example, stable free radicals, such as, for example, stable nitroxides, as well as compounds comprising transition, lanthanide and actinide elements,
 10 which may, if desired, be in the form of a salt or may be covalently or non-covalently bound to complexing agents, including lipophilic derivatives thereof, or to proteinaceous macromolecules.

Preferable transition, lanthanide and actinide elements include, for example, Gd(III), Mn(II), Cu(II), Cr(III), Fe(II), Fe(III), Co(II), Er(II), Ni(II), Eu(III) and Dy(III).
 15 More preferably, the elements may be Gd(III), Mn(II), Cu(II), Fe(II), Fe(III), Eu(III) and Dy(III), especially Mn(II) and Gd(III).

The foregoing elements may, if desired, be in the form of a salt, including inorganic salts, such as a manganese salt, for example, manganese chloride, manganese carbonate, manganese acetate, and organic salts, such as manganese gluconate and
 20 manganese hydroxylapatite. Other exemplary salts include salts of iron, for example, iron sulfides and ferric salts such as ferric chloride.

These elements may also, if desired, be bound, for example, through covalent or noncovalent association, to complexing agents, including lipophilic derivatives thereof, or to proteinaceous macromolecules. Preferable complexing agents include, for
 25 example, diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA), ethylene-diaminetetraacetic acid (EDTA), 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid (DOTA), 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N''-triacetic acid (DOTA), 3,6,9-triaza-12-oxa-3,6,9-tricarboxymethylene-10-carboxy-13-phenyl-tridecanoic acid (B-19036), hydroxybenzylethylenediamine diacetic acid (HBED), N,N'-bis(pyridoxyl-5-
 30 phosphate)ethylene diamine, N,N'-diacetate (DPDP), 1,4,7-triazacyclononane-N,N',N''-triacetic acid (NOTA), 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 98 -

(TETA), kryptands (macrocyclic complexes), and desferrioxamine. More preferably, the complexing agents are EDTA, DTPA, DOTA, DO3A and kryptands, most preferably DTPA. Preferable lipophilic complexes include alkylated derivatives of the complexing agents EDTA, DOTA, for example, N,N'-bis-(carboxydecylamidomethyl-N-2,3-dihydroxypropyl)-ethylenediamine-N,N'-diacetate (EDTA-DDP); N,N'-bis-(carboxy-octadecylamido-methyl-N-2,3-dihydroxypropyl)ethylenediamine-N,N'-diacetate (EDTA-ODP); N,N'-Bis(carboxy-laurylamidomethyl-N-2,3-dihydroxypropyl)ethylenediamine-N,N'-diacetate (EDTA-LDP); and the like, including those described in U.S. Patent No. 5,312,617, the disclosures of which are hereby incorporated herein by reference, in their entirety. Preferable proteinaceous macromolecules include, for example, albumin, collagen, polyarginine, polylysine, polyhistidine, γ -globulin and β -globulin, with albumin, polyarginine, polylysine, and polyhistidine being more preferred.

Suitable complexes therefore include Mn(II)-DTPA, Mn(II)-EDTA, Mn(II)-DOTA, Mn(II)-DO3A, Mn(II)-kryptands, Gd(III)-DTPA, Gd(III)-DOTA, Gd(III)-DO3A, Gd(III)-kryptands, Cr(III)-EDTA, Cu(II)-EDTA, or iron-desferrioxamine, especially Mn(II)-DTPA or Gd(III)-DTPA.

Nitroxides are paramagnetic contrast agents which increase both T1 and T2 relaxation rates on MRI by virtue of the presence of an unpaired electron in the nitroxide molecule. As known to one of ordinary skill in the art, the paramagnetic effectiveness of a given compound as an MRI contrast agent may be related, at least in part, to the number of unpaired electrons in the paramagnetic nucleus or molecule, and specifically, to the square of the number of unpaired electrons. For example, gadolinium has seven unpaired electrons whereas a nitroxide molecule has one unpaired electron. Thus, gadolinium is generally a much stronger MRI contrast agent than a nitroxide. However, effective correlation time, another important parameter for assessing the effectiveness of contrast agents, confers potential increased relaxivity to the nitroxides. When the tumbling rate is slowed, for example, by attaching the paramagnetic contrast agent to a large molecule, it will tumble more slowly and thereby more effectively transfer energy to hasten relaxation of the water protons. In gadolinium, however, the electron spin relaxation time is rapid and will limit the extent to which slow rotational correlation times can increase relaxivity. For nitroxides, however, the electron spin correlation times are more favorable and tremendous increases in

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 99 -

relaxivity may be attained by slowing the rotational correlation time of these molecules. The gas filled vesicles of the present invention are ideal for attaining the goals of slowed rotational correlation times and resultant improvement in relaxivity. Although not intending to be bound by any particular theory of operation, it is contemplated that since the

5 nitroxides may be designed to coat the perimeters of the vesicles, for example, by making alkyl derivatives thereof, the resulting correlation times can be optimized. Moreover, the resulting contrast medium of the present invention may be viewed as a magnetic sphere, a geometric configuration which maximizes relaxivity.

If desired, the nitroxides may be alkylated or otherwise derivatized, such as

10 the nitroxides 2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidinyloxy, free radical, and 2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy, free radical (TMPO).

Exemplary superparamagnetic contrast agents suitable for use in the compositions of the present invention include metal oxides and sulfides which experience a magnetic domain, ferro- or ferrimagnetic compounds, such as pure iron, magnetic iron

15 oxide, such as magnetite, γ - Fe_2O_3 , Fe_3O_4 , manganese ferrite, cobalt ferrite and nickel ferrite. Paramagnetic gases can also be employed in the present compositions, such as oxygen 17 gas ($^{17}\text{O}_2$). In addition, hyperpolarized xenon, neon, or helium gas may also be employed. MR whole body imaging may then be employed to rapidly screen the body, for example, for thrombosis, and ultrasound may be applied, if desired, to aid in thrombolysis.

The contrast agents, such as the paramagnetic and superparamagnetic

20 contrast agents described above, may be employed as a component within the lipid and/or vesicle compositions. In the case of vesicle compositions, the aforementioned contrast agents may be entrapped within the internal void thereof, administered as a solution with the vesicles, incorporated with any additional stabilizing materials, or coated onto the

25 surface or membrane of the vesicle.

If desired, the paramagnetic or superparamagnetic agents may be delivered as alkylated or other derivatives incorporated into the compositions, especially the lipidic walls of the vesicles. In particular, the nitroxides 2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidinyloxy, free radical and 2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy, free radical, can form adducts with

30 long chain fatty acids at the positions of the ring which are not occupied by the methyl groups via a variety of linkages, including, for example, an acetyloxy linkage. Such

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 100 -

adducts are very amenable to incorporation into the lipid and/or vesicle compositions of the present invention.

Mixtures of any one or more of the paramagnetic agents and/or superparamagnetic agents in the present compositions may be used. The paramagnetic and superparamagnetic agents may also be coadministered separately, if desired.

The lipid and/or vesicle compositions of the present invention, and especially the vesicle compositions, may serve not only as effective carriers of the superparamagnetic agents described above, but also may improve the effect of the susceptibility contrast agents. Superparamagnetic contrast agents include metal oxides, particularly iron oxides but including manganese oxides, and as iron oxides, containing varying amounts of manganese, cobalt and nickel which experience a magnetic domain. These agents are nano or microparticles and have very high bulk susceptibilities and transverse relaxation rates. The larger particles, for example, particles having diameters of about 100 nm, have much higher R2 relaxivities as compared to R1 relaxivities. The smaller particles, for example, particles having diameters of about 10 to about 15 nm, have somewhat lower R2 relaxivities, but much more balanced R1 and R2 values. Much smaller particles, for example, monocrystalline iron oxide particles having diameters of about 3 to about 5 nm, have lower R2 relaxivities, but probably the most balanced R1 and R2 relaxation rates. Ferritin can also be formulated to encapsulate a core of very high relaxation rate superparamagnetic iron. It has been discovered that the lipid and/or vesicle compositions, especially vesicle compositions, including gas filled vesicles, can increase the efficacy and safety of these conventional iron oxide based MRI contrast agents.

The iron oxides may simply be incorporated into the lipid and/or vesicle compositions. Preferably, in the case of vesicles formulated from lipids, the iron oxides may be incorporated into the walls of the vesicles, for example, by being adsorbed onto the surfaces of the vesicles, or entrapped within the interior of the vesicles as described in U.S. Patent 5,088,499, the disclosures of which are hereby incorporated herein by reference in their entirety.

Without being bound to any particular theory or theories of operation, it is believed that the vesicles of the present invention increase the efficacy of the superparamagnetic contrast agents by several mechanisms. First, it is believed that the

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 101 -

vesicles function to increase the apparent magnetic concentration of the iron oxide particles. Also, it is believed that the vesicles increase the apparent rotational correlation time of the MRI contrast agents, including paramagnetic and superparamagnetic agents, so that relaxation rates are increased. In addition, the vesicles appear to increase the apparent magnetic domain of the contrast medium according to the manner described hereinafter.

Certain of the vesicles of the present invention, and especially vesicles formulated from lipids, may be visualized as flexible spherical domains of differing susceptibility from the suspending medium, including, for example, the aqueous suspension of the contrast medium or blood or other body fluids, for example, in the case of intravascular injection or injection into other body locations. In the case of ferrites or iron oxide particles, it should be noted that the contrast provided by these agents is dependent on particle size. This phenomenon is very common and is often referred to as the "secular" relaxation of the water molecules. Described in more physical terms, this relaxation mechanism is dependent upon the effective size of the molecular complex in which a paramagnetic atom, or paramagnetic molecule, or molecules, may reside. One physical explanation may be described in the following Solomon-Bloembergen equations which define the paramagnetic contributions as a function of the T_1 and T_2 relaxation times of a spin 1/2 nucleus with gyromagnetic ratio γ perturbed by a paramagnetic ion:

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

and

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

where:

S is the electron spin quantum number;
 g is the electronic g factor;
 β is the Bohr magneton;

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 102 -

ω_I and ω_e (657 ω_i) is the Larmor angular precession frequencies for the nuclear spins and electron spins;

r is the ion-nucleus distance;

A is the hyperfine coupling constant;

5 τ_c and τ_s are the correlation times for the dipolar and scalar interactions, respectively; and

$\hbar$ is Planck's constant.

See, e.g., Solomon, I. *Phys. Rev.* Vol. 99, p. 559 (1955) and Bloembergen, N. *J. Chem. Phys.* Vol. 27, pp. 572, 595 (1957).

10 A few large particles may have a much greater effect than a larger number of much smaller particles, primarily due to a larger correlation time. If one were to make the iron oxide particles very large however, increased toxicity may result, and the lungs may be embolized or the complement cascade system may be activated. Furthermore, it is believed that the total size of the particle is not as important as the diameter of the particle

15 at its edge or outer surface. The domain of magnetization or susceptibility effect falls off exponentially from the surface of the particle. Generally speaking, in the case of dipolar (through space) relaxation mechanisms, this exponential fall off exhibits an r^6 dependence for a paramagnetic dipole-dipole interaction. Interpreted literally, a water molecule that is 4 angstroms away from a paramagnetic surface will be influenced 64 times less than a water

20 molecule that is 2 angstroms away from the same paramagnetic surface. The ideal situation in terms of maximizing the contrast effect would be to make the iron oxide particles hollow, flexible and as large as possible. It has not been possible to achieve this heretofore and it is believed that the benefits have been unrecognized heretofore also. By coating the inner or outer surfaces of the vesicles with the contrast agents, even though the individual

25 contrast agents, for example, iron oxide nanoparticles or paramagnetic ions, are relatively small structures, the effectiveness of the contrast agents may be greatly enhanced. In so doing, the contrast agents may function as an effectively much larger sphere wherein the effective domain of magnetization is determined by the diameter of the vesicle and is maximal at the surface of the vesicle. These agents afford the advantage of flexibility,

30 namely, compliance. While rigid vesicles might lodge in the lungs or other organs and cause toxic reactions, these flexible vesicles slide through the capillaries much more easily.

In contrast to the flexible vesicles described above, it may be desirable, in certain circumstances, to formulate vesicles from substantially impermeable polymeric materials including, for example, polymethyl methacrylate. This would generally result in the formation of vesicles which may be substantially impermeable and relatively inelastic and brittle. In embodiments involving diagnostic imaging, for example, ultrasound, contrast media which comprise such brittle vesicles would generally not provide the desirable reflectivity that the flexible vesicles may provide. However, by increasing the power output on ultrasound, the brittle microspheres can be made to rupture, thereby causing acoustic emissions which can be detected by an ultrasound transducer.

Nuclear Medicine Imaging (NMI) may also be used in connection with the diagnostic and therapeutic method aspects of the present invention. For example, NMI may be used to detect radioactive gases, such as Xe^{133} , which may be incorporated in the present compositions in addition to, or instead of, the gases discussed above. Such radioactive gases may be entrapped within vesicles for use in detecting, for example, thrombosis. Preferably, bifunctional chelate derivatives are incorporated in the walls of vesicles, and the resulting vesicles may be employed in both NMI and ultrasound. In this case, high energy, high quality nuclear medicine imaging isotopes, such as technetium^{99m} or indium¹¹¹ can be incorporated in the walls of vesicles. Whole body gamma scanning cameras can then be employed to rapidly localize regions of vesicle uptake *in vivo*. If desired, ultrasound may also be used to confirm the presence, for example, of a clot within the blood vessels, since ultrasound generally provides improved resolution as compared to nuclear medicine techniques. NMI may also be used to screen the entire body of the patient to detect areas of vascular thrombosis, and ultrasound can be applied to these areas locally to promote rupture of the vesicles and treat the clot.

For optical imaging, optically active gases, such as argon or neon, may be incorporated in the present compositions. In addition, optically active materials, for example, fluorescent materials, including porphyrin derivatives, may also be used. Elastography is an imaging technique which generally employs much lower frequency sound, for example, about 60 KHz, as compared to ultrasound which can involve over frequencies of over 1 MHz. In elastography, the sound energy is generally applied to the tissue and the elasticity of the tissue may then be determined. In connection with preferred

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 104 -

embodiments of the invention, which involve highly elastic vesicles, the deposition of such vesicles onto, for example, a clot, increases the local elasticity of the tissue and/or the space surrounding the clot. This increased elasticity may then be detected with elastography. If desired, elastography can be used in conjunction with other imaging techniques, such as

5 MRI and ultrasound.

In addition to the aforementioned diagnostic imaging techniques and thrombolysis of clots, the present compositions can be used in a variety of therapeutic treatment modalities. For example, bioactive agents, for example, drugs, may be incorporated in the present compositions. Useful drugs include, for example, heparin

10 sulfate, tissue plasminogen activator, streptokinase, urokinase and hirudin. In connection with therapeutic applications, complementary agents can also be used including, for example, dihydroergotamine, which can be used with heparin sulfate to decrease venostasis. In addition, warfarin may be used as an adjunct to anticoagulation therapy. Genetic materials may also be incorporated with the present compositions. In the case of vesicle

15 compositions, the genetic material can be incorporated into the walls of the vesicles or within the central gas-filled void of the vesicles. This may be conveniently accomplished when cationic lipids are employed in the vesicle walls. Genes, such as vascular endothelial growth factor, or antisense gene fragments directed to basic fibroblast growth factor, may be used. This invention can be useful for treating underlying atherosclerosis or to decrease

20 the tendency toward fibrointimal hyperplasia.

The lipid and/or vesicle compositions of the present invention may be prepared using any of a variety of suitable methods. These are described below separately for the embodiments involving lipid compositions and a gas, including gas filled vesicles, and embodiments involving lipid compositions and a gaseous precursor, including gaseous

25 precursor filled vesicles, although compositions comprising both a gas and gaseous precursor form a part of the present invention.

A targeting ligand may be attached to the gas or gaseous precursor filled vesicle by bonding to one or more of the materials employed in the compositions from which they are made, including the lipids, proteins, polymers, and/or auxiliary stabilizing

30 materials, as described above.

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 105 -

A wide variety of methods are available for the preparation of the compositions, including vesicle compositions, such as micelles and/or liposomes. Included among these methods are, for example, shaking, drying, gas-installation, spray drying, and the like. Suitable methods for preparing vesicle compositions are described, for example, in U.S. Patent No. 5,469,854, the disclosures of which are incorporated herein by reference. As noted above, the vesicles are preferably prepared from lipids which remain in the gel state.

With particular reference to the preparation of micelle compositions, the following discussion is provided. Micelles may be prepared using any one of a variety of conventional micellar preparatory methods which will be apparent to those skilled in the art. These methods typically involve suspension of the lipid compound in an organic solvent, evaporation of the solvent, resuspension in an aqueous medium, sonication and centrifugation. The foregoing methods, as well as others, are discussed, for example, in Canfield et al., *Methods in Enzymology*, Vol. 189, pp. 418-422 (1990); El-Gorab et al., *Biochem. Biophys. Acta*, Vol. 306, pp. 58-66 (1973); *Colloidal Surfactant*, Shinoda, K., Nakagana, Tamamushi and Isejura, Academic Press, NY (1963) (especially "The Formation of Micelles", Shinoda, Chapter 1, pp. 1-88); *Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems*, Fendler and Fendler, Academic Press, NY (1975). The disclosures of each of the foregoing publications are incorporated by reference herein, in their entirety.

As noted above, the vesicle composition may comprise liposomes. In any given liposome, the lipid compound(s) may be in the form of a monolayer or bilayer, and the mono- or bilayer lipids may be used to form one or more mono- or bilayers. In the case of more than one mono- or bilayer, the mono- or bilayers are generally concentric. Thus, the lipids may be used to form unilamellar liposomes (comprised of one monolayer or bilayer), oligolamellar liposomes (comprised of two or three monolayers or bilayers) or multilamellar liposomes (comprised of more than three monolayers or bilayers).

A wide variety of methods are available in connection with the preparation of liposome compositions. Accordingly, the liposomes may be prepared using any one of a variety of conventional liposomal preparatory techniques which will be apparent to those skilled in the art. These techniques include, for example, solvent dialysis, French press, extrusion (with or without freeze-thaw), reverse phase evaporation, simple freeze-thaw,

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 106 -

sonication, chelate dialysis, homogenization, solvent infusion, microemulsification, spontaneous formation, solvent vaporization, solvent dialysis, French pressure cell technique, controlled detergent dialysis, and others, each involving the preparation of the vesicles in various fashions. See, e.g., Madden et al., *Chemistry and Physics of Lipids*, 53, 37-46, the disclosures of which are hereby incorporated herein by reference in their entirety. Suitable freeze-thaw techniques are described, for example, in International Application Serial No. PCT/US89/05040, filed November 8, 1989, the disclosures of which are incorporated herein by reference in their entirety. Methods which involve freeze-thaw techniques are preferred in connection with the preparation of liposomes. Preparation of the liposomes may be carried out in a solution, such as an aqueous saline solution, aqueous phosphate buffer solution, or sterile water. The liposomes may also be prepared by various processes which involve shaking or vortexing. This may be achieved, for example, by the use of a mechanical shaking device, such as a Wig-L-Bug™ (Crescent Dental, Lyons, IL), a Mixomat, sold by Degussa AG, Frankfurt, Germany, a Capmix, sold by Espe Fabrik Pharmazeutischer Praeparate GMBH & Co., Seefeld, Oberay Germany, a Silamat Plus, sold by Vivadent, Lechtenstein, or a Vibros, sold by Quayle Dental, Sussex, England. Conventional microemulsification equipment, such as a Microfluidizer™ (Microfluidics, Woburn, MA) may also be used.

Spray drying may be also employed to prepare the gas-filled vesicles. Utilizing this procedure, the lipids may be pre-mixed in an aqueous environment and then spray dried to produce gas-filled vesicles. The vesicles may be stored under a headspace of a desired gas.

Many liposomal preparatory techniques which may be adapted for use in the preparation of vesicle compositions are discussed, for example, in U.S. Patent No. 4,728,578; U.K. Patent Application GB 2193095 A; U.S. Patent No. 4,728,575; U.S. Patent No. 4,737,323; International Application Serial No. PCT/US85/01161; Mayer et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 858, pp. 161-168 (1986); Hope et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 812, pp. 55-65 (1985); U.S. Patent No. 4,533,254; 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); International Application Serial No. PCT/US89/05040; U.S. Patent No.

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 107 -

4,162,282; U.S. Patent No. 4,310,505; U.S. Patent No. 4,921,706; and *Liposome Technology*, Gregoriadis, G., ed., Vol. I, pp. 29-31, 51-67 and 79-108 (CRC Press Inc., Boca Raton, FL 1984), the disclosures of each of which are hereby incorporated by reference herein, in their entirety.

5 Lipid compositions comprising a gas can be prepared by agitating an aqueous solution containing, if desired, a stabilizing material, in the presence of a gas. The term "agitating," as used herein, means any shaking motion of an aqueous solution such that gas is introduced from the local ambient environment into the aqueous solution. This agitation is preferably conducted at a temperature below the gel to liquid crystalline phase
10 transition temperature of the lipid. The shaking involved in the agitation of the solutions is preferably of sufficient force to result in the formation of a lipid composition, including vesicle compositions, and particularly vesicle compositions comprising gas filled vesicles. The shaking may be by swirling, such as by vortexing, side-to-side, or up and down motion. Different types of motion may be combined. Also, the shaking may occur by
15 shaking the container holding the aqueous lipid solution, or by shaking the aqueous solution within the container without shaking the container itself.

The shaking may occur manually or by machine. Mechanical shakers that may be used include, for example, a shaker table such as a VWR Scientific (Cerritos, CA) shaker table, as well as any of the shaking devices described hereinbefore, with the Capmix
20 (Espe Fabrik Pharmazeutischer Praeparate GMBH & Co., Seefeld, Oberay Germany) being preferred. It has been found that certain modes of shaking or vortexing can be used to make vesicles within a preferred size range. Shaking is preferred, and it is preferred that the shaking be carried out using the Espe Capmix mechanical shaker. In accordance with this preferred method, it is preferred that a reciprocating motion be utilized to generate the lipid
25 compositions, and particularly vesicle compositions. It is even more preferred that the motion be reciprocating in the form of an arc. It is contemplated that the rate of reciprocation, as well as the arc thereof, is particularly important in connection with the formation of vesicles. Preferably, the number of reciprocations or full cycle oscillations is from about 1000 to about 20,000 per minute. More preferably, the number of
30 reciprocations or oscillations is from about 2500 to about 8000, with reciprocations or oscillations of from about 3300 to about 5000 being even more preferred. Of course, the

number of oscillations can be dependent upon the mass of the contents being agitated. Generally speaking, a larger mass requires fewer oscillations. Another means for producing shaking includes the action of gas emitted under high velocity or pressure.

It will also be understood that preferably, with a larger volume of aqueous solution, the total amount of force will be correspondingly increased. Vigorous shaking is defined as at least about 60 shaking motions per minute, and is preferred. Vortexing at about 60 to about 300 revolutions per minute is more preferred. Vortexing at about 300 to about 1800 revolutions per minute is even more preferred.

In addition to the simple shaking methods described above, more elaborate methods can also be employed. Such elaborate methods include, for example, liquid crystalline shaking gas instillation processes and vacuum drying gas instillation processes, such as those described in Unger, et al., U.S. Patent No. 5,580,275, the disclosures of which are incorporated herein by reference, in their entirety. Although any of a number of varying techniques can be used, the vesicle compositions employed in the present invention are preferably prepared using a shaking technique. Preferably, the shaking technique involves agitation with a mechanical shaking apparatus, such as an Espe Capmix (Seefeld, Oberay Germany), using, for example, the techniques disclosed in Unger, et al., U.S. Patent No. 5,542,935, the disclosures of which are hereby incorporated herein by reference in their entirety.

The size of gas filled vesicles can be adjusted, if desired, by a variety of procedures, including, for example, microemulsification, vortexing, extrusion, filtration, sonication, homogenization, repeated freezing and thawing cycles, extrusion under pressure through pores of defined size, and similar methods. Gas filled vesicles prepared in accordance with the methods described herein can range in size from less than about 1 μm to greater than about 100 μm . In addition, after extrusion and sterilization procedures, which are discussed in detail below, agitation or shaking provides vesicle compositions which provide substantially no or minimal residual anhydrous lipid phase in the remainder of the solution. (Bangham, A.D., Standish, M.M., & Watkins, J.C., *J. Mol. Biol.* Vol. 13, pp. 238-252 (1965). If desired, the vesicles of the present invention may be used as they are formed, without any attempt at further modification of the size thereof. For intravascular use, the vesicles preferably have diameters of less than about 30 μm , and more preferably,

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 109 -

less than about 12 μm . For targeted intravascular use including, for example, binding to certain tissue, such as cancerous tissue, the vesicles can be significantly smaller, for example, less than about 100 nm in diameter. For enteric or gastrointestinal use, the vesicles can be significantly larger, for example, up to a millimeter in size. Preferably, the
5 vesicles are sized to have diameters of from about 2 μm to about 100 μm .

The gas filled vesicles may be sized by a simple process of extrusion through filters wherein the filter pore sizes control the size distribution of the resulting gas filled vesicles. By using two or more cascaded or stacked set of filters, for example, a 10 μm filter followed by an 8 μm filter, the gas filled vesicles can be selected to have a very
10 narrow size distribution around 7 to 9 μm . After filtration, these gas filled vesicles can remain stable for over 24 hours.

The sizing or filtration step may be accomplished by the use, for example, of a filter assembly when the composition is removed from a sterile vial prior to use, or more preferably, the filter assembly may be incorporated into a syringe during use. The method
15 of sizing the vesicles will then comprise using a syringe comprising a barrel, at least one filter, and a needle; and will be carried out by a step of extracting which comprises extruding the vesicles from the barrel through the filter fitted to the syringe between the barrel and the needle, thereby sizing the vesicles before they are administered to a patient. The step of extracting may also comprise drawing the vesicles into the syringe, where the
20 filter will function in the same way to size the vesicles upon entrance into the syringe. Another alternative is to fill such a syringe with vesicles which have already been sized by some other means, in which case the filter now functions to ensure that only vesicles within the desired size range, or of the desired maximum size, are subsequently administered by extrusion from the syringe.

25 In certain preferred embodiments, the vesicle compositions may be heat sterilized or filter sterilized and extruded through a filter prior to shaking. Generally speaking, vesicle compositions comprising a gas may be heat sterilized, and vesicle compositions comprising gaseous precursors may be filter sterilized. Once gas filled vesicles are formed, they may be filtered for sizing as described above. Performing these
30 steps prior to the formation of gas and gaseous precursor filled vesicles provide sterile gas filled vesicles ready for administration to a patient. For example, a mixing vessel such as a

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 110 -

vial or syringe may be filled with a filtered lipid composition, and the composition may be sterilized within the mixing vessel, for example, by autoclaving. Gas may be instilled into the composition to form gas filled vesicles by shaking the sterile vessel. Preferably, the sterile vessel is equipped with a filter positioned such that the gas filled vesicles pass
5 through the filter before contacting a patient.

The step of extruding the solution of lipid compound through a filter decreases the amount of unhydrated material by breaking up any dried materials and exposing a greater surface area for hydration. Preferably, the filter has a pore size of about 0.1 to about 5 μm , more preferably, about 0.1 to about 4 μm , even more preferably, about
10 0.1 to about 2 μm , and still more preferably, about 1 μm . Unhydrated compound, which is generally undesirable, appears as amorphous clumps of non-uniform size.

The sterilization step provides a composition that may be readily administered to a patient for diagnostic imaging including, for example, ultrasound or CT. In certain preferred embodiments, sterilization may be accomplished by heat sterilization,
15 preferably, by autoclaving the solution at a temperature of at least about 100°C, and more preferably, by autoclaving at about 100°C to about 130°C, even more preferably, about 110°C to about 130°C, still more preferably, about 120°C to about 130°C, and even more preferably, about 130°C. Preferably, heating occurs for at least about 1 minute, more preferably, about 1 to about 30 minutes, even more preferably, about 10 to about 20
20 minutes, and still more preferably, about 15 minutes.

If desired, the extrusion and heating steps, as outlined above, may be reversed, or only one of the two steps can be used. Other modes of sterilization may be used, including, for example, exposure to gamma radiation.

In addition to the aforementioned embodiments, gaseous precursors
25 contained in vesicles can be formulated which, upon activation, for example, by exposure to elevated temperature, varying pH, or light, undergo a phase transition from, for example, a liquid, including a liquid entrapped in a vesicle, to a gas, expanding to create the gas filled vesicles described herein. This technique is described in detail in Unger, et al., U.S. Patent No. 5,542,935 and Unger et al., U.S. Patent No. 5,585,112, the disclosures of which are
30 incorporated herein by reference, in their entirety.

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 111 -

The preferred method of activating the gaseous precursor is by exposure to elevated temperature. Activation or transition temperature, and like terms, refer to the boiling point of the gaseous precursor and is the temperature at which the liquid to gaseous phase transition of the gaseous precursor takes place. Useful gaseous precursors are those materials which have boiling points in the range of about -100°C to about 70°C. The activation temperature is particular to each gaseous precursor. An activation temperature of about 37°C, or about human body temperature, is preferred for gaseous precursors in the context of the present invention. Thus, in preferred form, a liquid gaseous precursor is activated to become a gas at about 37°C or below. The gaseous precursor may be in liquid or gaseous phase for use in the methods of the present invention.

The methods of preparing the gaseous precursor filled vesicles may be carried out below the boiling point of the gaseous precursor such that a liquid is incorporated, for example, into a vesicle. In addition, the methods may be conducted at the boiling point of the gaseous precursor, such that a gas is incorporated, for example, into a vesicle. For gaseous precursors having low temperature boiling points, liquid precursors may be emulsified using a microfluidizer device chilled to a low temperature. The boiling points may also be depressed using solvents in liquid media to utilize a precursor in liquid form. Further, the methods may be performed where the temperature is increased throughout the process, whereby the process starts with a gaseous precursor as a liquid and ends with a gas.

The gaseous precursor may be selected so as to form the gas *in situ* in the targeted tissue or fluid, *in vivo* upon entering the patient or animal, prior to use, during storage, or during manufacture. The methods of producing the temperature-activated gaseous precursor filled vesicles may be carried out at a temperature below the boiling point of the gaseous precursor. In this embodiment, the gaseous precursor is entrapped within a vesicle such that the phase transition does not occur during manufacture. Instead, the gaseous precursor filled vesicles are manufactured in the liquid phase of the gaseous precursor. Activation of the phase transition may take place at any time as the temperature is allowed to exceed the boiling point of the precursor. Also, knowing the amount of liquid in a droplet of liquid gaseous precursor, the size of the vesicles upon attaining the gaseous state may be determined.

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 112 -

Alternatively, the gaseous precursors may be utilized to create stable gas filled vesicles which are pre-formed prior to use. In this embodiment, the gaseous precursor is added to a container housing a lipid composition at a temperature below the liquid-gaseous phase transition temperature of the respective gaseous precursor. As the temperature is increased, and an emulsion is formed between the gaseous precursor and liquid solution, the gaseous precursor undergoes transition from the liquid to the gaseous state. As a result of this heating and gas formation, the gas displaces the air in the head space above the liquid mixture so as to form gas filled vesicles which entrap the gas of the gaseous precursor, ambient gas (e.g. air), or coentrap gas state gaseous precursor and ambient air. This phase transition can be used for optimal mixing and formation of the contrast agent. For example, the gaseous precursor, perfluorobutane, can be entrapped in the lipid vesicles and as the temperature is raised beyond the boiling point of perfluorobutane (4°C), perfluorobutane gas is entrapped in the vesicles.

Accordingly, the gaseous precursors may be selected to form gas filled vesicles *in vivo* or may be designed to produce the gas filled vesicles *in situ*, during the manufacturing process, on storage, or at some time prior to use. A water bath, sonicator or hydrodynamic activation by pulling back the plunger of a syringe against a closed stopcock may be used to activate targeted gas-filled vesicles from temperature-sensitive gaseous precursors prior to I.V. injection.

As a further embodiment of this invention, by pre-forming the gaseous precursor in the liquid state into an aqueous emulsion, the maximum size of the vesicle may be estimated by using the ideal gas law, once the transition to the gaseous state is effectuated. For the purpose of making gas filled vesicles from gaseous precursors, the gas phase is assumed to form instantaneously and substantially no gas in the newly formed vesicle has been depleted due to diffusion into the liquid, which is generally aqueous in nature. Hence, from a known liquid volume in the emulsion, one would be able to predict an upper limit to the size of the gas filled vesicle.

In embodiments of the present invention, a mixture of a lipid compound and a gaseous precursor, containing liquid droplets of defined size, may be formulated such that upon reaching a specific temperature, for example, the boiling point of the gaseous precursor, the droplets will expand into gas filled vesicles of defined size. The defined size

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 113 -

represents an upper limit to the actual size because the ideal gas law cannot account for such factors as gas diffusion into solution, loss of gas to the atmosphere, and the effects of increased pressure.

The ideal gas law, which can be used for calculating the increase in the
5 volume of the gas bubbles upon transitioning from liquid to gaseous states, is as follows:

$$PV = nRT$$

where

P is pressure in atmospheres (atm);

V is volume in liters (L);

10 n is moles of gas;

T is temperature in degrees Kelvin (K); and

R is the ideal gas constant (22.4 L-atm/K-mole).

With knowledge of volume, density, and temperature of the liquid in the mixture of liquids, the amount, for example, in moles, and volume of liquid precursor may be calculated

15 which, when converted to a gas, will expand into a vesicle of known volume. The calculated volume will reflect an upper limit to the size of the gas filled vesicle, assuming instantaneous expansion into a gas filled vesicle and negligible diffusion of the gas over the time of the expansion.

Thus, for stabilization of the precursor in the liquid state in a mixture
20 wherein the precursor droplet is spherical, the volume of the precursor droplet may be determined by the equation:

$$\text{Volume (spherical vesicle)} = 4/3 \pi r^3$$

where

r is the radius of the sphere.

25 Thus, once the volume is predicted, and knowing the density of the liquid at the desired temperature, the amount of liquid gaseous precursor in the droplet may be determined. In more descriptive terms, the following can be applied:

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

by the ideal gas law,

30 $PV = nRT$

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 114 -

substituting reveals,

$$V_{\text{gas}} = nRT/P_{\text{gas}}$$

or,

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

$$5 \quad \text{amount } n = 4/3 [\pi r_{\text{gas}}^3 P/RT] \cdot MW_n$$

Converting back to a liquid volume

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

where D is the density of the precursor.

Solving for the diameter of the liquid droplet,

$$10 \quad (C) \quad \text{diameter}/2 = [3/4\pi [4/3 [\pi r_{\text{gas}}^3] P/RT] MW_n/D]^{1/3}$$

which reduces to

$$\text{Diameter} = 2[[r_{\text{gas}}^3] P/RT [MW_n/D]]^{1/3}.$$

As a further means of preparing vesicles of the desired size for use in the methods of the present invention, and with a knowledge of the volume and especially the radius of the liquid droplets, one can use appropriately sized filters to size the gaseous precursor droplets to the appropriate diameter sphere.

A representative gaseous precursor may be used to form a vesicle of defined size, for example, 10 μm diameter. In this example, the vesicle is formed in the bloodstream of a human being, thus the typical temperature would be 37°C or 310 K. At a pressure of 1 atmosphere and using the equation in (A), 7.54×10^{-17} moles of gaseous precursor would be required to fill the volume of a 10 μm diameter vesicle.

Using the above calculated amount of gaseous precursor and 1-fluorobutane, which possesses a molecular weight of 76.11, a boiling point of 32.5°C and a density of 0.7789 g/mL at 20°C, further calculations predict that 5.74×10^{-15} grams of this precursor would be required for a 10 μm vesicle. Extrapolating further, and with the knowledge of the density, equation (B) further predicts that 8.47×10^{-16} mL of liquid precursor is necessary to form a vesicle with an upper limit of 10 μm .

Finally, using equation (C), a mixture, for example, an emulsion containing droplets with a radius of 0.0272 μm or a corresponding diameter of 0.0544 μm , is formed to make a gaseous precursor filled vesicle with an upper limit of a 10 μm vesicle.

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 115 -

An emulsion of this particular size could be easily achieved by the use of an appropriately sized filter. In addition, as seen by the size of the filter necessary to form gaseous precursor droplets of defined size, the size of the filter would also suffice to remove any possible bacterial contaminants and, hence, can be used as a sterile filtration as well.

This embodiment for preparing gas filled vesicles may be applied to all gaseous precursors activated by temperature. In fact, depression of the freezing point of the solvent system allows the use of gaseous precursors which would undergo liquid-to-gas phase transitions at temperatures below 0°C. The solvent system can be selected to provide a medium for suspension of the gaseous precursor. For example, 20% propylene glycol miscible in buffered saline exhibits a freezing point depression well below the freezing point of water alone. By increasing the amount of propylene glycol or adding materials such as sodium chloride, the freezing point can be depressed even further.

The selection of appropriate solvent systems may be determined by physical methods as well. When substances, solid or liquid, herein referred to as solutes, are dissolved in a solvent, such as water based buffers, the freezing point is lowered by an amount that is dependent upon the composition of the solution. Thus, as defined by Wall, one can express the freezing point depression of the solvent by the following equation:

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

where

x_a is the mole fraction of the solvent;

x_b is the mole fraction of the solute;

ΔH_{fus} is the heat of fusion of the solvent; and

T_o is the normal freezing point of the solvent.

The normal freezing point of the solvent can be obtained by solving the equation. If x_b is small relative to x_a , then the above equation may be rewritten as follows.

$$x^b = \Delta H_{fus}/R[T - T_o/T_o T] \approx \Delta H_{fus}\Delta T/RT_o^2$$

The above equation assumes the change in temperature ΔT is small compared to T_o . This equation can be simplified further by expressing the concentration of the solute in terms of molality, m (moles of solute per thousand grams of solvent). Thus, the equation can be rewritten as follows.

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 116 -

$$X_s = m/[m + 1000/m_1] \approx mM/1000$$

where Ma is the molecular weight of the solvent.

Thus, substituting for the fraction x_s :

$$\Delta T = [M_s R T_o^2 / 1000 \Delta H_{fus}] m$$

5 or

$$\Delta T = K_f m, \text{ where}$$

$$K_f = M_s R T_o^2 / 1000 \Delta H_{fus}$$

K_f is the molal freezing point and is equal to 1.86 degrees per unit of molal concentration for water at one atmosphere pressure. The above equation may be used to accurately

10 determine the molal freezing point of solutions of gaseous-precursor filled vesicles.

Accordingly, the above equation can be applied to estimate freezing point depressions and to determine the appropriate concentrations of liquid or solid solute necessary to depress the solvent freezing temperature to an appropriate value.

Methods of preparing the temperature activated gaseous precursor filled

15 vesicles include:

(a) vortexing and/or shaking an aqueous mixture of gaseous precursor and additional materials as desired, including, for example, stabilizing materials, thickening agents and/or dispersing agents. Optional variations of this method include autoclaving before vortexing or shaking; heating an aqueous mixture of gaseous precursor; venting the vessel containing the mixture/suspension; shaking or permitting the gaseous precursor filled vesicle to form spontaneously and cooling down the suspension of gaseous precursor filled vesicles; and extruding an aqueous suspension of gaseous precursor through a filter of about 0.22 μm . Alternatively, filtering may be performed during *in vivo* administration of the vesicles such that a filter of about 0.22 μm is employed;

25 (b) microemulsification whereby an aqueous mixture of gaseous precursor is emulsified by agitation and heated to form, for example, vesicles prior to administration to a patient;

(c) heating a gaseous precursor in a mixture, with or without agitation, whereby the less dense gaseous precursor filled vesicles float to the top of the solution by expanding and displacing other vesicles in the vessel and venting the vessel to release air; and

30

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 117 -

(d) utilizing in any of the above methods a sealed vessel to hold the aqueous suspension of gaseous precursor and maintaining the suspension at a temperature below the phase transition temperature of the gaseous precursor, followed by autoclaving to raise the temperature above the phase transition temperature, optionally with shaking, or permitting the gaseous precursor vesicle to form spontaneously, whereby the expanded gaseous precursor in the sealed vessel increases the pressure in the vessel, and cooling down the gas filled vesicle suspension, after which shaking may also take place.

Freeze drying is useful to remove water and organic materials prior to the shaking installation method. Drying installation methods may be used to remove water from vesicles. By pre-entrapping the gaseous precursor in the dried vesicles (i.e. prior to drying) after warming, the gaseous precursor may expand to fill the vesicle. Gaseous precursors can also be used to fill dried vesicles after they have been subjected to vacuum. As the dried vesicles are kept at a temperature below their gel state to liquid crystalline temperature, the drying chamber can be slowly filled with the gaseous precursor in its gaseous state. For example, perfluorobutane can be used to fill dried vesicles at temperatures above 4°C (the boiling point of perfluorobutane).

Preferred methods for preparing the temperature activated gaseous precursor filled vesicles comprise shaking an aqueous solution having a lipid compound in the presence of a gaseous precursor at a temperature below the liquid state to gas state phase transition temperature of the gaseous precursor. This is preferably conducted at a temperature below the gel state to liquid crystalline state phase transition temperature of the lipid. The mixture is then heated to a temperature above the liquid state to gas state phase transition temperature of the gaseous precursor which causes the precursor to volatilize and expand. Heating is then discontinued, and the temperature of the mixture is then allowed to drop below the liquid state to gas state phase transition temperature of the gaseous precursor. Shaking of the mixture may take place during the heating step, or subsequently after the mixture is allowed to cool.

Other methods for preparing gaseous precursor filled vesicles can involve shaking an aqueous solution of, for example, a lipid and a gaseous precursor, and separating the resulting gaseous precursor filled vesicles.

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 118 -

Conventional, aqueous-filled liposomes of the prior art are routinely formed at a temperature above the phase transition temperature of the lipids used to make them, since they are more flexible and thus useful in biological systems in the liquid crystalline state. See, for example, Szoka and Papahadjopoulos, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1978, 75, 4194-4198. In contrast, the vesicles made according to certain preferred embodiments described herein are gaseous precursor filled, which imparts greater flexibility, since gaseous precursors after gas formation are more compressible and compliant than an aqueous solution.

The methods contemplated by the present invention provide for shaking an aqueous solution comprising a lipid, in the presence of a temperature activatable gaseous precursor. Preferably, the shaking is of sufficient force such that a foam is formed within a short period of time, such as about 30 minutes, and preferably within about 20 minutes, and more preferably, within about 10 minutes. The shaking may involve microemulsifying, microfluidizing, swirling (such as by vortexing), side-to-side, or up and down motion. In the case of the addition of gaseous precursor in the liquid state, sonication may be used in addition to the shaking methods set forth above. Further, different types of motion may be combined. Also, the shaking may occur by shaking the container holding the aqueous lipid solution, or by shaking the aqueous solution within the container without shaking the container itself. Further, the shaking may occur manually or by machine. Mechanical shakers that may be used include, for example, the mechanical shakers described hereinbefore, with an Espe Capmix (Seefeld, Oberay Germany) being preferred. Another means for producing shaking includes the action of gaseous precursor emitted under high velocity or pressure.

According to the methods described herein, a gas, such as air, may also be provided by the local ambient atmosphere. The local ambient atmosphere can include the atmosphere within a sealed container, as well as the external environment. Alternatively, for example, a gas may be injected into or otherwise added to the container having the aqueous lipid solution or into the aqueous lipid solution itself to provide a gas other than air. Gases that are lighter than air are generally added to a sealed container, while gases heavier than air can be added to a sealed or an unsealed container. Accordingly, the present invention includes co-entrapment of air and/or other gases along with gaseous precursors.

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 119 -

Hence, the gaseous precursor filled vesicles can be used in substantially the same manner as the gas filled vesicles described herein, once activated by application to the tissues of a host, where such factors as temperature or pH may be used to cause generation of the gas. It is preferred that the gaseous precursors undergo phase transitions from liquid to gaseous states at near the normal body temperature of the host, and are thereby activated, for example, by the *in vivo* temperature of the host so as to undergo transition to the gaseous phase therein. Alternating, activation prior to I.V. injection may be used, for example, by thermal, mechanical or optical means. This activation can occur where, for example, the host tissue is human tissue having a normal temperature of about 37°C and the gaseous precursors undergo phase transitions from liquid to gaseous states near 37°C.

As noted above, the lipid and/or vesicle compositions may be sterilized by autoclave or sterile filtration if these processes are performed before the installation step or prior to temperature mediated conversion of the temperature sensitive gaseous precursors within the compositions. Alternatively, one or more anti-bactericidal agents and/or preservatives may be included in the formulation of the compositions, such as sodium benzoate, quaternary ammonium salts, sodium azide, methyl paraben, propyl paraben, sorbic acid, ascorbylpalmitate, butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene, chlorobutanol, dehydroacetic acid, ethylenediamine, monothioglycerol, potassium benzoate, potassium metabisulfite, potassium sorbate, sodium bisulfite, sulfur dioxide, and organic mercurial salts. Such sterilization, which may also be achieved by other conventional means, such as by irradiation, will be necessary where the stabilized vesicles are used for imaging under invasive circumstances, e.g., intravascularly or intraperitoneally. The appropriate means of sterilization will be apparent to the artisan based on the present disclosure.

Vesicle compositions which comprise vesicles formulated from proteins (also referred to as protein encapsulated microbubbles), such as albumin vesicles, may be prepared by various processes, as will be readily apparent to those skilled in the art, once armed with the present disclosure. Suitable methods include those described, for example, in Feinstein, U.S. Patent Nos. 4,572,203, 4,718,433 and 4,774,958, and Cerny et al., U.S. Patent No. 4,957,656, the disclosures of which are hereby incorporated herein by reference, in their entirety. Included among the methods described in the aforementioned patents for

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 120 -

the preparation of protein-based vesicles are methods which involve sonicating a solution of a protein. In preferred form, the starting material may be an aqueous solution of a heat-denaturable, water-soluble biocompatible protein. The encapsulating protein is preferably heat-sensitive so that it can be partially insolubilized by heating during sonication. Suitable heat-sensitive proteins include, for example, albumin, hemoglobin, collagen, and the like. Preferably, the protein is a human protein, with human serum albumin (HSA) being more preferred. HSA is available commercially as a sterile 5% aqueous solution, which is suitable for use in the preparation of protein-based vesicles. Of course, as would be apparent to one of ordinary skill in the art, other concentrations of albumin, as well as other proteins which are heat-denaturable, can be used to prepare the vesicles. Generally speaking, the concentration of HSA can vary and may range from about 0.1 to about 25% by weight, and all combinations and subcombinations of ranges therein. It may be preferable, in connection with certain methods for the preparation of protein-based vesicles, to utilize the protein in the form of a dilute aqueous solution. For albumin, it may be preferred to utilize an aqueous solution containing from about 0.5 to about 7.5% by weight albumin, with concentrations of less than about 5% by weight being preferred, for example, from about 0.5 to about 3% by weight.

The protein-based vesicles may be prepared using equipment which is commercially available. For example, in connection with a feed preparation operation as disclosed, for example, in Cerny, et al., U.S. Patent No. 4,957,656, stainless steel tanks which are commercially available from Walker Stainless Equipment Co. (New Lisbon, WI), and process filters which are commercially available from Millipore (Bedford, MA), may be utilized.

The sonication operation may utilize both a heat exchanger and a flow through sonicating vessel, in series. Heat exchanger equipment of this type may be obtained from ITT Standard (Buffalo, NY). The heat exchanger maintains operating temperature for the sonication process, with temperature controls ranging from about 65°C to about 80°C, depending on the makeup of the media. The vibration frequency of the sonication equipment may vary over a wide range, for example, from about 5 to about 40 kilohertz (kHz), with a majority of the commercially available sonicators operating at about 10 or 20 kHz. Suitable sonicating equipment include, for example, a Sonics & Materials Vibra-Cell,

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 121 -

equipped with a flat-tipped sonicator horn, commercially available from Sonics & Materials, Inc. (Danbury, CT). The power applied to the sonicator horn can be varied over power settings scaled from 1 to 10 by the manufacturer, as with Sonics & Materials Vibra-Cell Model VL1500. An intermediate power setting, for example, from 5 to 9, can be used.

- 5 It is preferred that the vibrational frequency and the power supplied be sufficient to produce cavitation in the liquid being sonicated. Feed flow rates may range from about 50 mL/min to about 1000 mL/min, and all combinations and subcombinations of ranges therein. Residence times in the sonication vessel can range from about 1 second to about 4 minutes, and gaseous fluid addition rates may range from about 10 cubic centimeters (cc) per minute
10 to about 100 cc/min, or 5% to 25% of the feed flow rate, and all combinations and subcombinations of ranges therein.

- It may be preferable to carry out the sonication in such a manner to produce foaming, and especially intense foaming, of the solution. Generally speaking, intense foaming and aerosolating are important for obtaining a contrast agent having enhanced
15 concentration and stability. To promote foaming, the power input to the sonicator horn may be increased, and the process may be operated under mild pressure, for example, about 1 to about 5 psi. Foaming may be easily detected by the cloudy appearance of the solution, and by the foam produced.

- Suitable methods for the preparation of protein-based vesicles may also
20 involve physically or chemically altering the protein or protein derivative in aqueous solution to denature or fix the material. For example, protein-based vesicles may be prepared from a 5% aqueous solution of HSA by heating after formation or during formation of the contrast agent via sonication. Chemical alteration may involve chemically denaturing or fixing by binding the protein with a difunctional aldehyde, such as
25 glutaraldehyde. For example, the vesicles may be reacted with 0.25 grams of 50% aqueous glutaraldehyde per gram of protein at pH 4.5 for 6 hours. The unreacted glutaraldehyde may then be washed away from the protein.

- In any of the techniques described above for the preparation of protein-based vesicles, the targeting ligands may be incorporated with the proteins before, during or
30 after formation of the vesicles, as would be apparent to one of ordinary skill in the art, once armed with the present disclosure.

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 122 -

Vesicle compositions which comprise vesicles formulated from polymers may be prepared by various processes, as will be readily apparent to those skilled in the art, once armed with the present disclosure. Exemplary processes include, for example, interfacial polymerization, phase separation and coacervation, multiorifice centrifugal preparation, and solvent evaporation. Suitable procedures which may be employed or modified in accordance with the present disclosure to prepare vesicles from polymers include those procedures disclosed in Garner et al., U.S. Patent No. 4,179,546, Garner, U.S. Patent No. 3,945,956, Cohrs et al., U.S. Patent No. 4,108,806, Japan Kokai Tokkyo Koho 62 286534, British Patent No. 1,044,680, Kenaga et al., U.S. Patent No. 3,293,114, Morehouse et al., U.S. Patent No. 3,401,475, Walters, U.S. Patent No. 3,479,811, Walters et al., U.S. Patent No. 3,488,714, Morehouse et al., U.S. Patent No. 3,615,972, Baker et al., U.S. Patent No. 4,549,892, Sands et al., U.S. Patent No. 4,540,629, Sands et al., U.S. Patent No. 4,421,562, Sands, U.S. Patent No. 4,420,442, Mathiowitz et al., U.S. Patent No. 4,898,734, Lencki et al., U.S. Patent No. 4,822,534, Herbig et al., U.S. Patent No. 3,732,172, Himmel et al., U.S. Patent No. 3,594,326, Sommerville et al., U.S. Patent No. 3,015,128, Deasy, *Microencapsulation and Related Drug Processes*, Vol. 20, Chs. 9 and 10, pp. 195-240 (Marcel Dekker, Inc., N.Y., 1984), Chang et al., *Canadian J. of Physiology and Pharmacology*, Vol 44, pp. 115-129 (1966), and Chang, *Science*, Vol. 146, pp. 524-525 (1964), the disclosures of each of which are incorporated herein by reference in their entirety.

In accordance with a preferred synthesis protocol, the vesicles may be prepared using a heat expansion process, such as, for example, the process described in Garner et al., U.S. Patent No. 4,179,546, Garner, U.S. Patent No. 3,945,956, Cohrs et al., U.S. Patent No. 4,108,806, British Patent No. 1,044,680, and Japan Kokai Tokkyo Koho 62 286534. In general terms, the heat expansion process may be carried out by preparing vesicles of an expandable polymer or copolymer which may contain in their void (cavity) a volatile liquid (gaseous precursor). The vesicle is then heated, plasticising the vesicle and converting the volatile liquid into a gas, causing the vesicle to expand to up to about several times its original size. When the heat is removed, the thermoplastic polymer retains at least some of its expanded shape. Vesicles produced by this process tend to be of particularly

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 123 -

low density, and are thus preferred. The foregoing described process is well known in the art, and may be referred to as the heat expansion process for preparing low density vesicles.

Polymers useful in the heat expansion process will be readily apparent to those skilled in the art and include thermoplastic polymers or copolymers, including

5 polymers or copolymers of many of the monomers described above. Preferable of the polymers and copolymers described above include the following copolymers: polyvinylidene-polyacrylonitrile, polyvinylidene-polyacrylonitrile-polymethylmethacrylate, and polystyrene-polyacrylonitrile. A most preferred copolymer is polyvinylidene-polyacrylonitrile.

10 Volatile liquids useful in the heat expansion process will also be well known to those skilled in the art and include: aliphatic hydrocarbons such as ethane, ethylene, propane, propene, butane, isobutane, neopentane, acetylene, hexane, heptane; chlorofluorocarbons such as CCl_3F , CCl_2F_2 , CClF_3 , $\text{CClF}_2\text{-CCl}_2\text{F}_2$, chloroheptafluorocyclobutane, and 1,2-dichlorohexafluorocyclobutane; tetraalkyl silanes, such as tetramethyl
15 silane, trimethylethyl silane, trimethylisopropyl silane, and trimethyl n-propyl silane; as well as perfluorocarbons, including the perfluorocarbons described above. In general, it is important that the volatile liquid not be a solvent for the polymer or copolymer being utilized. It is also preferred that the volatile liquid have a boiling point that is below the softening point of the involved polymer or co-polymer. Boiling points of various volatile
20 liquids and softening points of various polymers and copolymers will be readily ascertainable to one skilled in the art, and suitable combinations of polymers or copolymers and volatile liquids will be easily apparent to the skilled artisan. By way of guidance, and as one skilled in the art would recognize, generally as the length of the carbon chain of the volatile liquid increases, the boiling point of that liquid increases also. Also, mildly
25 preheating the vesicles in water in the presence of hydrogen peroxide prior to definitive heating and expansion may pre-soften the vesicle to allow expansion to occur more readily.

For example, to produce vesicles from synthetic polymers, vinylidene and acrylonitrile may be copolymerized in a medium of isobutane liquid using one or more of the foregoing modified or unmodified literature procedures, such that isobutane becomes
30 entrapped within the vesicles. When such vesicles are then heated to a temperature of from about 80°C to about 120°C , the isobutane gas expands, which in turn expands the vesicles.

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 124 -

After heat is removed, the expanded polyvinylidene and acrylo-nitrile copolymer vesicles remain substantially fixed in their expanded position. The resulting low density vesicles are extremely stable both dry and suspended in an aqueous media. Isobutane is utilized herein merely as an illustrative liquid, with the understanding that other liquids which
5 undergo liquid/gas transitions at temperatures useful for the synthesis of these vesicles and formation of the very low density vesicles upon heating can be substituted for isobutane. Similarly, monomers other than vinylidene and acrylonitrile may be employed in preparing the vesicles.

In certain preferred embodiments, the vesicles which are formulated from
10 synthetic polymers and which may be employed in the methods of the present invention are commercially available from Expancel, Nobel Industries (Sundsvall, Sweden), including EXPANCEL 551 DE™ microspheres. The EXPANCEL 551 DE™ microspheres are composed of a copolymer of vinylidene and acrylonitrile which have encapsulated therein isobutane liquid. Such microspheres are sold as a dry composition and are approximately
15 50 microns in size. The EXPANCEL 551 DE™ microspheres have a specific gravity of only 0.02 to 0.05, which is between one-fiftieth and one-twentieth the density of water.

In any of the techniques described above for the preparation of polymer-based vesicles, the targeting ligands may be incorporated with the polymers before, during or after formation of the vesicles, as would be apparent to one of ordinary skill in the art,
20 once armed with the present disclosure.

As with the preparation of lipid and/or vesicle compositions, a wide variety of techniques are available for the preparation of lipid formulations. For example, the lipid and/or vesicle formulations may be prepared from a mixture of lipid compounds, bioactive agent and gas or gaseous precursor. In this case, lipid compositions are prepared as
25 described above in which the compositions also comprise bioactive agent. Thus, for example, micelles can be prepared in the presence of a bioactive agent. In connection with lipid compositions which comprise a gas, the preparation can involve, for example, bubbling a gas directly into a mixture of the lipid compounds and one or more additional materials. Alternatively, the lipid compositions may be preformed from lipid compounds
30 and gas or gaseous precursor. In the latter case, the bioactive agent is then added to the lipid composition prior to use. For example, an aqueous mixture of liposomes and gas may

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 125 -

be prepared to which the bioactive agent is added and which is agitated to provide the liposome formulation. The liposome formulation can be readily isolated since the gas and/or bioactive agent filled liposome vesicles generally float to the top of the aqueous solution. Excess bioactive agent can be recovered from the remaining aqueous solution.

5 As those skilled in the art will recognize, any of the lipid and/or vesicle compositions and/or lipid and/or vesicle formulations may be lyophilized for storage, and reconstituted, for example, with an aqueous medium (such as sterile water, phosphate buffered solution, or aqueous saline solution), with the aid of vigorous agitation. To prevent agglutination or fusion of the lipids and/or vesicles as a result of lyophilization, it
10 may be useful to include additives which prevent such fusion or agglutination from occurring. Additives which may be useful include sorbitol, mannitol, sodium chloride, glucose, trehalose, polyvinylpyrrolidone and poly(ethylene glycol) (PEG), for example, PEG 400. These and other additives are described in the literature, such as in the U.S. Pharmacopeia, USP XXII, NF XVII, The United States Pharmacopeia, The National
15 Formulary, United States Pharmacopeial Convention Inc., 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852, the disclosures of which are hereby incorporated herein by reference in their entirety. Lyophilized preparations generally have the advantage of greater shelf life.

As discussed above, the compositions of the present invention, including gas
20 and/or gaseous precursor filled vesicles, are useful as contrast agents for diagnostic imaging, including, for example, ultrasound imaging (US), computed tomography (CT) imaging, including CT angiography (CTA) imaging, magnetic resonance (MR) imaging, magnetic resonance angiography (MRA), nuclear medicine, optical imaging and elastography.

25 In accordance with the present invention, there are provided methods of imaging one or more regions of a patient. The present invention also provides methods for diagnosing the presence or absence of diseased tissue in a patient. The methods of the present invention involve the administration of a contrast medium, in the form of a lipid and/or vesicle composition, to a patient. The patient is scanned using diagnostic imaging
30 including, for example ultrasound imaging, to obtain visible images of an internal region of a patient. The methods are especially useful in providing images of the heart region, the

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 126 -

gastrointestinal region or the lymphatic system, but can also be employed more broadly to image other internal regions of the patient including, for example, the vasculature. The phrase "gastrointestinal region" or "gastrointestinal tract," as used herein, includes the region of a patient defined by the esophagus, stomach, small and large intestines and rectum. The present methods can also be used in connection with the delivery of a bioactive agent to an internal region of a patient.

As one skilled in the art would recognize, administration of the lipid and/or vesicle compositions of the present invention can be carried out in various fashions, namely, parenterally, orally, or intraperitoneally. Parenteral administration, which is preferred, includes administration by the following routes: intravenous; intramuscular; interstitially; intra-arterially; subcutaneous; intraocular; intrasynovial; transepithelial, including transdermal; pulmonary via inhalation; ophthalmic; sublingual and buccal; topically, including ophthalmic; dermal; ocular; rectal; and nasal inhalation via insufflation. Intravenous administration is preferred among the routes of parenteral administration. The useful dosage to be administered and the particular mode of administration will vary depending upon the age, weight and the particular mammal and region thereof to be scanned, and the particular contrast agent employed. Typically, dosage is initiated at lower levels and increased until the desired contrast enhancement is achieved. Various combinations of the lipid compositions may be used to alter properties as desired, including viscosity, osmolality or palatability. In carrying out the imaging methods of the present invention, the contrast medium can be used alone, or in combination with diagnostic, therapeutic or other agents. Such other agents include excipients such as flavoring or coloring materials. CT imaging techniques which are employed are conventional and are described, for example, in *Computed Body Tomography*, Lee, J.K.T., Sagel, S.S., and Stanley, R.J., eds., 1983, Ravens Press, New York, N.Y., especially the first two chapters thereof entitled "*Physical Principles and Instrumentation*", Ter-Pogossian, M.M., and "*Techniques*", Aronberg, D.J., the disclosures of which are incorporated by reference herein in their entirety.

In the case of diagnostic applications, such as ultrasound and CT, energy, such as ultrasonic energy, is applied to at least a portion of the patient to image the target tissue. A visible image of an internal region of the patient is then obtained, such that the

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 127 -

presence or absence of diseased tissue can be ascertained. With respect to ultrasound, ultrasonic imaging techniques, including second harmonic imaging, and gated imaging, are well known in the art, and are described, for example, in Uhlendorf, "Physics of Ultrasound Contrast Imaging: Scattering in the Linear Range", *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, Vol. 14(1), pp. 70-79 (1994) and Sutherland, *et al.*, "Color Doppler Myocardial Imaging: A New Technique for the Assessment of Myocardial Function", *Journal of the American Society of Echocardiography*, Vol. 7(5), pp. 441-458 (1994), the disclosures of which are hereby incorporated herein by reference in their entirety.

10 Ultrasound can be used for both diagnostic and therapeutic purposes. In diagnostic ultrasound, ultrasound waves or a train of pulses of ultrasound may be applied with a transducer. The ultrasound is generally pulsed rather than continuous, although it may be continuous, if desired. Thus, diagnostic ultrasound generally involves the application of a pulse of echoes, after which, during a listening period, the ultrasound
15 transducer receives reflected signals. Harmonics, ultraharmonics or subharmonics may be used. The second harmonic mode may be beneficially employed, in which the 2x frequency is received, where x is the incidental frequency. This may serve to decrease the signal from the background material and enhance the signal from the transducer using the targeted contrast media of the present invention which may be targeted to the desired site,
20 for example, blood clots. Other harmonics signals, such as odd harmonics signals, for example, 3x or 5x, would be similarly received using this method. Subharmonic signals, for example, x/2 and x/3, may also be received and processed so as to form an image.

 In addition to the pulsed method, continuous wave ultrasound, for example, Power Doppler, may be applied. This may be particularly useful where rigid vesicles, for
25 example, vesicles formulated from polymethyl methacrylate, are employed. In this case, the relatively higher energy of the Power Doppler may be made to resonate the vesicles and thereby promote their rupture. This can create acoustic emissions which may be in the subharmonic or ultraharmonic range or, in some cases, in the same frequency as the applied ultrasound. It is contemplated that there will be a spectrum of acoustic signatures released
30 in this process and the transducer so employed may receive the acoustic emissions to detect, for example, the presence of a clot. In addition, the process of vesicle rupture may be

employed to transfer kinetic energy to the surface, for example of a clot to promote clot lysis. Thus, therapeutic thrombolysis may be achieved during a combination of diagnostic and therapeutic ultrasound. Spectral Doppler may also be employed. In general, the levels of energy from diagnostic ultrasound are insufficient to promote the rupture of vesicles and to facilitate release and cellular uptake of the bioactive agents. As noted above, diagnostic ultrasound may involve the application of one or more pulses of sound. Pauses between pulses permits the reflected sonic signals to be received and analyzed. The limited number of pulses used in diagnostic ultrasound limits the effective energy which is delivered to the tissue that is being studied.

Higher energy ultrasound, for example, ultrasound which is generated by therapeutic ultrasound equipment, is generally capable of causing rupture of the vesicle species. In general, devices for therapeutic ultrasound employ from about 10 to about 100% duty cycles, depending on the area of tissue to be treated with the ultrasound. Areas of the body which are generally characterized by larger amounts of muscle mass, for example, backs and thighs, as well as highly vascularized tissues, such as heart tissue, may require a larger duty cycle, for example, up to about 100%.

In therapeutic ultrasound, continuous wave ultrasound is used to deliver higher energy levels. For the rupture of vesicles, continuous wave ultrasound is preferred, although the sound energy may be pulsed also. If pulsed sound energy is used, the sound will generally be pulsed in echo train lengths of from about 8 to about 20 or more pulses at a time. Preferably, the echo train lengths are about 20 pulses at a time. In addition, the frequency of the sound used may vary from about 0.025 to about 100 megahertz (MHz). In general, frequency for therapeutic ultrasound preferably ranges between about 0.75 and about 3 MHz, with from about 1 and about 2 MHz being more preferred. In addition, energy levels may vary from about 0.5 Watt (W) per square centimeter (cm^2) to about 5.0 W/cm^2 , with energy levels of from about 0.5 to about 2.5 W/cm^2 being preferred. Energy levels for therapeutic ultrasound involving hyperthermia are generally from about 5 W/cm^2 to about 50 W/cm^2 . For very small vesicles, for example, vesicles having a diameter of less than about 0.5 μm , higher frequencies of sound are generally preferred. This is because smaller vesicles are capable of absorbing sonic energy more effectively at higher frequencies of sound. When very high frequencies are used, for example, greater than

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 129 -

about 10 MHz, the sonic energy will generally penetrate fluids and tissues to a limited depth only. Thus, external application of the sonic energy may be suitable for skin and other superficial tissues. However, it is generally necessary for deep structures to focus the ultrasonic energy so that it is preferentially directed within a focal zone. Alternatively, the ultrasonic energy may be applied via interstitial probes, intravascular ultrasound catheters or endoluminal catheters. Such probes or catheters may be used, for example, in the esophagus for the diagnosis and/or treatment of esophageal carcinoma. In addition to the therapeutic uses discussed above, the present compositions can be employed in connection with esophageal carcinoma or in the coronary arteries for the treatment of atherosclerosis, as well as the therapeutic uses described, for example, in U.S. Patent No. 5,149,319, the disclosures of which are hereby incorporated herein by reference, in their entirety.

A therapeutic ultrasound device may be used which employs two frequencies of ultrasound. The first frequency may be x , and the second frequency may be $2x$. In preferred form, the device would be designed such that the focal zones of the first and second frequencies converge to a single focal zone. The focal zone of the device may then be directed to the targeted compositions, for example, targeted vesicle compositions, within the targeted tissue. This ultrasound device may provide second harmonic therapy with simultaneous application of the x and $2x$ frequencies of ultrasound energy. It is contemplated that, in the case of ultrasound involving vesicles, this second harmonic therapy may provide improved rupturing of vesicles as compared to ultrasound energy involving a single frequency. Also, it is contemplated that the preferred frequency range may reside within the fundamental harmonic frequencies of the vesicles. Lower energy may also be used with this device. An ultrasound device which may be employed in connection with the aforementioned second harmonic therapy is described, for example, in Kawabata, K. et al., *Ultrasonics Sonochemistry*, Vol. 3, pp. 1-5 (1996), the disclosures of which are hereby incorporated herein by reference, in their entirety.

The concentration of lipid required to form a desired stabilized vesicle level will vary depending upon the type of lipid used, and may be readily determined by routine experimentation. For example, in preferred embodiments, the concentration of 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) used to form stabilized vesicles according to the methods of the present invention is about 0.1 mg/ml to about 30 mg/ml of saline solution,

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 130 -

more preferably from about 0.5 mg/ml to about 20 mg/ml of saline solution, and most preferably from about 1 mg/ml to about 10 mg/ml of saline solution. The concentration of distearoylphosphatidylcholine (DSPC) used in preferred embodiments is about 0.1 mg/ml to about 30 mg/ml of saline solution, more preferably from about 0.5 mg/ml to about 20 mg/ml of saline solution, and most preferably from about 1 mg/ml to about 10 mg/ml of saline solution. The amount of composition which is administered to a patient can vary. Typically, the IV dose may be less than about 10 mL for a 70 Kg patient, with lower doses being preferred.

In addition to the methods disclosed above, another embodiment of preparing a targeted contrast medium comprises combining at least one biocompatible lipid and a gaseous precursor; agitating until gas filled vesicles are formed; adding a targeting ligand to said gas filled vesicles such that the targeting ligand binds to said gas filled vesicle by a covalent bond or non-covalent bond; and agitating until a contrast agent comprising gas filled vesicles and a targeting ligand result. Rather than agitating until gas filled vesicles are formed before adding the targeting ligand, the gaseous precursor may remain a gaseous precursor until the time of use. That is, the gaseous precursor is used to prepare the contrast medium and the precursor is activated *in vivo*, by temperature for example.

Alternatively, a method of preparing a contrast medium targeted to endothelial cells may comprise combining at least one biocompatible lipid and a targeting ligand such that the targeting ligand binds to said lipid by a covalent bond or non-covalent bond, adding a gaseous precursor and agitating until a contrast medium comprising gas filled vesicles and a targeting ligand result. In addition, the gaseous precursor may be added and remain a gaseous precursor until the time of use. That is, the gaseous precursor is used to prepare the contrast medium having gaseous precursor filled vesicles and a targeting ligand which result for use *in vivo*.

Alternatively, the gaseous precursors may be utilized to create stable gas filled vesicles with targeting ligands which are pre-formed prior to use. In this embodiment, the gaseous precursor and targeting ligand are added to a container housing a suspending and/or stabilizing medium at a temperature below the liquid-gaseous phase transition temperature of the respective gaseous precursor. As the temperature is then

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 131 -

exceeded, and an emulsion is formed between the gaseous precursor and liquid solution, the gaseous precursor undergoes transition from the liquid to the gaseous state. As a result of this heating and gas formation, the gas displaces the air in the head space above the liquid suspension so as to form gas filled lipid spheres which entrap the gas of the gaseous precursor, ambient gas for example, air, or coentrap gas state gaseous precursor and ambient air. This phase transition can be used for optimal mixing and stabilization of the contrast medium. For example, the gaseous precursor, perfluorobutane, can be entrapped in the biocompatible lipid or other stabilizing compound, and as the temperature is raised, beyond 4° C (boiling point of perfluorobutane) stabilizing compound entrapped fluorobutane gas results. As an additional example, the gaseous precursor fluorobutane, can be suspended in an aqueous suspension containing emulsifying and stabilizing agents such as glycerol or propylene glycol and vortexed on a commercial vortexer. Vortexing is commenced at a temperature low enough that the gaseous precursor is liquid and is continued as the temperature of the sample is raised past the phase transition temperature from the liquid to gaseous state. In so doing, the precursor converts to the gaseous state during the microemulsification process. In the presence of the appropriate stabilizing agents, surprisingly stable gas filled vesicles and targeting ligand result.

Accordingly, the gaseous precursors may be selected to form a gas filled vesicle *in vivo* or may be designed to produce the gas filled vesicle *in situ*, during the manufacturing process, on storage, or at some time prior to use.

It will be understood by one skilled in the art, once armed with the present disclosure, that the lipids, proteins, polymers and other stabilizing compounds used as starting materials, or the vesicle final products, may be manipulated prior and subsequent to being subjected to the methods contemplated by the present invention. For example, the stabilizing compound such as a biocompatible lipid may be hydrated and then lyophilized, processed through freeze and thaw cycles, or simply hydrated. In preferred embodiments, the lipid is hydrated and then lyophilized, or hydrated, then processed through freeze and thaw cycles and then lyophilized, prior to the formation of gaseous precursor filled vesicles.

According to the methods contemplated by the present invention, the presence of gas, such as and not limited to air, may also be provided by the local ambient atmosphere. The local ambient atmosphere may be the atmosphere within a sealed

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 132 -

container, or in an unsealed container, may be the external environment. Alternatively, for example, a gas may be injected into or otherwise added to the container having the aqueous lipid solution or into the aqueous lipid solution itself in order to provide a gas other than air. Gases that are not heavier than air may be added to a sealed container while gases heavier than air may be added to a sealed or an unsealed container. Accordingly, the present invention includes co-entrapment of air and/or other gases along with gaseous precursors.

As already described above in the section dealing with the stabilizing compound, the preferred methods contemplated by the present invention are carried out at a temperature below the gel state to liquid crystalline state phase transition temperature of the lipid employed. By "gel state to liquid crystalline state phase transition temperature", it is meant the temperature at which a lipid bilayer will convert from a gel state to a liquid crystalline state. See, for example, Chapman *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1974, 249, 2512-2521.

Hence, the stabilized vesicle precursors described above, can be used in the same manner as the other stabilized vesicles used in the present invention, once activated by application to the tissues of a host, where such factors as temperature or pH may be used to cause generation of the gas. It is preferred that this embodiment is one wherein the gaseous precursors undergo phase transitions from liquid to gaseous states at near the normal body temperature of said host, and are thereby activated by the temperature of said host tissues so as to undergo transition to the gaseous phase therein. More preferably still, this method is one wherein the host tissue is human tissue having a normal temperature of about 37°C, and wherein the gaseous precursors undergo phase transitions from liquid to gaseous states near 37°C.

All of the above embodiments involving preparations of the stabilized gas filled vesicles used in the present invention, may be sterilized by autoclave or sterile filtration if these processes are performed before either the gas instillation step or prior to temperature mediated gas conversion of the temperature sensitive gaseous precursors within the suspension. Alternatively, one or more anti-bactericidal agents and/or preservatives may be included in the formulation of the contrast medium, such as sodium benzoate, all quaternary ammonium salts, sodium azide, methyl paraben, propyl paraben, sorbic acid, ascorbylpalmitate, butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene, chlorobutanol, dehydroacetic acid, ethylenediamine, monothioglycerol, potassium benzoate, potassium

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 133 -

metabisulfite, potassium sorbate, sodium bisulfite, sulfur dioxide, and organic mercurial salts. Such sterilization, which may also be achieved by other conventional means, such as by irradiation, will be necessary where the stabilized microspheres are used for imaging under invasive circumstances, for example, intravascularly or intraperitoneally. The appropriate means of sterilization will be apparent to the artisan instructed by the present description of the stabilized gas filled vesicles and their use. The contrast medium is generally stored as an aqueous suspension but in the case of dried vesicles or dried lipidic spheres the contrast medium may be stored as a dried powder ready to be reconstituted prior to use.

10 The novel compositions of the present invention, and especially the vesicle compositions, are useful as contrast media in diagnostic imaging, and are also suitable for use in all areas where diagnostic imaging is employed. However, the stabilized vesicles are particularly useful for perfusion imaging.

Diagnostic imaging is a means to visualize internal body regions of a patient. Diagnostic imaging includes, for example, ultrasound (US), magnetic resonance imaging (MRI), nuclear magnetic resonance (NMR), computed tomography (CT), electron spin resonance (ESR); nuclear medicine when the contrast medium includes radioactive material; and optical imaging, particularly with a fluorescent contrast medium. Diagnostic imaging also includes promoting the rupture of the vesicles via the methods of the present invention. For example, ultrasound may be used to visualize the vesicles and verify the localization of the vesicles in certain tissue. In addition, ultrasound may be used to promote rupture of the vesicles once the vesicles reach the intended target, including tissue and/or receptor destination, thus releasing a bioactive agent and/or diagnostic agent.

In accordance with the present invention, there are provided methods of imaging a patient generally, and/or in specifically diagnosing the presence of diseased tissue in a patient. The imaging process of the present invention may be carried out by administering a contrast medium of the invention to a patient, and then scanning the patient using, for example, ultrasound, computed tomography, and/or magnetic resonance imaging, to obtain visible images of an internal region of a patient and/or of any diseased tissue in that region. By region of a patient, it is meant the whole patient or a particular area or portion of the patient. The contrast medium may be particularly useful in providing images

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 134 -

of tissue, such as myocardial, endothelial, and/or epithelial tissue, as well as the gastrointestinal and cardiovascular regions, but can also be employed more broadly, such as in imaging the vasculature or in other ways as will be readily apparent to those skilled in the art. Cardiovascular region, as that phrase is used herein, denotes the region of the patient defined by the heart and the vasculature leading directly to and from the heart. The phrase vasculature, as used herein, denotes the blood vessels (arteries, veins, etc.) in the body or in an organ or part of the body. The patient can be any type of mammal, but most preferably is a human.

The present invention also provides a method of diagnosing the presence of diseased tissue. Diseased tissue includes, for example, endothelial tissue which results from vasculature that supports diseased tissue. As a result, the localization and visualization of endothelial tissue to a region of a patient which under normal circumstances is not associated with endothelial tissue provides an indication of diseased tissue in the region.

In carrying out the magnetic resonance imaging method of the present invention, the contrast medium can be used alone, or in combination with other diagnostic, therapeutic or other agents. Such other agents include excipients such as flavoring or coloring materials. The magnetic resonance imaging techniques which are employed are conventional and are described, for example, in D.M. Kean and M.A. Smith, *Magnetic Resonance Imaging: Principles and Applications*, (William and Wilkins, Baltimore 1986). Contemplated MRI techniques include, but are not limited to, nuclear magnetic resonance (NMR) and electronic spin resonance (ESR). The preferred imaging modality is NMR.

Exemplary methods which may be employed in evaluating contrast agents of the present invention are discussed below with reference to the system illustrated in the drawings. Referring to the drawings, wherein like numerals refer to like elements, Figure 1 is a schematic representation of a system 10 for the *in vitro* evaluation of contrast agents in accordance with embodiments of the present invention. In the presently preferred embodiment, system 10 includes an apparatus 12 for evaluating the effectiveness of contrast agents in accordance with the present invention. The apparatus 12 includes a block 14, preferably composed of agar, such as 2% agar. Agar osc is commercially available, for example, from Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN), and may be block prepared using

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 135 -

techniques well known to the ordinarily skilled artisan. The apparatus 12 further includes tubing 16 such as, for example, polyethylene tubing, which passes through the block 14. A string 18, such as a nylon string, is threaded through the tubing 16 to which a blood clot 20 is attached via an absorbent material 22, such as cotton piping material, that is fastened to the string 18 in a portion of the tubing 16 that passes through the block 12. An ultrasound probe 24 is positioned proximate the block 14.

The contrast agents may be evaluated using the system 10 in Figure 10 using the following procedure. Liquid media, such as saline, may be pumped through the tubing 16 at a desired flow rate using a peristaltic pump (not shown). Contrast agents may be injected into the circulating solution upstream of the clot 20, and ultrasound signals from the probe 24 may be directed at the region proximate the clot 20. Imaging may be performed continuously, and ultrasound intensity of the injected contrast agents may be measured at the region proximate the clot 20.

The invention is further demonstrated in the following examples. Examples 1 to 8, 13 to 15, 20 to 22, 27, 28, 42, 43 to 45 and 47, 48, 60 and 61 are actual examples and Examples 9 to 12, 16 to 19, 23 to 26, 29 to 41 and 49 to 59 are prophetic examples. Example 46 is both actual (in part) and prophetic (in part). The examples are for purposes of illustration and are not intended to limit the scope of the present invention.

WO 02/36161

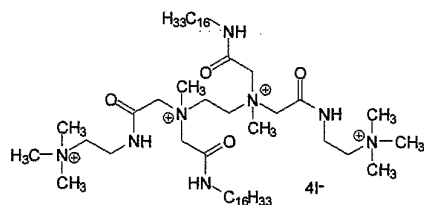
PCT/US01/32308

- 136 -

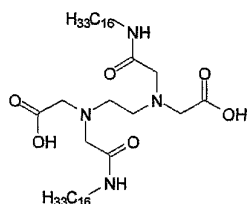
EXAMPLES

Example 1

This example is directed to the preparation of N,N'-bis(hexadecylaminocarbonylmethylene)-(β-N,N,N-trimethylammonium ethylaminocarbonylmethylene)-N,N'-dimethyl-N'-ethylenediamine tetraiodide (EDTA-HA-TMA tetraiodide), which has the following formula.



A. Preparation of N,N'-bis-(hexadecylaminocarbonylmethylene)-ethylenediamine-N,N'-diacetic acid (EDTA-HA).



Ethylenediaminetetraacetic acid dianhydride (2.56 g, 0.01 mole) in dry
10 methanol (30 mL) and hexadecylamine (4.82 g, 0.02 mole) in dry methanol (60 mL) were

WO 02/36161

PCT/US01/32308

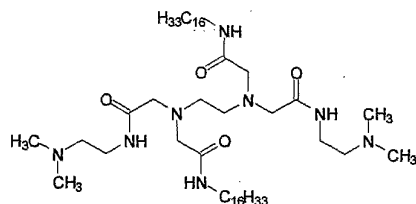
- 137 -

combined and stirred at 50°C for 6 hours. The resulting white solid was isolated by filtration and dried at room temperature under vacuum to yield 3.43 g (64%) of EDTA-HA.

IR: 3320 cm⁻¹ for OH, 1670 cm⁻¹ for C=O (carbonyl).

B. Preparation of N,N'-bis-(hexadecylaminocarbonylmethylene)-N,N'-β-

- 5 N,N-dimethylamino-ethylaminocarbonylmethylene)ethylenediamine (EDTA-HA-DMA).



- To a cooled (5°C) solution of EDTA-HA from Step A (3.69 g, 0.005 mole), N,N-dimethylethylenediamine (0.88 g, 0.01 mole) and CHCl₃ (100 mL) was added dropwise a solution of DCC (2.227 g, 0.011 mole) in CHCl₃ (20 mL). The resulting emulsion was stirred at room temperature for about 24 hours and filtered. The filtrate was washed with 0.5% acetic acid (100 mL) to decompose any excess DCC. A white milky solution was observed which separated into two layers. The lower organic layer was dried overnight (Na₂SO₄) and concentrated *in vacuo* to provide 3.81 g of EDTA-HA-DMA as a soft solid.

- 15 IR: 3280 cm⁻¹, 2900 cm⁻¹, 1640 cm⁻¹, 1530 cm⁻¹

C. Preparation of EDTA-HA-TMA tetraiodide.

- EDTA-HA-DMA from Step B (4.22 g, 4.77 mmole), iodomethane (3.41 g, 24 mmole) and ethanol (30 mL) were combined and refluxed for 2 hours. The reaction mixture was concentrated and the residue was lyophilized overnight. 4.98 g of the title product (EDTA-HA-TMA tetraiodide) was obtained as a yellow solid.

20

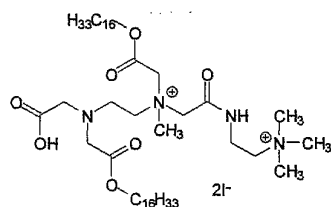
WO 02/36161

PCT/US01/32308

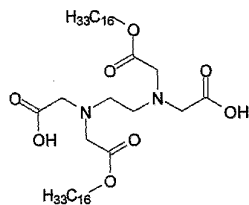
- 138 -

IR: 3260 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} .**Example 2**

This example is directed to the preparation of N,N'-bis(hexadecyloxycarbonylmethylene)-N-(β -N,N,N-trimethylammoniummethyl-aminocarbonylmethylene)-N-methyl-N'-(carboxymethylene)ethylenediamine diiodide (EDTA-HAL-DMA diiodide), which has the following formula.



A. Preparation of N,N'-bis-(hexadecyloxycarbonylmethylene)-ethylenediamine-N,N'-diacetic acid (EDTA-HAL).



- Hexadecyl alcohol (4.84 g, 0.02 mole), dry dimethylformamide (20 mL),
 10 dry triethylamine (3.3 g) and ethylenediaminetetraacetic acid dianhydride (2.56 g, 0.01 mole) were combined and stirred at 50°C for 2 hrs. The reaction mixture was poured into

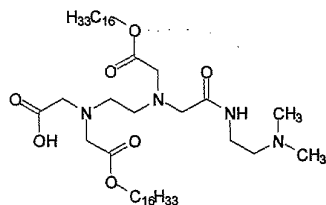
WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 139 -

cold water (200 mL) and the resulting aqueous mixture was acidified with HCl. The resulting white precipitate was isolated by filtration and the filter cake was washed with water. Recrystallization of the white solid from ethanol yielded 7 g of EDTA-HAL. m.p. 103°C.

- 5 B. Preparation of N,N'-bis(hexadecyloxycarbonylmethylene)-N-(β-N-dimethylaminoethylethylaminocarbonyl)-N'-acetic acid (EDTA-HAL-DMA).



- To a cooled (5°C) solution of EDTA-HAL from Step A (3.70 g, 0.005 mole), N,N-dimethylethylenediamine (1.598 g, 0.0175 mole) and CHCl₃ (100 mL) was added dropwise a solution of (DCC) (3.60 g, 0.0175 mole) in CHCl₃ (20 mL). A precipitate
10 formed, and the reaction mixture was stirred at room temperature for about 24 hours. The reaction mixture was filtered and the filtrate was washed with 0.5% acetic acid (100 mL) to decompose any excess DCC. A white milky solution formed which separated into two layers. The bottom organic layer was dried and concentrated *in vacuo* to yield 3.85 g of EDTA-HAL-DMA as a viscous liquid.

- 15 C. Preparation of EDTA-HAL-DMA diiodide.

EDTA-HAL-DMA from Step B (2.36 g, 0.0027 mole), iodomethane (3.81 g) and ethanol (50 mL) were combined and refluxed for 2 hrs. The solution was concentrated *in vacuo* and the resulting residue was lyophilized overnight. 2.96 g of the title compound (EDTA-HAL-DMA diiodide) was obtained as a yellowish solid.

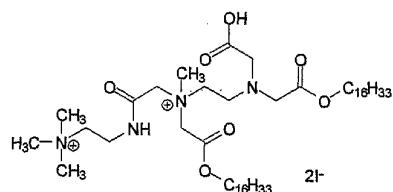
WO 02/36161

PCT/US01/32308

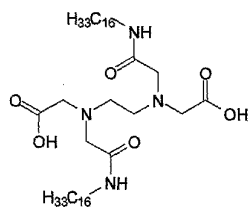
- 140 -

Example 3

This example is directed to the preparation of N,N'-bis(hexadecyloxycarbonylmethylene)-N-(β-N,N,N-trimethylammoniummethylaminocarbonylmethylene)-N-methyl-N'-(carboxymethylene)ethylenediamine diiodide (EDTA-HA-DMA diiodide), which has the following formula.



A. Preparation of N,N'-bis(hexadecylaminocarbonylmethylene)-ethylenediamine-N,N'-diacetic acid (EDTA-HA).



Hexadecylamine (4.82 g, 0.02 mole) in dry methanol (60 mL) was added to a suspension of ethylenediaminetetraacetic acid dianhydride (2.56 g, 0.01 mole) in dry
 10 methanol (30 mL). The mixture was stirred at 50°C for 6 hours. The resulting white solid precipitate was isolated by filtration and dried under vacuum at room temperature to yield 3.43 g (64%) of EDTA-HA. m.p. 156-158°C.

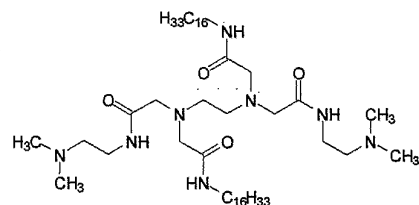
WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 141 -

IR: 3320 cm^{-1} for OH; 1670 cm^{-1} for -C(=O)- .

B. Preparation of N,N'-bis(hexadecylaminocarbonylmethylene)-N,N'-bis(β -N,N-dimethylethylaminoethylaminocarbonylmethylene)ethylenediamine (EDTA-HA-DMA).



- 5 To a cooled (5°C) solution of EDTA-HA from Step A (3.69 g, 0.005 mole), N,N-dimethylethylenediamine (0.88 g, 0.01 mole) and CHCl_3 (100 mL) was added dropwise a solution of 1,3-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (2.227 g, 0.011 mole) in CHCl_3 (20 mL). A precipitate was observed and the reaction mixture was stirred at room temperature for about 24 hours. The reaction mixture was filtered and the filtrate was
- 10 washed with 0.5% acetic acid (100 mL) to decompose any excess DCC. A white milky solution was formed which separated into two layers. The bottom organic layer was dried (Na_2SO_4) and concentrated *in vacuo* to yield 3.81 g of EDTA-HA-DMA as a soft solid.

IR: 3280 cm^{-1} ; 2900 cm^{-1} ; 1640 cm^{-1} ; 1530 cm^{-1} .

C. Preparation of EDTA-HA-DMA diiodide.

- 15 A solution of EDTA-HA-DMA from Step B (4.2 g, 4.77 mmole), iodomethane (3.41 g, 24 mmole) and ethanol (30 mL) was refluxed for 2 hours. The ethanolic solution was concentrated *in vacuo* and the resulting residue was lyophilized overnight. 3.98 g of the title compound (EDTA-LA-DMA diiodide) was obtained as a yellow solid.

- 20 IR: 3260 cm^{-1} ; 1650 cm^{-1} .

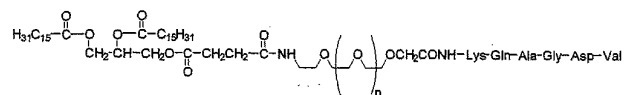
WO 02/36161

PCT/US01/32308

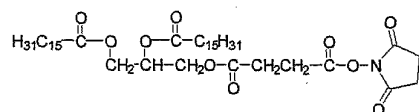
- 142 -

Example 4

This example is directed to the preparation of DPGS-PEG-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val which has the following formula.



- 5 A. Preparation of N-(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-succinyl)-succinimide (N-DPGS-succinimide).



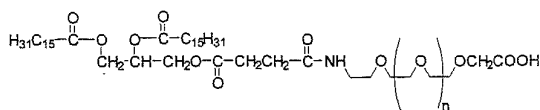
- To a cooled (0 to 5°C) solution of DCC (20.6 mg) and acetonitrile (10 mL) was added dropwise a solution of 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-succinate (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) (66.8 mg), N-hydroxysuccinimide (11.5 mg),
 10 dimethylaminopyridine (DMAP) (2 mg) and acetonitrile (40 mL). The reaction mixture was stirred for 5 hours and the resulting solid was removed by filtration. The filtrate was concentrated *in vacuo* to provide 78 mg of N-DPGS-succinimide as a white product.

- 15 B. Preparation of 3-ω-carboxy-polyethyleneglycolinosuccinate-1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol (DPGS-ω-carboxy-PEG).

WO 02/36161

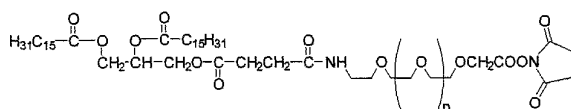
PCT/US01/32308

- 143 -



To a cooled (0 to 5°C) solution of ω -amino- ω' -carboxy-polyethyleneglycol (Shearwater Polymers, Huntsville, AL) (0.3 g) and triethylamine (40 mg) in CHCl_3 (20 mL) was added dropwise a solution of N-DPGS-succinimide from Step A (78 mg) in CHCl_3 (10 mL). The resulting solution was stirred for about 5 hours at 10°C and allowed to stand overnight. The reaction mixture was poured into ice water and neutralized with 10% HCl to a pH of less than 3. The organic layer was isolated, washed with water and dried (NaSO_4). Filtration and concentration *in vacuo* provided 0.34 g of DPGS- ω -carboxy-PEG as a white solid.

C. Preparation of 3-succinamoyloxycarbonyl-polyethyleneglycol-imino-succinate-1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol (DPGS- ω -carboxy-PEG-succinimide).



To a cooled (0 to 5°C) solution of DCC (12 mg) in acetonitrile (10 mL) was added a solution of DPGS- ω -carboxy-PEG from Step B (200 mg), N-hydroxysuccinimide (6 mg) and dimethylaminopyridine (2 mg). The resulting reaction mixture was stirred for 5 hours. The white solid which formed was removed from the reaction mixture by filtration, and the filtrate was concentrated *in vacuo*. DPGS- ω -carboxy-PEG-succinimide was obtained as a white solid (200 mg).

D. Preparation of DPGS-PEG-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val conjugate.

To a cooled (0 to 5°C) solution of the peptide Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val (5 mg) in a buffer solution at pH 8.5 (20 mL) was added dropwise a solution of DPGS- ω -carboxy-PEG-succinimide from Step C (40 mg) in acetonitrile (0.1 mL). The resulting

WO 02/36161

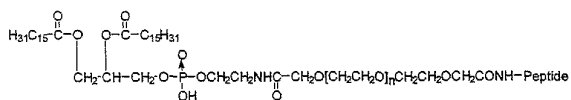
PCT/US01/32308

- 144 -

reaction mixture was stirred at room temperature for about 48 hours. The reaction mixture was concentrated *in vacuo* and the mineral salt was dialyzed through a membrane having a molecular weight cutoff of about 1,000 and dried on a lyophilizer. The title compound (DPGS-PEG-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val) was obtained as a white solid (24 mg).

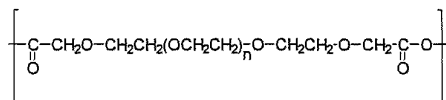
5 Example 5

This example is directed to the preparation of DPPE-PEG-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val), which has the following formula.



where "Peptide" is —Lys—Gln—Ala—Gly—Asp—Val

A. Preparation of ω,ω' -dimethylenecarboxy-polyethylene glycol anhydride.



To a cooled (0 to 5°C) solution of chlorosulfonyl isocyanate

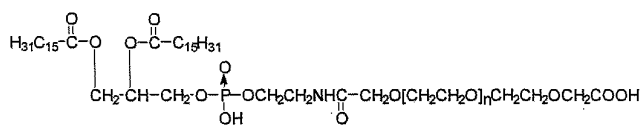
- 10 (14.2 mg) in CHCl_3 (5 mL) was added a solution of ω,ω' -dimethylenecarboxy-polyethylene glycol (0.34 g) and triethylamine (20 mg) in CHCl_3 (20 mL). The reaction mixture was stirred overnight and poured into ice water. The organic layer was isolated and dried (NaSO_4). Filtration and concentration of the organic layer *in vacuo* yielded the title anhydride compound as a white solid (0.2 g).

WO 02/36161

PCT/US01/32308

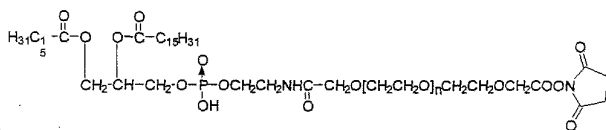
- 145 -

B. Preparation of 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine-N-carboxymethylene- ω -carboxy-polyethylene glycol (DPPE- ω -carboxy-PEG).



To a cooled (0 to 10°C) solution of the anhydride compound from Step A (0.3 g) in CH_2Cl_2 (10 mL) was added a solution of DPPE (0.07 g) and triethylamine (0.05 g) in CH_2Cl_2 (15 mL). The resulting reaction mixture was stirred overnight, poured into ice water and neutralized with 10% HCl to a pH of less than 3. The organic layer was isolated and dried (NaSO_4). Filtration and concentration of the organic layer *in vacuo* provided 0.45 g of DPPE- ω -carboxy-PEG as a dark white solid.

C. Preparation of 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine-N-carboxymethylene-polyethylene glycol-succinimide (DPPE- ω -carboxy-PEG-succinimide).



To a cooled (0 to 5°C) solution of DCC (3 mg) in acetonitrile (2 mL) was added a solution of DPPE- ω -carboxy-PEG from Step B (60 mg), N-hydroxy-succinimide (1.8 mg) and dimethylaminopyridine (0.2 mg) in acetonitrile (6 mL). The resulting mixture was stirred for 3 hours at 0 to 5°C and then overnight at room temperature. The solid which formed was removed by filtration and the filtrate was concentrated *in vacuo* to provide 60 mg of DPPE- ω -carboxy-PEG-succinimide.

D. Preparation of DPPE-PEG-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val conjugate.

To a cooled (0 to 5°C) solution of Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val (5 mg) in a buffer solution at pH 8.5 was added dropwise DPPE- ω -carboxy-PEG-succinimide (40 mg) in acetonitrile (10 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature for about 48 hours. The acetonitrile was removed *in vacuo*, and the mineral salt was dialyzed out through a membrane having a molecular weight cutoff of 1000. Lyophilization afforded 35 mg of the title compound (DPPE-PEG-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val) as a white solid.

Example 6

To a solution of saline, propylene glycol and glycerol (8:1:1) were added DPPC, DPPE-PEG5000 and DPPA in a molar ratio of 82:8:10. The resulting mixture was heated to about 45°C and filtered (0.22 μ m). The filtered mixture was placed in a vial and allowed to cool to room temperature. The vial was placed under vacuum to evacuate any gas, after which the vial was pressurized with PFP. The vial was then sealed, placed on a shaker and agitated at room temperature to provide a solution of PFP-filled vesicles having a mean diameter of about 2.5 μ m.

Example 7

This example is directed to the preparation of targeted vesicles within the scope of the present invention.

GPIIb/IIIa binding peptide (Integrated Biomolecule Corporation, Tucson, AZ) was covalently bonded to DPPE-PEG 3400 utilizing the procedure described above in Example 5. This peptide conjugate was then combined with a dried lipid mixture of DPPC (82 mole %), DPPE-PEG5000 (8 mole %) and DPPA (8 mole %). This mixture was hydrated and lyophilized on a Labconco Lyphe-Lock 12 lyophilizer (Kansas City, MO). The lyophilized material was resuspended in 8:1:1 normal saline:propylene glycol:glycerol at a concentration of 1 mg/mL. Aliquots of this mixture were placed into 2 mL Wheaton vials (Millville, NJ), capped and the headspace replaced with perfluorobutane gas (Flura, Newport, TN). The vials were agitated to provide a vesicle composition targeted to the GPIIb/IIIa receptor.

Example 8

This example includes a description of peptide binding experiments utilizing the vesicle compositions prepared in Examples 6 and 7.

Unheparinized human blood was placed in Vacutainer tubes (Becton Dickinson, Rutherford, NJ) and allowed to clot. The clot was collected by centrifugation in a Beckman TJ-6 centrifuge (Palo Alto, CA). The clot was then placed on positively charged microscope slides (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). Nine slides were coated with clotted blood. Six uncoated slides were also used as control studies. Binding studies were then conducted by applying the vesicle compositions from Examples 6 and 7 (200 μ L) to the aforementioned slides as follows: (A) blood clot alone (control); (B) vesicle composition from Example 6 without blood clot; (C) vesicle composition from Example 6 with blood clot; (D) vesicle composition from Example 7 without blood clot; and (E) vesicle composition from Example 3 with blood clot. The slides were incubated for 20 minutes and then unbound material was washed off using phosphate buffered saline. The slides were then observed using a Nikon Diaphot (Tokyo, Japan) microscope. The results are set forth in the following table.

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 148 -

TABLE 3

	<u>Binding Study</u>	<u>Binding</u>
	(A)	no
	(B)	no
5	(C)	no
	(D)	no
	(E)	yes

As can be seen from the above table, binding was observed only with the vesicle composition prepared in Example 7 which contains GPIIb/IIIa targeting peptide.

10 Example 9

This example is directed to the preparation of vesicles based on human serum albumin that bear targeting ligands directed to the GPIIb/IIIa receptor.

Into a vessel will be introduced a suspension of 5% human serum albumin. The suspension will be deaerated under continuous vacuum and a headspace of
 15 perfluoropropane gas will be introduced, as described in Published International Application WO 95/29705, the disclosures of which are hereby incorporated by reference, in their entirety. The resulting gas-filled albumin vesicles will be separated from any free albumin by repeated washing with normal saline. The gas-filled vesicles will be resuspended in a mixture of normal saline:propylene glycol:glycerol (6:2:2, v:v:v) and the
 20 suspension will be mixed gently. To this suspension will be added 1% glutaraldehyde and 1% by weight of the peptide Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val resulting in crosslinked perfluoropropane vesicles bearing GPIIb/IIIa binding peptide.

Example 10

This example is directed to the preparation of vesicles stabilized by
 25 polymerizable acryloyl/styryl lipid analogs binding targeting ligands directed to the GPIIb/IIIa receptor.

12-Hydroxydodecanoic acid will be esterified with methacryloyl chloride and the ester will be converted to the anhydride to provide 12-(methacryloyloxy)dodecanoic anhydride. L-alpha-Glycerophosphocholine, derived from egg lecithin,
 30 will be acylated with the 12-(methacryloyloxy)dodecanoic anhydride to afford bis[12-

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 149 -

(methacryloyloxy)dodecanoyl]-L- α -phosphatidylcholine (1). Compound (1) will be hydrolyzed enzymatically with phospholipase A₂, derived from crude rattlesnake venom (*Crotalus adamanteus*), followed by acylation with palmitoyl anhydride to provide 1-[2-(methacryloyloxy)dodecanoyl]-2-palmitoyl-L- α -phosphatidylcholine (2). Similar methods will be employed to convert dipalmitoyl-L- α -phosphatidylcholine into 1-palmitoyl-2-[12-(methacryloyloxy)-dodecanoyl]-L- α -phosphatidylcholine (3).

To a solution in normal saline of DPPE-PEG 5000 (1.8 mg/mL) and 10% by weight DPPE-PEG-5000 labelled with GPIIb/IIIa binding peptide (Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val), which will be prepared using the procedure described above in Example 5, will be added compound (3) prepared above. An aliquot of this solution will be placed in a sterile 3 mL vial. The headspace of the vial will be evacuated and a mixture of nitrogen and perfluoroethane gas (20:80, v/v) will be filled into the headspace of the vial to ambient pressure. The vial will be shaken on an ESPE Capmix (Seefeld, Oberay Germany) at room temperature for about 1 minute. The vesicle composition will be irradiated (254 nm) to provide polymerized gas-filled vesicles bearing GPIIb/IIIa binding peptide. The mean diameter of the vesicles will be about 3 μ m.

Example 11

This example is directed to the preparation of synthetic polybis(carboxylatophenoxy)phosphazene (PCPP) gas-filled vesicles targeted to the GPIIb/IIIa receptor.

PCPP-PEG2000-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val will be prepared utilizing the procedure described above in Example 5. PCPP vesicles will then be prepared as described as in U.S. Patent No. 5,487,390, the disclosures of which are hereby incorporated by reference herein, in their entirety. The PCPP vesicles (100 mg) will be added to 1 mL of a Na₂CO₃ solution (30 mg/mL) and will be dissolved by stirring overnight at room temperature. The solution will be diluted with phosphate-buffered saline (pH 7.4) to provide a final polymer concentration of 2.5% (w/v) and a solution pH of 7.4. The pH will be adjusted, as needed, with 1N HCl.

A solution of PCPP (2.5% w/v) containing 0.2% Tween 20 will be mixed with perfluoropropane gas in a colloid mill to produce a gassed PCPP solution that is stable for several hours. Ten mole % of the PCPP utilized in the solution will be PCPP-

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 150 -

PEG2000-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val. The gassed solution will be extruded from a syringe pump at 150 $\mu\text{L}/\text{min}$ into an air-atomizing device under an atmosphere of perfluoropropane gas and sprayed into a pan containing 250 mL of a 7.5% CaCl_2 solution containing 0.5% Tween 20. Upon contact with the CaCl_2 solution, PCPP will be crosslinked by the divalent calcium ions to produce a relatively homogeneous population of spherical gel vesicles, targeted to the GPIIb/IIIa and filled with perfluoropropane. The presence of entrapped perfluoropropane will be demonstrated by observation of the vesicles using an inverted microscope.

Example 12

This example is directed to the preparation of a vesicles targeted to the GPIIb/IIIa receptor formulated from a fluorinated lipid.

The amino group in α -amino, ω -carboxy-PEG3400 (Shearwater Polymer, Huntsville, AL) will be protected by dissolving one equivalent of the α -amino, ω -carboxy-PEG3400 in a solution of water:dioxane (1: 1, v:v). To this stirring solution will be added one molar equivalent each of t-Boc-anhydride (Bachem, Gardena, CA) and triethylamine (Aldrich Chemical, Milwaukee, WI). The resulting solution will be stirred overnight and concentrated *in vacuo* to remove the volatile dioxane. To concentrated material will be added ten volume equivalents, relative to water, of ethyl acetate and the resulting mixture will be cooled with an ice bath. The pH of the mixture will be adjusted to pH 2 with aqueous 2N sulfuric acid, and the lower aqueous layer will be removed using a separatory funnel. The ethyl acetate layer will be washed with saturated brine, dried (MgSO_4), filtered, and concentrated *in vacuo* to afford a syrup.

The t-BOC- α -amino, ω -carboxyl PEG3400, one molar equivalent of diisopropylcarbodiimide (DIC) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) and dry DMF will be combined. The solution will be stirred and one equivalent each of diisopropylethylamine (DIEA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), hydroxybenzotriazole (HOBT) and 1,2-di-(15,16,17,18-nonafluoro)stearoyl-phosphatidylethanolamine (fluoro-DSPE) will be added. The resulting solution will be stirred for 2 hours and concentrated *in vacuo*. The fluoro-DSPE-t-BOC- α -amino, ω -amido PEG3400 will be suspended in a solution of trifluoroacetic acid and CH_2Cl_2 (4:6, v:v), followed by stirring an additional 20 minutes. The solution will then be neutralized with DIEA and concentrated *in vacuo*. The product will be resuspended in CH_2Cl_2 and aqueous

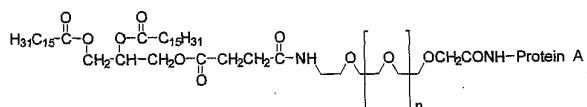
WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 151 -

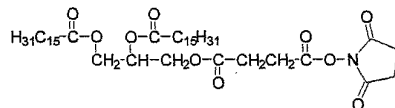
HCl will be added to a pH of about 2. The aqueous layer will be separated and the pH readjusted to pH 10 with 1.0% NaOH. To the aqueous mixture will be added ethyl acetate which will be separated, washed with saturated brine, and dried (MgSO_4). Filtration and concentration *in vacuo* will provide the fluoro-DSPE α -amino, ω -amido PEG3400 as a yellow oil.

The yellow oil obtained above, one equivalent of N-bromosuccinimide (NBS), (Sigma Chemical, St. Louis, MO) and DMF will be combined. The resulting mixture will be stirred for 3 hours and concentrated *in vacuo* overnight. The concentrated material will be suspended in phosphate-buffered saline at a pH of 7. The peptide Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS), which is targeted to the GPIIb/IIIa receptor, will be added to the suspension. After stirring overnight, the reaction mixture will be concentrated with an Amicon filter concentrator (Amicon, Beverly, MA) to a volume of ~300 mL. The concentrated solution will be purified by size exclusion chromatography to yield the fluoro-DSPE- α -amino, ω -amido PEG3400-Arg-Gly-Asp-Ser. This product will be added to a mixture of DPPC and DPPA to provide a ratio of DPPC:fluoro-DSPE:DPPA of 40:54:6, w:w:w. This lipid mixture will be added to a diluent comprising normal saline:glycerol:propylene glycol (8:1:1, v:v:v) to provide a final lipid concentration of 1 mg/mL of diluent. An aliquot of this solution will be introduced into a 2 mL vial (Wheaton Industries, Chicago, IL) and the headspace will be filled with perfluoropropane. The vial will be agitated on an ESPE Capmix (ESPE, Seefeld, Germany) at 4300 rpm for 1 minute to yield the fluorinated vesicle targeted to the GPIIb/IIIa receptor.

Example 13

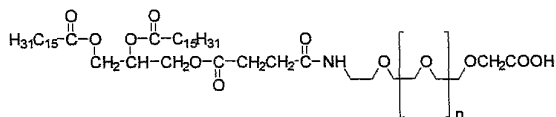
This example is directed to the preparation of N-(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-succinyl)-PEG-Protein A conjugate, which has the following formula.

• • • • •



5 acetonitrile (10 mL). The resulting mixture was stirred for 5 hours. The solid material which formed during the reaction (dicyclohexylurea) was removed by filtration and the filtrate was concentrated *in vacuo* to yield 78 mg of N-DPGS-succinimide as a white product.

10 dipalmitoyl-sn-glycerol (DPGS- ω -carboxy-PEG).



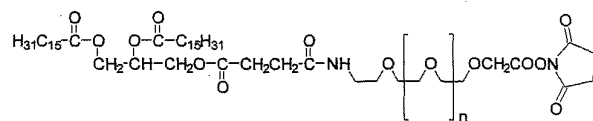
15 10°C. After stirring overnight, the reaction mixture was poured into ice water and neutralized with 10% HCl to a pH of about 3 or less. The lower organic layer was removed using a separatory funnel and washed three times with water. The organic layer was collected and dried (NaSO₄). Filtration and concentration *in vacuo* yield 0.34 g of DPGS-co-carboxy-PEG as a white solid.

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 153 -

C. Preparation of 3-succinamoyl-oxy-carbonyl-polyethyleneglycol-imino-succinate-1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol (DPGS- ω -carboxy-PEG-succinimide).



To a cooled (0 to 5°C) solution of DPGS- ω -carboxy-PEG (200 mg) from Step B, N-hydroxysuccinimide (6 mg), DMAP (2 mg) and acetonitrile (40 mL) in a 250 mL round bottom flask was added dropwise a solution of DCC (12 mg) in acetonitrile (10 mL). The resulting mixture was stirred for 5 hours and the white solid which formed (dicyclohexylurea) was removed by filtration. The filtrate was concentrated *in vacuo* to afford 200 mg of DPGS- ω -carboxy-PEG-succinimide as a white solid.

D. Preparation of DPGS-PEG-Protein A conjugate.

To a cooled (5 to 10°C), stirred solution of Protein A (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (20 mg) in aqueous buffer (20 mL) at a pH of 8.5 was added dropwise a solution of DPGS- ω -carboxy-PEG-succinimide from Step C (4 mg) and acetonitrile (10 mL). The temperature of the resulting mixture was equilibrated to room temperature and the reaction mixture was stirred for about 48 hours. The mixture was concentrated *in vacuo* and the residual salts were dialyzed away using a dialysis bag having a molecular weight cutoff of about 3500, equilibrated against water. The resulting dialyzed solution was frozen and lyophilized to yield 12 mg of the title material (DPGS-PEG-Protein A conjugate) as a white solid.

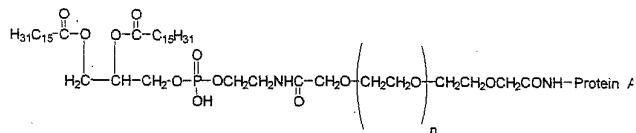
WO 02/36161

PCT/US01/32308

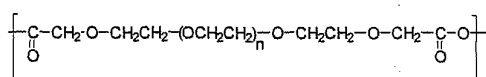
- 154 -

Example 14

This example is directed to the preparation of DPPE-PEG-protein A conjugate, which has the following formula.

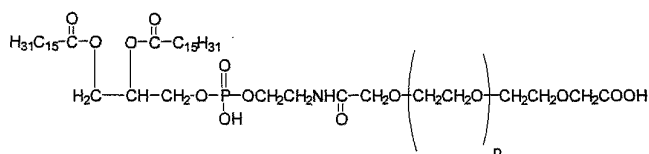


A. Preparation of ω,ω' -dimethylenecarboxy-polyethyleneglycol anhydride.



- 5 To a cooled (0 to 5°C) solution of ω,ω' -dimethylenecarboxy-polyethyleneglycol (0.34 g) and CHCl_3 (20 mL) in a 100 mL round bottom flask was added a solution of DCC (0.02 g) in CHCl_3 (5 mL). This solution was stirred overnight, and the resulting white solid precipitate (dicyclohexylurea) was removed by filtration. The filtrate was concentrated *in vacuo* to provide 0.3 g of the anhydride as a white solid.

- 10 B. Preparation of 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine-N-carboxyl-methylene- ω' -carboxy-polyethyleneglycol (DPPE- ω' -carboxy-PEG).



To a cooled (0 to 10°C) solution of the anhydride from Step A (0.3 g) and CH_2Cl_2 (10 mL) in a 100 mL round bottom flask was added a solution of DPPE (0.07 g) and triethylamine (0.05 g) in CH_2Cl_2 (15 mL). After stirring overnight, the reaction

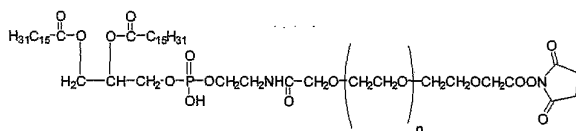
WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 155 -

mixture was poured into ice water and acidified with 10% HCl to a pH of about 3 or less. The bottom organic layer was then separated using a 250 mL separatory funnel and dried (NaSO_4). Filtration and concentration of the CH_2Cl_2 solution *in vacuo* yielded 0.45 g of DPPE- ω -carboxy-PEG as an off-white solid.

- 5 C. Preparation of 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol-3-phosphoethylamine-N-carboxymethylene-polyethyleneglycol-succinimide (DPPE- ω -carboxy-PEG-succinimide).



- To a cooled (0 to 5°C) solution of DCC (3 mg) and acetonitrile (2 mL) was added a solution of DPPE- ω -carboxy-PEG from Step B (60 mg), N-hydroxy-succinimide (1.8 mg) and DMAP (0.2 mg) in acetonitrile (6 mL). After stirring for 3 hours at 0 to 5°C, the temperature of the reaction mixture was equilibrated to room temperature. After stirring overnight, the white solid precipitate which formed (dicyclohexylurea) was removed by filtration, and the filtrate was concentrated *in vacuo* to yield 60 mg of DPPE- ω -carboxy-PEG-succinimide.
- 10

D. Preparation of DPPE-PEG-protein A conjugate.

- To a cooled (5 to 10°C) solution of Protein A (20 mg) in 15 ml aqueous buffer (15 mL) at a pH of 8.5 was added dropwise DPPE- ω -carboxy-PEG-succinimide from Step C (4 mg) in acetonitrile (8 mL). The temperature of the reaction mixture was equilibrated to room temperature and stirring was continued for 48 hours. The mixture was concentrated *in vacuo* and the remaining salts were dialyzed against water using a dialysis membrane having a molecular weight cutoff of about 3500. The aqueous dialyzed sample was lyophilized to yield 15 mg of the title product (DPPE-PEG-protein A conjugate) as a white solid.
- 15
- 20

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 156 -

Example 15

This example is directed to the preparation and use of a targeted vesicle composition for targeting epithelial cells.

A. Preparation of vesicle composition.

5 The DPGS-PEG-Protein A conjugate product from Example 13 (1 % by weight) was combined with a dried lipid mixture of DPPC (82 mole %), DPPA (10 mole %), and DPPE (8 mole %). This dry lipid mixture was hydrated and lyophilized on a Labconco (Kansas City, MO) Lyph-Lock 12 lyophilizer. The lyophilized mixture was resuspended in normal saline:propylene glycol:glycerol (8:1:1) at a lipid concentration of 1
10 mg/mL. The mixture was aliquoted into 2 mL Wheaton vials (Millville, NJ). The vials were capped and the headspace in the vials was replaced with perfluorobutane gas (Flura, Newport, TN). The vials were then shaken for one minute on an Espe Capmix® (Seefeld, Germany) to provide gas-filled vesicles. Rabbit anti-keratin antibody (Calbiochem, San Diego, CA) (100 µL) was added to a sample of the vials and these vials were inverted to
15 mix the antibody with the gas filled vesicles. The vials were incubated at room temperature for about 1 hour. A bicinchoninic acid protein assay (Pierce, Rockford, IL) was performed on the vesicle compositions both before and after washing with PBS. This assay showed that the anti-keratin antibody was bound to the vesicles via Protein A and remained bound during washing.

B. Targeting experiments with the vesicle composition.

20 HeLa cells (an epithelial cervical cancer cell line which express keratin) were plated in flat sided tissue culture tubes (Nunc, Roskilde, Denmark) in EMEM media (Cellgro, Washington, DC). The cells were grown overnight and aliquots of vesicle compositions were added to each tube. The vesicle compositions employed were: (i)
25 vesicles from Example 6; (ii) vesicles prepared in Step A which contained no rabbit anti-keratin antibody; and (iii) vesicles prepared in Step A which contained rabbit anti-keratin antibody. Only the vesicles in (iii), which included the antibody, bind to the HeLa cells.

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 157 -

Example 16

A pegylated lipid will be prepared from distearoylphosphatidyl-ethanolamine (DSPE), (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) and α -amino, ω -carboxy-PEG3400 (Shearwater Polymer, Huntsville, AL). The amino group will be protected by combining in water:dioxane (1:1, v:v) α -amino ω -amido PEG and one molar equivalent each of t-Boc-anhydride (Bachem, Gardena, CA) and triethylamine (Aldrich Chemical, Milwaukee, WI). The resulting solution will be stirred overnight and the dioxane will be removed *in vacuo*. To the aqueous residue will be added ten volume equivalents, relative to water, of ethyl acetate (Mallincrodt, St. Louis, MO), and this mixture will be cooled in an ice bath. The pH will be adjusted to pH 2 with aqueous sulfuric acid (2 N) and the aqueous layer will be separated using a separatory funnel. The ethyl acetate layer will be washed with brine, dried (MgSO_4) and concentrated *in vacuo* to yield a syrup.

The yellow oil, DSPE-t-Boc- α -amino, ω -amido-PEG3400, one molar equivalent of diisopropylcarbodiimide (DIC) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) and dry dimethylformamide (DMF) will be combined. The solution will be stirred and one molar equivalent each of diisopropylethylamine (DIEA), (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) and hydroxybenzotriazole (HOBT) will be added. The solution will be stirred for two hours and concentrated *in vacuo*. The concentrated residue DSPE-t-BOC- α -amino, ω -amido-PEG3400 will be combined with trifluoroacetic acid and methylene chloride (4:6, v:v) and the resulting mixture will be stirred an additional 20 minutes. The solution will be neutralized with DIEA and concentrated *in vacuo*. This residue will be resuspended in methylene chloride and aqueous hydrochloric acid will be added until a pH of 2 is obtained. The aqueous layer will be separated and the pH will be adjusted with 1.0% NaOH to a pH of 10. To this aqueous mixture will be added ethyl acetate which will be separated, washed with saturated brine, and dried (MgSO_4). The ethyl acetate solution will be concentrated *in vacuo* to yield a yellow oil.

To a solution of the yellow oil, DSPE- α -amino, ω -amido-PEG3400 in DMF will be added one equivalent of N-bromosuccinimide (NBS), (Sigma Chemical, St. Louis, MO). After stirring for 3 hours, the reaction mixture will be concentrated overnight *in vacuo*. To a suspension of the resulting concentrated residue in a phosphate-buffered saline (PBS) at a pH of about 7 will be added anti-carcinoembryonic antigen (anti-CEA) which is a monoclonal antibody of mouse/human chimeric origin. After stirring overnight, the solution will be concentrated with an Amicon filter concentrator (Amicon, Beverly,

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 158 -

MA) to a volume of -300 mL. The concentrated solution will be purified by size exclusion chromatography to yield the final product.

Example 17

A vesicle formulation will be prepared by repeating Example 6, except that
5 about 1 nanomole of recombinant human growth hormone will be added to the lipid composition, prior to vesicle formation.

Example 18

Example 17 will be repeated except that the DPPA is replaced with the
cationic lipid dipalmitoylphosphocholine (Avanti) and the DPPC is replaced with the
10 neutral lipid DPPE. This will provide cationic vesicles to which bioactive agents,
especially genetic material, such as the gene for vascular endothelial growth factor
(VEGF), can be bound. The incorporation of a targeting ligand, such as an antinymocardial
antibody lipid conjugate, will provide targeted vesicles which can be directed to the
infarcted and/or ischemic tissue. A burst of high energy ultrasound, for example, 1 MHz
15 continuous wave 200 mW, can be applied with varying pulse duration to promote the
rupture of the vesicles. As a result, the VEGF can be substantially delivered directly to the
infarcted and/or ischemic tissue.

Example 19

This example is directed to the preparation of a vesicle composition
20 targeted for neuroendocrine tumors of the pancreas.

Example 16 will be repeated except that Somatostatin peptide will be
employed instead of anti-CEA. A therapeutic anti-cancer agent, Streptozocin, will also be
incorporated in the vesicle composition. The resulting vesicle composition will be injected
intravenously into a patient who has been diagnosed with a neuroendocrine tumor. The
25 vesicles will be preferentially absorbed in the region of the pancreas proximate the tumor,
thereby resulting in the enhanced delivery of the anti-cancer agent to the tumor.

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 159 -

Example 20

Example 15 was repeated except that, in addition to HeLa cells, the targeted vesicles were also added to an epithelial cell line comprising mouse normal liver cells. Only the vesicles containing the antibodies were bound to the liver cells.

5 Example 21

This example is directed to the preparation and use of a vesicle composition targeted for myocardial cells (cardiomyocytes).

A. Preparation of targeted vesicles.

Example 15 was repeated except that rabbit anti-keratin antibody was
10 replaced with rabbit anti-human skeletal myosin antibody (Biomakor™, Kiryat Weizmann, Rehovot, Israel) (100 µL).

B. Targeting of myocardial cells.

Rat heart myoblasts (American Type Culture Collection, Rockville, MD) were plated in flat sided tissue culture tubes (Nunc, Roskilde, Denmark) in EMEM media
15 (Cellgro, Washington, DC). The cells were grown overnight and aliquots of vesicle compositions were added to each tube. The vesicle compositions employed were: (i) vesicles from Example 6; (ii) vesicles prepared in Step A above which contained no rabbit anti-myosin antibody; and (iii) vesicles prepared in Step A above which contained rabbit anti-myosin antibody. Only the vesicles in (iii), which included the antibody, bind to the
20 myoblast cells.

Example 22

This example is directed to the preparation and use of a vesicle composition targeted for myocardial cells (cardiomyocytes).

A. Preparation of targeted vesicles.

Example 15 was repeated except that rabbit anti-keratin antibody was
25 replaced with rabbit anti-myosin (skeletal) antibody (Accurate Chemical, Westbury, NY) (100 µL).

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 160 -

B. Targeting of myocardial cells.

H9C2, a rat cardiac myocyte line which expresses cardiac myosin, was employed. (Skeletal muscle myosin and cardiac muscle myosin are substantially similar.) The control cell line was INT407, which is a human intestinal cell line. The cells were plated in flat sided tissue culture tubes (Nunc, Roskilde, Denmark) in EMEM media (Cellgro, Washington, DC). The cells were grown overnight and aliquots of vesicle compositions were added to each tube. The vesicle compositions employed were: (i) vesicles from Example 6; (ii) vesicles prepared in Step A above which contained no rabbit anti-myosin antibody; and (iii) vesicles prepared in Step A above which contained rabbit anti-myosin antibody. Three experimental cell types were employed: (a) INT407; (b) H9C2; and (c) H9C2 that was exposed to 10% glucose for 10 minutes to shock the cells and open pores to allow binding of the antimyosin to the cytoplasmic myosin. No binding was observed with vesicle compositions (i) or (ii) in any of cell types (a), (b) or (c). Vesicle composition (iii) also did not bind to cell type (a). Some binding of vesicle composition (iii) to cell type (b) was observed, whereas substantial binding of vesicle composition (iii) to cell type (c) was observed.

Example 23

Dipyridamole (*see, e.g., The Merck Index*, 10th Ed., p. 489 (1983)) is a bioactive agent in the context of the present invention in that it is a coronary vasodilator. Dipyridamole is also a targeting ligand within the context of the present invention since it can bind to one or more receptors in heart tissue, and can also be attached to phospholipids to provide membrane compatible derivatives. Specifically, N-succinyl-DPPE will bind with dipyridamole using dicyclohexylcarbodiimide and a catalyst as a condensation agent to form N-dipyridamoly succinate-DPPE. This lipid bound dipyridamole derivative will be employed in a lipid composition for the preparation of vesicles for targeting heart tissue.

Example 24

A balloon catheter will be placed percutaneously via a femoral arterial access into the left circumflex coronary artery of a laboratory animal. The balloon will be inflated for a period of three hours, preventing blood flow to the anterolateral myocardium and resulting in a myocardial infarction. Echocardiography will be performed with a 5 MHz transducer and will reveal a persistent wall motion abnormality, as well as

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 161 -

myocardial thinning of the anterolateral wall of the left ventricle. The balloon will be deflated and a dose of 30 $\mu\text{L/Kg}$ of anti-cardiomyosin antibody labeled vesicles similar to those prepared, for example, in Step A of Example 22, filled with dodecafluoropentane gas will be injected intravenously. Echocardiography will be performed thirty minutes after
5 injection. Imaging will show an area of increased echogenicity in the anterolateral wall corresponding to the region of the infarct. The periphery of the infarct (reperfused region) appears brightest with less intensity centrally (region of persistent absence of flow). In comparison, the central ventricular cavity is relatively dark, with a majority of the vesicles having been cleared by this time.

10 **Example 25**

A patient suffering from chest pains will be admitted to the emergency room of a hospital. An ultrasound study will be performed and will indicate a wall motion abnormality in the anterior wall of the left ventricle. The patient will be administered a dose of 5 $\mu\text{L/Kg}$ of anticardiomyosin antibody labeled vesicles similar to those prepared,
15 for example, in Step A of Example 22, filled with perfluorobutane gas. Ten minutes after administration, ultrasound imaging will be repeated and will show an area of increased echogenicity in the left ventricle anterior wall. This will confirm the diagnosis of myocardial infarction, and the patient will be treated with tissue plasminogen activator.

Example 26

20 A patient will undergo a stress echocardiography examination to diagnose the presence or absence of coronary artery disease. During peak exercise, the patient will be administered 5 $\mu\text{L/Kg}$ of perfluoropropane filled vesicles labeled with dipyrindamole as described in Example 23 above. The dipyrindamole will be combined with the vesicles through the use of (a) a bifunctional linking group; (b) a small spanning molecule; (c) a
25 Schiff's base with or without reductive amination; or (d) a maleimidyl linker. The vesicles will bind to perfused regions of myocardium. As the background vesicles clear, which takes about 5 minutes, the labeled vesicles will persist within the myocardium. Delayed imaging will show the ischemic myocardium affected by coronary artery disease (CAD) as a hypointense region surrounded by bright, normally perfused myocardium. The absence
30 of any appreciable background vesicles within the cardiac chambers eliminates the problem with shadowing and facilitates making the diagnosis of CAD.

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 162 -

Example 27

This example demonstrates the targeted expression of a protein using a vesicle composition and methods within the scope of the present invention.

Three Sprague-Dawley rats, identified herein as rats (A), (B) and (C), were anesthetized with Ketamine acepromazine. pSV β -gal, a plasmid containing the β -galactosidase gene with the SV40 promoter and enhancer genes, was combined with the cationic lipid compound prepared in Example 2. The plasmid and cationic lipid compound mixture was incubated for 15 minutes at room temperature. cGMP and the resulting incubated material was then added to a blend of DPPC, DPPA and DPPE-PEG5000 at a respective mole % ratio of 82:10:8 in normal saline:glycerol:propylene glycol (8:1:1). Vesicles were prepared by shaking the resulting mixture on a WIG-L-BUG™ for one minute at 3200 rpm. The resulting vesicle composition was injected into rats (A), (B) and (C). The dosages were as follows.

<u>Rat</u>	<u>Dose pSVBgal (ug)</u>	<u>Dose Cationic lipid (ug)</u>
(A)	5	30
(B)	5	30
(C)	25	150

During injection of the vesicle composition, Rats (B) and (C) were exposed to ultrasound energy from a therapeutic ultrasound machine (1.0 Mhz, Rich-Mar model 25, Rich-Mar Corporation, Inola, OK). The ultrasound was directed towards the inside of the left hind leg during the injection and for one minute post flush. Rat (A) did not receive any ultrasound treatment. After 48 hours, the rats were euthanized by asphyxiation with CO₂. The left and right leg muscle and skin were removed from each rat. The hearts, livers and kidneys were also removed. The excised tissues were fixed for 72 hours in 2% formalin. After fixing, the presence of β -galactosidase activity was assayed by soaking the tissue in a solution containing X-gal, potassium ferrocyanide and potassium ferricyanide. The tissues were stained, inspected and photographed. Expression was seen broadly dispersed throughout the leg tissues, particularly in the endothelial cells, muscle and skin, in rat (A). Inspection of the excised tissues from rat (B) showed expression in similar cell types but only at the site of ultrasound application. Rat (C) showed a point expression in the target leg and dispersed expression in the leg not targeted.

Example 28

This example is directed to the preparation of various lipid compositions.

DPPC, DPPA and DPPE-PEG5000 were blended at a respective mole ratio of 82:10:8. This lipid mixture is referred to herein as Composition (A). A portion of Composition (A) was mixed with the cationic lipid compound prepared in Example 2 at a 10:1 (w/w) ratio in distilled deionized water. This latter mixture is referred to herein as Composition (B). Compositions (A) and (B) were introduced into 1 ml serum vials. The vials were evacuated with a Sargent Welch vacuum pump (Skokie, IL) and the headspaces were replaced with perfluoropropane gas (Fluor Chemical Corp, Newport, TN). The vials were agitated with a Crescent Dental WIG-L-BUG™ 3110B (Lyons, IL) mechanical shaker. After shaking, heparin (Elkin Sinns Inc., Cherry Hill, NJ) was added to a portion of the vials at an approximate molar ratio of lipid to heparin of 5:1. The mixture of heparin and Composition (A) are referred to herein as Composition (C). The mixture of heparin and Composition (B) are referred to herein as Composition (D).

Recombinant human basic fibroblast growth factor (BFGF) (Sigma, St. Louis, MO) was then added to Compositions (A), (B), (C) and (D), which are respectively referred to herein as Compositions (E), (F), (G) and (H). The BFGF was added to the compositions which contained heparin (Compositions (C) and (D)) at a molar ratio of 5:1 (BFGF:heparin). At least three samples from each of Composition (A) to (H) were sized using an Accusizer 770 (Particle Sizing Systems, Santa Barbara, CA). Sizing showed no difference in the sizes of vesicles in Compositions (A) to (G). However, the vesicles in Composition (H), which contained cationic lipid, heparin and BFGF, had a smaller mean size.

Compositions (E) to (H) were then analyzed using a native polyacrylamide gel (protein gel PAGE mix, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) to identify binding properties of heparin and BFGF. The gel was run on a Hoefer SE400 slab gel apparatus (Hoefer Scientific, San Francisco, CA). The gel was run at a constant current using an electrophoresis power supply (MBP300, IBI, Rochester, NY). The gel was then stained using a rapid Coomassie blue (Eastman Kodak, Rochester, NY) staining method and analyzed visually. Gel electrophoresis confirmed that in Composition (H), the presence of the cationic lipid enhances binding of heparin as well as the BFGF. It is contemplated that the heparin, which is anionic, binds to the cationic lipid, and that the BFGF, which is

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 164 -

cationic, binds to the heparin. bFGF in compositions which contain no heparin and cationic lipid migrates during electrophoresis.

Example 29

Example 16 will be repeated, except that vascular endothelial growth factor (VEGF) will be employed instead of anti-CEA antigen.

Example 30

DPPC, DPPA and DPPE-PEG5000 will be combined in a mole percent ratio of 82:10:8 in saline:propylene glycol:glycerol (8:1:1, w/w/w). The total concentration of lipids in the solution will be 1 mg/mL. Recombinant human growth hormone will be added to this mixture at a concentration of 10% by weight, relative to the total weight of lipids. An aliquot (1.5 mL) of this mixture will be placed in a 3 mL volume glass vial and the headspace of the vial will be exchanged with perfluoropropane gas. The vial will be sealed and shaken, resulting in gas filled vesicles which bind human growth hormone and which will be useful for targeting endothelial cells. The mean diameter of the vesicles will be about 3 μ m.

Example 31

Distearoylphosphatidylglycerol (DSPG) and DPPE-PEG 5000 will be combined in sterile water at a molar ratio of 92:8. The concentration of lipid will be about 1 mg/mL. Chitosan will be derivatized with 10 mole percent by weight of basic fibroblast growth factor (bFGF) using amide bonds to attach the amine groups of the chitosan to carboxyl moieties of the bFGF. The derivatized chitosan will be added to the lipid suspension in an amount to provide a substantially equivalent concentration of cationic groups in the chitosan and anionic groups in the DSPG. An aliquot of this mixture (1.5 mL) will be placed into a 3 mL vial and the headspace will be replaced with perfluorobutane. The vial will be sealed and shaken on an ESPE Capmix (Seefeld, Germany) to provide gas-filled vesicles useful for targeting endothelial cells.

Example 32

A pegylated lipid will be prepared from DSPE and α , ω -bis(carboxymethyl)-PEG2000 (Shearwater Polymers, Huntsville, AL) to provide MeO₂C-

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 165 -

PEG-DSPE. This lipid will be purified by column chromatography (silica gel) to provide the free acid (HO₂C-PEG-DSPE), after which VEGF will be linked to the free carboxyl group. DPPC, DSPA, DSPE-PEG and DSPE-PEG-VEGF will be combined, at a molar ratio of 82:10:6:2, in saline:glycerol:propylene glycol (8:1:1, w/w/w), at a total lipid concentration of 1.5 mg/mL. An aliquot of this mixture (1.5 mL) will be placed into a sterile 3 mL vial and the headspace of the vial will be replaced with perfluoropentane gas at 30°C and the vial will be sealed. The vial will be shaken at 30°C for about 90 seconds at 3,200 rpm on an ESPE Capmix (Seefeld, Germany) resulting in perfluoropentane gas filled targeted vesicles.

10 **Example 33**

DSPC, cholesterol and DPPA will be combined, at a mole percent ratio of 65:27:8, in a solution of saline:propylene glycol:glycerol (8:1:1 w/w/w). The total lipid concentration will be 5 mg/mL. An aliquot of this mixture (1.5 mL) will be placed in a sterile vial and the headspace will be replaced with perfluorobutane gas. The vial will be sealed and shaken for about 5 minutes on an ESPE Capmix (Seefeld, Germany) to provide a vesicle composition within the scope of the present invention. A Watanabi rabbit which had been fed a high cholesterol diet, will be administered i.v. a dose of 0.10 mL/Kg of the vesicle composition. Ultrasound imaging will be performed about 25 minutes after administration and will show that the vesicles accumulated in regions of endothelial cells affected by atherosclerotic plaque. This will illustrate that the vesicle compositions of the present invention are useful in detecting atherosclerotic regions of endothelial cells.

Example 34

Example 33 will be repeated except that among the lipids used will be cholesterolamine linked covalently via an amide linkage to DPPE-PEG-carboxylate. The lipid mixture will then comprise DPPC, DPPE-PEG5000, DPPE-PEG-cholesterolamine and DPPA which will be combined at a mole percent ratio of 82:7:1:10.

Example 35

Example 33 will be repeated except that the lipid concentration will be increased to about 5 mg/mL and the suspending medium will comprise a solution of normal saline, trehalose (10 mg/mL) and pluronic F-68 (10 mg/mL). This suspension of

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 166 -

lipids will be microemulsified using a Microfluidizer (Microfluidics, Newton, MA) at 16,000 psi for a total of ten passes. The resulting vesicle composition will be lyophilized and the headspace of the lyophilization chamber will be restored gradually to ambient pressure over a period of 72 hours by slowly instilling perfluorobutane gas. The resulting

5 gas-filled lyophilized vesicles will be stored as a dry powder until use.

Example 36

Example 35 will be repeated except that the lipid concentration will be increased to about 25 mg/mL, and the suspending medium will comprise a solution of normal saline, sorbitol (20 mg/mL) and pluronic F-68 (20 mg/mL). The lipid suspension

10 will be cooled to 4°C and to this mixture will be added perfluoropentane to provide a perfluoropentane concentration of 8 µL per mL of solution. This mixture will be passed through a microfluidizer maintaining the temperature at 4°C for 20 passes at 16,000 psi. This will provide a vesicle composition of perfluoropentane-filled vesicles. This composition will be injected i.v. into a patient and will form gas filled vesicles *in vivo*

15 useful for targeting endothelial cells. Gas-filled vesicles can also be obtained prior to i.v. injection by warming the vesicle composition to above about 30°C and shaking, for example, on an ESPE Capmix (Seefeld, Germany) or other shaker or amalgamator device, or by withdrawing the plunger of a syringe which is filled with the composition of perfluoropentane-filled vesicles so as to decrease the pressure and convert the

20 perfluoropentane liquid into perfluoropentane gas.

Example 37

12-Hydroxydodecanoic acid will be esterified with methacryloyl chloride and the ester will be converted to the anhydride to yield 12-(methacryloyloxy)dodecanoic anhydride. L-alpha-Glycerophosphocholine derived from egg lecithin will

25 be acylated with the 12-(methacryloyloxy)dodecanoic anhydride to yield bis[12-(methacryloyloxy)dodecanoyl]-L-alpha-phosphatidylcholine (1). Enzymatic hydrolysis of (1) with phospholipase A₂, derived from crude rattlesnake venom (*Crotalus adamanteus*), will be followed by acylation with palmitoyl anhydride to yield 1-[2-(methacryloyloxy)dodecanoyl]-2-palmitoyl-L-alpha-phosphatidylcholine (2).

30 The above (2) will be combined with normal saline at a lipid concentration of 3 mg/mL. To this mixture will be added DSPE-PEG-VEGF at a concentration of 0.30

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 167 -

mg/ml. An aliquot of the mixture (1.5 mL) will be placed in a sterile 3 mL vial. The headspace of the vial will be evacuated and replaced with perfluoropropane gas and the vial will be sealed and wrapped with light impermeable foil. The vial will be shaken for about 3 minutes on an ESPE Capmix (Seefeld, Germany) to provide gas-filled vesicles.

- 5 The foil will be removed and the vesicle composition will be irradiated with light (254 nm) to provide polymerized gas-filled vesicles bearing VEGF for targeting endothelial cells.

Example 38

Example 37 will be repeated, except that lipid (2) will be combined with DSPE-PEG (see Example 8). VEGF will be admixed with this lipid mixture prior to shaking on the ESPE Capmix (Seefeld, Germany) rather than being covalently attached to the DSPE-PEG. After photopolymerization, the VEGF will be embedded directly into the polymeric lipid membranes which coat the vesicles.

Example 39

- 15 This example is directed broadly to the preparation of albumin vesicles which are internally crosslinked and which comprise surfaces that are modified by the attachment of polyoxy(C₁₄) alkylene chains as described in Published International Application WO 95/00126, the disclosures of which are hereby incorporated by reference, in their entirety. The termini of the alkylene chain modifiers will contain a reactive group, unlike the termini of the alkylene chains in WO 95/00126, which are ether groups. The
- 20 reactive groups will be included for binding an endothelial targeting ligand.

Example 39A

- An aqueous solution of 5% human bovine serum albumin (5 mL) will be introduced into an ultrasonic reaction vessel at a speed of 500 mL/min. The mixture will be sonicated using a Sonifier B-30 (Branson, FRG) for about 15 minutes at an energy flux
- 25 of 100 Watt/cm². The temperature will be maintained at 22°C by refrigeration of the reaction vessel. If desired, a bioactive agent, such as a drug, may be included in this mixture. Crosslinking will be initiated by adding to the albumin solution a solution of CH₂Cl₂ (0.2 mL) saturated with glutaraldehyde. The resulting solution will be stirred for about 1 hour. After washing with methanol, followed by acetone and finally with n-
- 30 hexane, the crosslinked albumin vesicles will be obtained as a brown powder which will be

dried under vacuum for about 24 hours. The size of the resulting vesicles will be determined by a Nicomps laser light particle scattering system at approximately 200 nm.

Example 39B

- Albumin vesicles having a larger diameter than the vesicles prepared in
- 5 Example 39A will be prepared by replacing the high intensity emulsifying process with a 4 bladed impeller and using higher concentrations of albumin, for example, from about 10 to about 25%. Crosslinking will be carried out as described above in Example 39A.

Example 39C

- This example is directed to the preparation of gas-filled albumin vesicles.
- 10 Albumin vesicles will be prepared by placing 5 mL of 5% albumin in a sterile vial and filling the headspace of the vial with perfluorobutane gas. The vials will be shaken for about 5 minutes at 3,300 rpm on an ESPE Capmix (Seefeld, Germany). Crosslinking will be carried out as described above in Example 39A.

Example 39D

- This example is directed to the preparation of gas-filled albumin vesicles.
- 15 Albumin vesicles will be prepared by sonicating a vial containing a 5% solution of human serum albumin and a headspace of perfluoropropane gas. This sonication will involve immersing minimally the sonicator horn tip into the liquid interface for about 5 minutes at medium power setting (Heat Systems Probe, Farmingdale, NY).
- 20 The albumin vesicles will be crosslinked as described above in Example 39A.

Example 39E

This example is directed to coupling heterobifunctional PEG to the albumin vesicles prepared above.

- The α carboxy group of α -amino, α -carboxy-PEG5000 (Shearwater
- 25 Polymers) will be protected with a suitable ester functionality, for example, a benzyl ester. The amino group of the PEG will be bonded covalently to the albumin vesicles to provide a 10:1 weight ratio of albumin to PEG by activating the appropriate amino acid moieties on the protein, such as, for example, the aspartic acid or glutamic acid moiety, with 1,1'-carbonyldiimidazole. After covalent bonding of the PEG to the albumin via an amide

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 169 -

linkage, the benzyl ester group will be removed. aFGF will be attached to the free carboxyl group by activating the carboxylate end of the PEG with 1,1-carbonyldiimidazole. This provides the endothelial targeting ligand bound to the albumin vesicles via the PEG linkers.

5 Alternatively, coupling may be accomplished by activating the appropriate amino acids of aFGF, for example, aspartic acid or glutamic acid, with carbonyldiimidazole, followed by the addition of carboxyl group protected α -amino, ω -carboxy-PEG. The protected carboxyl group will be deprotected, and the unprotected carboxyl group will be activated with carbonyldiimidazole. The activated aFGF-PEG will
10 be combined and reacted with the albumin vesicles.

Gas will be instilled into the vesicles by careful dehydration of the vesicles under vacuum and gradual restoration to ambient pressure using a gas, such as perfluorobutane. One or more surfactants, for example, pluronic F-68, may be added prior to the dehydration and gas instillation step.

15 Example 40

This example is directed to the preparation of gas filled clathrates.

The ω carboxy group in α -hydroxy, ω -carboxy-PEG2000 will be protected with a suitable ester functionality, for example, a benzyl ester. The protected compound will be reacted with one equivalent of POCl_3 in Et_3N and CHCl_3 at $0-5^\circ\text{C}$ to convert the
20 hydroxy group to the phosphorous chloride ester. This compound will then be reacted with excess NaHCO_3 to produce the corresponding sodium phosphate ($\text{PEG-PO}_3\text{Na}_2$). This salt will be acidified with HCl , pH 3.0, to provide the corresponding acid ($\text{PEG-PO}_3\text{H}_2$). This product will be dialyzed against purified water using a membrane having a molecular weight cutoff of about 100.

25 After dialyzing, the above phosphoric acid product (2 g) will be combined with disodium dihydrogen pyrophosphate ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$) (8 g) in water (100 mL). This solution will be introduced into a Buchi spray drying apparatus and spray dried. The resulting particles will be baked at 120°C under vacuum for about 1 hour to provide hollow PEG-coated pyrophosphate vesicles. These vesicles will be resuspended in an
30 aqueous medium and the benzyl protecting group will be removed. The deprotected carboxyl group of the PEG will be activated with 1,1-carbonyldiimidazole and the resulting compound will be coupled to a monoclonal antibody for ELAM for targeting endothelial

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 170 -

cells. To an aqueous medium containing the targeted vesicles will be added DDPC and pluronic F-68 to provide a concentration of 1 mg/mL and 5 mg/mL, respectively. The aqueous medium containing the vesicles will be heated to about 45°C, agitated gently by hand and dried under vacuum using a rotary evaporator while maintaining this temperature.

- 5 The resulting dried material will be introduced into a suitable container and lyophilized. Perfluorobutane gas will be instilled gradually in the headspace of the container over a period of about 48 hours until ambient pressure is achieved. The resulting gas filled pyrophosphate clathrates will be stored as a lyophilized powder until use.

Example 41

- 10 A 0.25 M Ca^{2+} solution will be prepared by dissolving $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (3.68 g) in distilled water (100 mL). The pH of this solution will be adjusted to pH 11 using 0.1 M NaOH. A 0.74 M solution of potassium dihydrogenphosphate (KH_2PO_4) will be prepared by dissolving 0.75 g of the salt in distilled water (10 mL). To this solution will be added 1.75 g of bifunctional PEG, α -phenylcarboxy ester, ω -phosphoryl-PEG5,000. The pH will
- 15 be adjusted again with 0.1 M NaOH to pH 11. The potassium dihydrogenphosphate/PEG phosphate solution will be added dropwise to a vigorously stirred solution of CaCl_2 . The resulting precipitate will be sized by single particle optical sizing and by optical microscopy. The diameter of the particles will be in the range of about 1 to 2 μm . The particles will be filtered and resuspended in normal saline and the phenyl group will be
- 20 removed from the carboxy group. The carboxy group will be activated with 1,1-carbonyldiimidazole and this will be reacted with a monoclonal antibody specific for ELAM. The monoclonal antibody may be prepared by conventional techniques according to the methods of Kohler and Milstein, *Nature* 1975, 256:495, the disclosures of which are incorporated herein by reference, in their entirety. The particles will be suspended in a
- 25 solution of pluronic F-68 (20 mg/mL) and this suspension will be introduced into a suitable container and lyophilized. The headspace of the container will be equilibrated gradually to ambient pressure with perfluoropropane gas to provide the hydroxyapatite gas clathrates.

Example 42

- In vivo* experiments in rats were conducted which demonstrate the high
- 30 effectiveness of the cationic lipid compounds of Example 3 to deliver genetic material intracellularly. The experiments demonstrate also the effectiveness of using ultrasound

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 171 -

energy for targeting specific tissue *in vivo* with vesicle compositions containing genetic material. Plasmid pSV β -gal (Promega, Madison, WI), which contains the β -galactosidase gene, and the cationic lipid compound prepared in Example 3 were combined by mixing. The resulting mixture was injected into each of three Sprague Dawley rats (rats (A), (B) and (C)) via the tail vein. Rat (A) was not subjected to ultrasound. Ultrasonic energy was applied to the inside of the hind leg during injection for each of rats (B) and (C). After 48 hours, the rats were euthanized and the tissues were removed. The tissues were fixed for 72 hours in 2% formalin, sliced thin and placed in an X-gal solution. After 16 hours at 37°C, the tissues were inspected. The tissue from rat (A) exhibited a blue color which is indicative of general transfection. The tissue from rats (B) and (C) exhibited blue color only at the site where ultrasound energy was applied. This indicates that localization of gene expression can be achieved with the compounds and methods of the present invention.

Example 43

Fresh human blood was applied to gauze strips (Tillotson Health Care, Bedford, NH) and allowed to clot. Tygon tubing was cast into a 1% agarose (Boehringer Mannheim Biochemical, Indianapolis, Indiana) standoff pad. The strips bearing the blood clots were inserted into the Tygon tubing. Inline mixing elements (Cole-Parmer, Chicago, IL) were also inserted into the tubing to create a turbulent flow. Phosphate buffered saline (Boehringer Mannheim Biochemical) was pumped across the gauze strip using a MasterFlex peristaltic pump (Cole-Parmer). Ultrasound imaging was carried out using an Acoustic Imaging 5200 ultrasound machine with a 7.5 MHz peripheral vascular transducer (Phoenix, AZ). The transducer was fixed to a ring stand and imaging was carried out from underneath the standoff pad. After the unbound clot was washed from the strip, 1 mL each of a targeted vesicle composition which targets GPIIb/IIIa and the vesicle composition from Example 6 (non-targeted) was injected into the PBS stream at a flow rate of approximately 2 mL/min. The vesicles were allowed to bind at this speed for 2 minutes and then the flow rate was turned up to 6 mL/min to remove unbound vesicles. After washing at 6 mL/min, the targeted vesicles were bound to the gauze strip, while the non-targeted vesicles were washed away. Ultrasound imaging revealed increased echogenicity in the clot with vesicles targeted to GPIIb/IIIa.

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 172 -

Videodensitometric analysis was performed offline using a Macintosh 660 AV computer (Apple Computing, Cupertino, CA). The entire area of the clot was selected and the videodensitometry units were measured. The images were captured and analyzed using Image 1.55 (National Institutes of Health, Washington, DC). This analysis involved collecting and superimposing the pre-contrast baseline image with the post-contrast image, and subtracting the pre-contrast image from the post-contrast image. This collection, superimposition, and subtraction were also conducted before and after washing to remove unbound vesicles. The videodensitometric analysis was conducted using both continuous and intermittent ultrasound. The data obtained in this analysis is set forth in the following table, wherein higher numbers represent improved contrast.

TABLE 4
Videodensitometric Analysis of Targeted Vesicles-
Ultrasound Backscatter Quantitation

CONTINUOUS IMAGING				
	<i>Targeted Vesicles (before wash)</i>	<i>Non-Targeted Vesicles (before wash)</i>	<i>Targeted Vesicles (after wash)</i>	<i>Non-Targeted Vesicles (after wash)</i>
	28.46	17.64	46.01	16.5
	18.44	13.36	39.48	14.44
	14.44	7.62	17.22	7.58
	40.94	16.97	32.85	12.95
	22.86	6.81	19.52	8.08
Mean	25.57	13.9	33.89	12.87
StDev	11.82	4.59	12.34	3.81
INTERMITTENT IMAGING				
	<i>Targeted Vesicles (before wash)</i>	<i>Non-Targeted Vesicles (before wash)</i>	<i>Targeted Vesicles (after wash)</i>	<i>Non-Targeted Vesicles (after wash)</i>
	16.6	12.06	17.83	12.14
	15.47	16.55	20.35	13.7
	19.32	16.13	21.79	16.35
	20.12	--	22.41	8.68

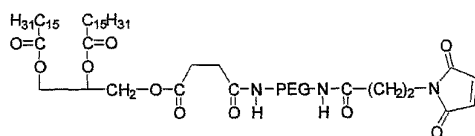
TABLE 4
Videodensitometric Analysis of Targeted Vesicles-
Ultrasound Backscatter Quantitation

	17.29	13.7	24.15	13.41
Mean	17.88	14.91	20.6	12.72
StDev	2.2	2.48	2.04	3.2

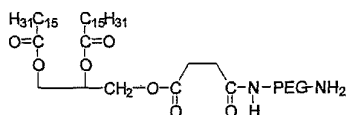
Inspection of the above table reveals increased backscatter from the targeted vesicles as compared to the non-targeted vesicles. T-tests were conducted which demonstrated a significant increase in videodensity signals for the targeted vesicles as compared to the non-targeted vesicles in both continuous and intermittent imaging $p < 0.01$.

Example 44

This example is directed to the preparation of DPGS-NH-PEG-NH-maleimide, which has the following formula.



10 A. Preparation of dipalmitoyl glycerol succinate-polyethyleneglycol-amine (DPGS-NH-PEG-NH₂).



Into a round bottom flask (100 mL) was added a solution of DPGS (98 mg, 0.147 mmole, 1 eq.) in CH₂Cl₂. Into a separate round bottom flask (100 mL) was added a solution of H₂N-PEG-NH₂ (PEG-diamine) (50 mg, 0.147 mmole, 1 eq.) in CH₂Cl₂. To the PEG-diamine solution was added immediately a solution of DCC (31 mg, 0.15 mmole,

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 174 -

1.02 eq.) in CHCl_3 (5 mL). The resulting mixture of DCC and PEG-diamine was added dropwise to the DPGS at about 0 to about 5°C. The resulting reaction mixture was equilibrated with stirring to room temperature. After stirring for 24 hours, distilled-deionized water (50 mL) was added to the reaction mixture and the resulting white precipitate (dicyclohexylurea) was removed by filtration. The lower organic layer was isolated using a 250 mL separatory funnel and dried (Na_2SO_4). The dried organic solution was filtered and CH_3CN (80 mL) was added to the filtrate. The remaining white precipitate was removed by filtration and the filtrate was concentrated *in vacuo* to yield 0.44 g of DPGS-NH-PEG-NH₂ as a solid product.

10 IR: 1700 cm^{-1} .

TLC: R_f 0.65.

B. Preparation of DPGS-PEG-NH-PEG-NH-maleimide.

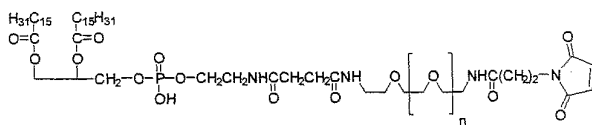
Into a round bottom flask (100 mL) was added a solution of DPGS-NH-PEG-NH₂ from Step A (0.44 g, 0.13 mmole, 1 eq.) in CH_2Cl_2 (10 mL). To this solution was added a solution of triethylamine (13 mg, 0.13 mmole, 1 eq.) in CH_2Cl_2 . To this mixture was added dropwise a solution of 34.6 mg N-maleoyl- β -alanine N-hydroxysuccinimide ester (34.6 mg) in CH_2Cl_2 (10 mL). After stirring overnight at room temperature, deionized-distilled water (30 mL) was added to the reaction mixture and stirring was continued an additional 3 hours. The lower organic layer was isolated using a separatory funnel and dried (Na_2SO_4). The organic layer was filtered and the filtrate was concentrated *in vacuo* to afford 360 mg of the title compound as a wax-like white solid.

IR: 1740 cm^{-1} , 1670 cm^{-1} , 1100 cm^{-1} .

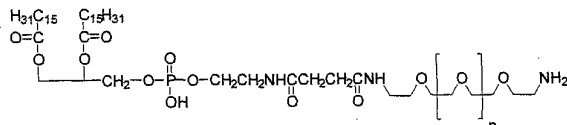
TLC: R_f 0.75.

Example 45

25 This example is directed to the preparation of 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine-N-carbonylethylenecarbonyl-imino-polyethylene-glycolethylaminocarbonylethylenemaleimide (DPPE-NH-PEG-NH-maleimide), which has the following formula.



A. Preparation of 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine-N-carboxylethylenecarbonyliminopolyethyleneglycolethylamine (DPPE-NH-PEG-NH₂).



To a cooled (0 to 5 °C) solution of DPPE succinate (79 mg) and ω,ω'-diaminopolyethyleneglycol (340 mg) in CH₂Cl₂ (20 mL) was added a solution of DCC (22 mg) in CH₂Cl₂ (10 mL). The reaction mixture was stirred for 4 hours at 0 to 5 °C and then stirred overnight at room temperature. Water (10 mL) was added, and the reaction mixture was stirred for an additional hour. The lower organic layer was isolated and concentrated *in vacuo* using a rotary evaporator. The residue was redissolved in CH₃CN and the precipitate was removed by filtration. Concentration of the organic solution *in vacuo* yielded 390 mg of DPPE-NH-PEG-NH-maleimide as a white solid.

B. Preparation of DPPE-NH-PEG-NH-maleimide.

To a cooled (0 to 5 °C) solution of DPPE-NH-PEG-NH₂ from Step A (210 mg) and triethylamine (20 mg) in CH₂Cl₂ (20 mL) was added a solution of maleimidopropionic acid N-hydroxysuccinimide ester (26 mg) in CH₂Cl₂ (10 mL). The resulting mixture was stirred for 1 hour at 0 to 5 °C, and then stirred overnight at room temperature. Water (10 mL) was added and the resulting mixture was acidified with dilute HCl, with stirring, to a pH of 3. The organic layer was isolated, washed with water (10

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 176 -

mL) and dried (NaSO_4). Concentration to dryness *in vacuo* using a rotary evaporator provided 210 mg of the title compound (DPPE-NH-PEG-NH-maleimide) as a white solid.

Example 46

Fab' or F(ab')_2 fragments were bound to gas-filled vesicles via a lipid-PEG-maleimide lipid. The Fab' or F(ab')_2 fragments were prepared from anti-skeletal myosin (Sigma Chemical, St. Louis, MO) using Fab' and/or F(ab')_2 kits from Pierce (Rockford, IL).

Fab' fragments were prepared by digesting the antibody with papain. This cleaves both Fab' fragments from the Fc region of the antibody. The Fc fragments were then bound to a Protein A column and the Fab' fragments were collected. The Fab' fragments were then lyophilized (Labconco Lyph-Lock 12, Kansas City, MO) and prepared for binding to the lipid-PEG-maleimide lipid.

F(ab')_2 fragments were prepared in a similar manner as for the Fab' fragments. However, the enzyme pepsin was used instead of papain. Pepsin cleaves farther in the Fc region, and the two Fab' fragments remain connected. The F(ab')_2 fragments were then lyophilized.

The various fragments will be resuspended at a concentration of 1 mg/mL in coupling buffer (150 mM NaCl, 10 mM MOPS, 0.1 mM EDTA, 50 μM DTPA, pH 6.5) (all materials obtained from Sigma Chemical, St. Louis, MO). The lipid-PEG-maleimide lipid (0.2 to 10 mM) will then be added and the resulting mixture will be incubated for 16 hours at 4°C. The resulting products will be analyzed on a polyacrylamide electrophoresis gel to determine whether the Fab' and/or F(ab')_2 fragments became bound to the lipid. This can be determined by observing changes in molecular weight. Targeted vesicles will then be prepared using 1 wt % of the Fab' and/or F(ab')_2 bound lipids.

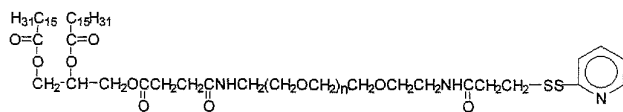
Example 47

This example is directed to the preparation of DPGS-NH-PEG-NH-PDP, which has the following formula.

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 177 -



Dipalmitoyl glycerol succinate-polyethyleneglycol-amine

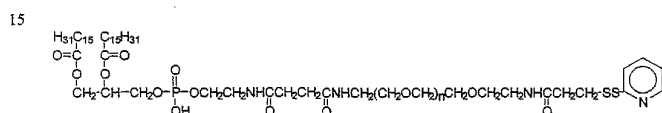
(DPGS-NH-PEG-NH₂) was prepared utilizing the procedure in Example 44, step A.

DPGS-NH-PEG-NH₂ (440 mg, 0.13 mmol) and triethylamine (13 mg, 0.13 mmol) were dissolved in CH₂Cl₂ (10 mL). To this solution was added a solution of

- 5 3-(2-pyridyldithio)propionic acid N-hydroxysuccinimide ester (PDP) (31 mg) in CH₂Cl₂ (10 mL). After stirring overnight at room temperature, deionized water (30 mL) was added to the reaction mixture and stirring was continued for an additional 3 hours. The lower organic layer was isolated using a separatory funnel and dried (Na₂SO₄). The organic layer was filtered and the filtrate was concentrated *in vacuo* to afford 360 mg of the title
- 10 compound (DPGS-NH-PEG-NH-PDP) as a wax-like white solid.

Example 48

This example is directed to the synthesis of DPPE-NH-PEG-NH-PDP, which has the following formula.



1,2 Dipalmitoyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine-N-carbonylethylene-carbonyliminopolyethylene glycol ethylamine (DPPE-NH-PEG-NH₂) was prepared utilizing the procedure described in Example 45, Step A. This material (210 mg) and triethylamine (20 mg) were combined in CH₂Cl₂ (20 mL). This solution was added to a

20 solution of 3-(2-pyridyldithio)propionic acid N-hydroxysuccinimide ester (PDP) (31 mg) in CH₂Cl₂ (10 mL). The resulting mixture was stirred for 1 hour at 0 to 5°C, and then

WO 02/36161

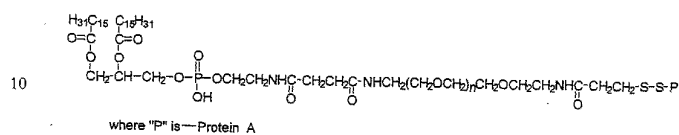
PCT/US01/32308

- 178 -

stirred overnight at room temperature. Distilled water (10 mL) was added and the resulting mixture was acidified with dilute HCl, with stirring, to pH of 3. The organic layer was isolated, washed with water (10 mL) and dried (Na_2SO_4). The organic layer was filtered and concentrated to dryness *in vacuo* using a rotary evaporator to provide 210 mg of the title compound (DPPE-NH-PEG-NH-PDP) as a white solid.

Example 49

This example is directed to the preparation of a lipid-hydrophilic polymer-protein conjugate within the scope of the present invention, which has the following formula.



The compound from Example 48 will be linked with Protein A by reacting a sulfur atom of the -S-S- disulfide bond in DPPE-NH-PEG-NH-PDP a sulfhydryl group of a protein. The resulting compound may be utilized in forming protein-bearing vesicles, such as protein-bearing liposomes.

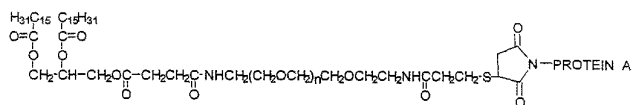
15 **Example 50**

This example is directed to the preparation of a lipid-hydrophilic polymer-protein conjugate within the scope of the present invention, which has the following formula.

WO 02/36161

PCT/US01/32308

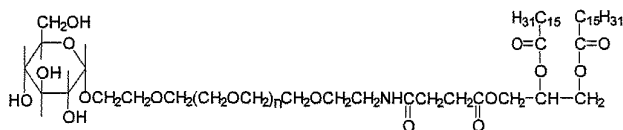
- 179 -



The compound from Example 47 (DPGS-NH-PEG-NH-PDP) will be coupled with maleimide-labeled Protein A to afford the above compound.

Example 51

- 5 This example is directed to the preparation of DPGS-NH-PEG-glucose, which has the following formula.



A. Preparation of NH₂-PEG-Glucose.

- 2,3,4,6-tetra-O-Benzyl- α -D-glucopyranosyl bromide (0.6 g) was prepared according to the procedure of C.A.A. van Broeckel and J.H. van Boom, *Tetrahedron*, 41, 4545 (1985). Drying of the mixture was initiated by the use of activated molecular sieves in DMF mixed with ω -trifluoroacetylaminopolyethyleneglycol (3.5 g), the latter being prepared from ω -aminopolyethyleneglycol and triacetic acid anhydride, and diisopropylethylamine (DIEA) (1.2 mL). The resulting solution was stirred for 4 days under nitrogen. The solution was diluted with CHCl₃ (150 mL) and washed with 10% NaHCO₃ (50 mL) and water. The organic layer was concentrated *in vacuo*, and the resulting residue was treated with sodium carbonate methanol-H₂O solution at room temperature for 2 days. The solvent was removed *in vacuo* and the residue was extracted twice with CHCl₃ (100 mL). The combined chloroform extracts were concentrated *in vacuo*, and the resulting residue was dissolved in methanol and hydrogenated over 10%

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 180 -

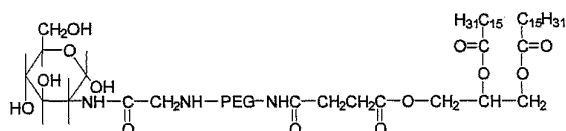
palladium on charcoal (0.45 g) at 4 atmospheres of pressure and room temperature. The catalyst was filtered off and the filtrate was concentrated *in vacuo* to provide NH₂-PEG-Glucose (3 g) as a white solid. The product was purified on a silica gel column and eluted with an isocratic eluent of chloroform-methanol-water.

- 5 B. Preparation of DPGS-NH-PEG-Glucose.
- NH₂-PEG-Glucose from Step A (1 g), triethylamine (0.5 g) and a solution of acetonitrile and water (50:50) were combined and added to a cooled (0-5°C) solution of DPGS-succinimide from Example 13A (0.15 g) in acetonitrile (10 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature for two days and the acetonitrile was evaporated.
- 10 The resulting residue was diluted with water to 50 mL, dialyzed through a 500 MWCO membrane, and lyophilized to yield the title compound (DPGS-NH-PEG-Glucose) as a white solid.

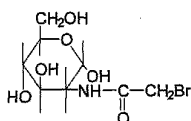
Example 52

This example is directed to the preparation of DPGS-NH-PEG-NH-

- 15 Mannose, which has the following formula.



A. Preparation of α -bromo-acetyl-amino-D-mannose.



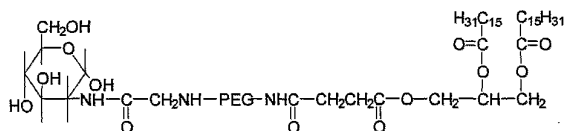
WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 181 -

D-Mannosamine hydrochloride (2.1 g), triethylamine (3 g) and DMF (50 mL) were combined and added to a cooled (0-5°C) solution of α -bromoacetyl bromide (2 g) in CH_2Cl_2 with stirring. The resulting mixture was stirred at room temperature for 8 hours, and then poured into ice water (50 mL). This aqueous mixture was stirred for 1
 5 hour and then concentrated *in vacuo* to dryness. The resulting residue was recrystallized from a mixture of water and ethanol to afford α -bromo-acetylamino-D-mannose as a white solid (2.1 g).

B. Preparation of DPGS-NH-PEG-NH-Mannose.



α -Bromoacetylamino-D-mannose from Step A (0.3 g),
 10 DPGS-NH-PEG-NH₂ from Example 44A (4 g), sodium carbonate (0.2 g) and KI (20 mg) were combined in a mixture of water and ethanol (1:1). The resulting mixture was heated to 40°C for 8 hours. The ethanol was evaporated on a rotary evaporator, and the aqueous residue was dialyzed through a 500 MWCO membrane and lyophilized to yield 4 g of the title compound (DPGS-NH-PEG-NH-Mannose) as a white solid.

15 The following examples are directed to the preparation of targeted vesicles.

Example 53

Albumin vesicles (or albumin coated gas bubbles) were suspended in a buffer solution with a pH greater than 8. To this suspension was added
 3-(2-pyridyl)dithiopropionic acid N-hydroxy-succinimide ester (SPDP) in CH_3CN at 0 to
 20 5°C. The resulting mixture was incubated for 2 days at room temperature and dialyzed on a membrane of 500 MWCO to provide pyridyldithiopropionoyl bearing albumin vesicles. Maleimidophenylbutyrate conjugated antibody (MPB-AB) was then incubated with the surface modified albumin vesicles to obtain antibody linked to albumin vesicles.

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 182 -

Example 54

Polyglutamic acid vesicles (or polyglutamic acid coated-gas bubbles) were suspended in water. To this suspension was added ethyl-N,N-dimethylaminopropylcarbodiimide hydrochloride (EDC) in water at 0 to 5°C. The resulting mixture was gently stirred for 4 hours and then a peptide solution (in a buffer of pH of 8 to 9.5) was added. This mixture was incubated for 2 days at room temperature and dialyzed on a membrane of 500 MWCO to afford peptide conjugated polyglutamic acid vesicles.

Example 55

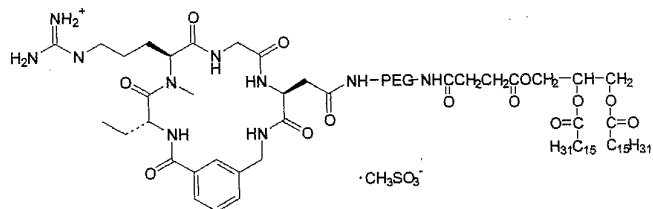
Example 53 was repeated, except that vesicles formulated from a copolymer of methyl cyanomethacrylate (2-cyano-2-propenoic acid, methyl ester) and ω -amino-tetraethyleneglycolyl methacrylate were substituted for the albumin vesicles.

Example 56

This example is directed to the preparation of a lipid-polymer-peptide conjugate and targeted vesicles therefrom.

Into a round bottom flask was introduced 1 equivalent of α -amino, ω -carboxy PEG-4000 having a tert-butyloxycarbonyl (t-Boc) protecting group. This was activated by the addition of carbonyldiimidazole (CDI) (1 eq.) and hydroxybenzotriazole (1 eq.) in N-methylpyrrolidone. To this solution was added the peptide Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val deprotected on the amino terminus. The resulting solution was stirred and periodically checked for free amino groups by analysis with methylene blue or ninhydrin. When there was no further evidence of the free amino terminus, deprotection of the entire mixture was carried out via the addition of trifluoroacetic acid in methylene chloride. Free amine from the PEG was then isolated by standard methods. Into a separate flask was introduced a solution of DPPE (1 eq) in DMF and carbonyldiimidazole (1 eq). Stirring was continued for one hour over molecular sieves (4 angstroms). To this mixture was then added the PEG-peptide ligand mixture followed by continued stirring. The mixture was then dried *in vacuo* and added to a DEAE Sepharose size exclusion column, thereby isolating the DPPE-PEG-peptide conjugate. Gas filled vesicles were then prepared from the DPPE-PEG-peptide utilizing standard methodology.

This example is directed to the preparation of DPGS-PEG-cyclic peptide, which has the following formula.



Example 58

To a solution of cyclic[D-2-aminobutyl]-N-2-methyl-L-arginyl-glycyl-L-aspartyl-3-(aminomethylbenzoic acid)] (66 mg) in in water (20 mL) was added ethyl-N,N-dimethylaminopropylcarbodiimide hydrochloride (EDC) in water (10 mL) at 0 to 5°C. The resulting mixture was stirred for 4 hours at 0 to 5°C, followed by 8 hours at room temperature. The reaction mixture was then added to a suspension of albumin vesicles at 0 to 5°C. The resulting mixture was incubated for two days at room temperature, filtered and

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 184 -

dialyzed using a membrane having a MWCO of 1000 to provide albumin vesicles targeted with a porphyrin targeting ligand.

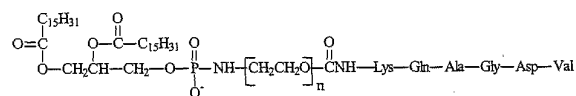
Example 59

- Example 58 was repeated, except that vesicles formulated from a
- 5 copolymer of methyl cyanomethacrylate (2-cyano-2-propenoic acid, methyl ester) and ω -amino-tetraethyleneglycolyl methacrylate were substituted for the albumin vesicles.

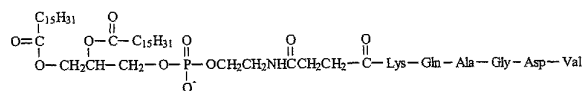
Example 60

Using the synthetic methodologies described above, the following compounds were prepared.

- 10 A. DPPA-PEG-KQAGDV, which has the formula



- B. DPPE-succinyl-KQAGDV, which has the formula

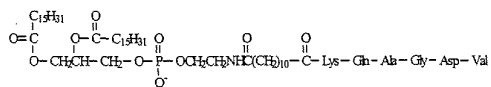


WO 02/36161

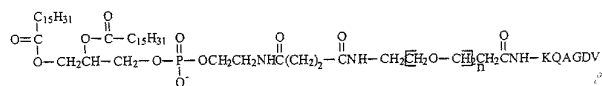
PCT/US01/32308

- 185 -

C. DPPE-dodecanyl-PEG-KQAGDV which has the formula



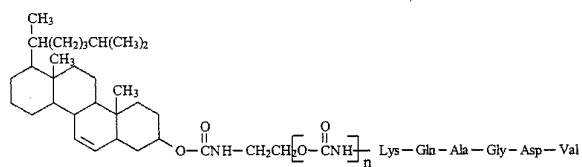
D. DPPE-succinyl-PEG-KQAGDV, which has the formula



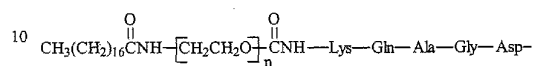
5

where KQAGD is Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val

E. Cholesteryl-PEG-KQAGDV which has the formula



F. Stearoyl-PEG-KQAGDV, which has the formula



10

Example 61

This example is directed to the preparation of targeted vesicles within the scope of the present invention.

The targeted lipid DPGS-PEG-KQAGDV (1.25 wt %) and the lipids DPPA (6 wt % minus the weight of the DPGS-PEG-KQAGDV), DPPE-PEG5000 (40 wt % minus the weight of DPGS-PEG-KQAGDV) and DPPC (54 wt % minus the weight of DPGS-PEG-KQAGDV) were introduced into an evaporating flask. Aliquots of a mixture of toluene and methanol (60:40 v/v) were added to dissolve the lipids and rinse the lipids into the flask. The flask was placed on a rotary evaporator and warmed to $55^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ until the solution in the flask was clear. Vacuum was applied to the rotary evaporator to concentrate the solution to provide a thick gel. The flask was then placed on a magnetic stir plate and a stir bar was placed in the flask. Methyl t-butyl ether (MTBE) was added to the flask to precipitate solid material, and the solid mixture was cooled to $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. The resulting white solid was collected via vacuum filtration, washed with MTBE and placed in a vacuum oven and dried for at least 4 hours to a constant weight at $45^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. Vesicles were prepared from the lipid mixture using the procedures discussed herein. When not in use, the lipid mixture was stored in an airtight container at $-15^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

15 Example 62

This example includes a description of comparative testing of the targeted contrast agents of the present invention to contrast agents of the prior art.

Testing System

A testing system of the type depicted in Figure 1 was employed in this example. Polyethylene tubing (Pharmed, Cole-Parmer) was passed through a block composed of 2% agar osc. The agar was block prepared by heating the agar in water and pouring it into a plastic mold (dimensions = 8 cm x 10 cm). The agar osc was purchased from Behringer Mannheim (Indianapolis, Indiana). Peristaltic flow was provided by a Master-Flex, Cole-Parmer pump. Human blood was drawn from normal male volunteers and the blood was allowed to clot on cotton piping material and fastened to #6 gauge fishhooks, which were attached to nylon filament. The nylon filament was threaded through the polyethylene tubing clots such that the clots were positioned in the center of the tubing within the agar blocks. Contrast agents were injected upstream of the clot and the pump was used to circulate saline past the clot at a rate of 50 cc per ml for 30 seconds which was increased to a rate of 150 cc per minute thereafter. Ultrasound imaging was performed with a Sonos model No. 5500 Hewlett Packard clinical ultrasound machine

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 187 -

using a linear array second harmonic transducer (2 to 4 MHz) operating in the fundamental mode. Ultrasound was performed continuously at a mechanical index of 0.2 with the focal zone of the transducer directed on the clot. A region of interest was drawn on the clots and signal intensity was measured before injection of the contrast agents and for 2 and up to 5 minutes after injection of the contrast agent.

Contrast Agents Employed in Comparative Testing

A stock lipid mix was prepared from 82 weight % dipalmitoylphosphatidylcholine, 8 weight % dipalmitoylphosphatidic acid and 10 weight % dipalmitoylphosphatidylethanolamine-PEG 5000. To aliquots of this stock lipid mix were added varying weight percents ranging from 0.05 weight % to 5 weight %, based on the weight of dry lipid employed in the stock lipid mix, of the targeted lipids DPPE-PEG-KQAGDV, cholesterol-PEG-KQAGDV, stearyl-PEG-KQAGDV, dipalmitoylphosphatidylglycerol-PEG-KQAGDV and unbound or free peptide KQAGDV. The molecular weight of the PEG in the targeted lipids DPPE-PEG-KQAGDV, cholesterol-PEG-KQAGDV, stearyl-PEG-KQAGDV and dipalmitoylphosphatidylglycerol-PEG-KQAGDV was MW 3400. The lipid mix with targeted lipid or free peptide was then suspended in a solution comprised of 8:1:1 v:v:v normal saline, propylene glycol and glycerol at a final lipid concentration of 1 mg/mL, and 1.5 mL of each sample was then added to 2 mL clear glass vials. The vials were capped and the head-space of the vials evacuated and exchanged with perfluorobutane gas. The vials were then shaken on a modified dental amalgamator at 4,200 rpm for 60 seconds (ESPE, Secfeld, Germany) resulting in phospholipid coated microbubbles.

The size and concentration of the microbubbles was determined with an Accusizer Model No. 770 particle sizer (Particle Sizing Systems, Goleta, California). All of the different preparations of gas filled vesicles had similar size with mean diameter of about 2 microns and particle concentration of about 1.5 billion bubbles per mL.

Samples (1 mL volume) of the various targeted vesicle compositions were injected upstream of the blood clot via an injection port and the pump was circulated at low and high speed. The ultrasound intensity of the clots was measured for the different compositions. A composition containing non-targeted vesicles, prepared from the stock solution, did not cause any appreciable increase in signal intensity of the clots. The ultrasound signal intensity obtained from this composition is depicted graphically in Figure

WO 02/36161

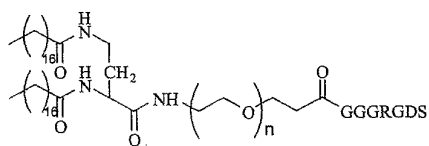
PCT/US01/32308

- 188 -

2. In contrast, all of the vesicles containing the different targeted lipids increased the signal intensity of the clots. Figure 3 includes a graphical depiction of the signal intensity of the blood clot before and after exposure to vesicles prepared from the stock lipid solution and 0.3% by weight of the lipid conjugate DPPE-PEG-KQAGDV. An increased
 5 signal intensity was surprisingly obtained from a vesicle composition prepared from the stock vesicle solution and 0.3% by weight unbound or free KQAGDV. This increase in ultrasound intensity is depicted graphically in Figure 4. This study demonstrates that the composition containing the free peptide was at least as effective as the composition containing the lipid conjugate DPPE-PEG-KQAGDV.

10 Example 63

This example describes the synthesis of N,N'-distearoyl-diaminobutyl-PEG3400-GGGRGDS, a bioconjugate of the present invention, which has the following formula:



15 where n is an integer of from about 60 to about 80.

Reagents

The following reagents were used in this example.

20% piperidine in 1-Methyl-2-pyrrolidone (NMP) (v/v) for removal of

Fmoc protecting groups.

20 Coupling agents: 1M 1-hydroxybenzotriazole (HBOT) in NMP;

1M N,N' diisopropylcarbodiimide (DIC) in NMP.

Washing solvents: dichloromethane; Methanol.

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 189 -

Resins: N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)- protected (Fmoc) amino acid
Wang resins.

Kaiser Reagents:

Dilute 2 ml 1mM aqueous KCN up to 100 ml with pyridine;
500 mg ninhydrin in 10 ml absolute ethanol;
80 g phenol in 20 ml absolute ethanol.

To test for primary amines, a small amount of the peptide-resin is placed in a small test tube. 2 drops of each of the Kaiser Reagents are added, and the test tube placed in oil bath for 2 minutes. A clear yellow solution indicates a strong negative reaction for primary amines, while a dark blue solution (ninhydrin positive) indicates a strong positive for primary amines.

Procedure

Starting with Fmoc-L-Serine Wang resin, the Fmoc protecting group was removed from the amino acid-resin using 20% piperidine/NMP solution. After 20 minutes, the resin was tested for the free amine group using Kaiser (ninhydrin) reagent. A dark blue result was observed. The resin was washed using alternating washes of dichloromethane and methanol. 3 equivalents of the next amino acid in the sequence (Asp) were then added as a solid, followed by 3 equivalents each of the 1M HOBT/NMP and 1M DIC/NMP solutions. Sufficient NMP was added to cover the resin. N₂ gas was bubbled from the bottom of the reaction vessel to stir, for approximately 1 hr. The resin was then washed using alternating washes of dichloromethane and methanol as above. Another Kaiser test was performed, which was negative (yellow), as expected.

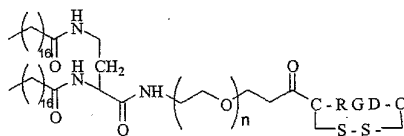
The above steps were then repeated for each of the next amino acid residues, until the GGGRGDS peptide sequence was complete.

The terminal Fmoc group was then removed from the last amino acid with the piperidine solution. 1 equivalent of Fmoc- α -amino, ω -carboxy-PEG3400 was added, with sufficient NMP to cover, along with 3 equivalents each of the 1M HOBT/NMP and 1M DIC/NMP solutions. The reaction was allowed to proceed for 24 to 72 hrs. Additional HOBT (solid) and DIC (neat) were added at approximately 24 hrs. The PEG solution was drained and reserved, and the resin was washed, then dried over N₂. Weight gain was used to determine that coupling was successful. The resin was then capped with acetic anhydride and triethylamine before proceeding.

The Fmoc groups were then removed with piperidine solution. A check with Kaiser reagents again showed ninhydrin positive. 6 equivalents of stearic acid, dissolved in N,N-Dimethylformamide (DMF) were then added. Also added were 6 equivalents of the 1M HOBT/NMP and 1M DIC/NMP solutions. After several hours, the excess stearic acid was washed off. After a final washing and test with Kaiser reagents, the product was again ninhydrin negative, as expected.

The resin was added with stirring to a solution of trifluoroacetic acid and water (90:10, v:v). The resin was allowed to stir for 15-20 minutes and the resin filtered through a coarse fritted funnel. The filtrate was then diluted with water and neutralized to about pH 7 with aqueous NaOH (approx. 1-5 N). This may be dialyzed through a 1000 molecular weight cutoff (MWCO) dialysis bag to remove low molecular weight by-products. The filtrate was then concentrated to dryness *in vacuo*. The product was then dissolved in an appropriate solvent and purified with a Vydac, TP-1010 C-18 reverse-phase column using an H₂O : methanol gradient. The purified bioconjugate was characterized by MALDI mass spectrometry, NMR, and amino acid analysis.

This example describes the synthesis of N,N'-distearoyl-diaminobutyl-PEG3400-CRGDC, a bioconjugate of the present invention, which has the following
25 formula:



This synthesis follows the same procedure as that described in Example 63, except that the cleavage with trifluoroacetic acid also incorporated or used scavengers (i.e. phenol, ethane dithiol, and thioanisole). In addition, after filtration and concentration *in vacuo*, the product was then adjusted to pH 8 and to the turbid solution was added in a dropwise fashion, 0.01 N potassium ferricyanide $K_3Fe(CN)_6$ (Aldrich, Milwaukee, Wis.). The resin was then filtered through a coarse fritted-glass funnel and then the filtrate dialyzed through a 1000 MWCO spectra/Por® dialysis membrane (Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, Calif. 90220-6435). The product was then dissolved in an appropriate solvent and purified with a Vydac, TP-1010 C-18 reverse-phase column using an H₂O : methanol gradient. The purified bioconjugate was again characterized by MALDI mass spectrometry, NMR, and amino acid analysis.

Example 65

This experiment describes the *in vitro* testing of a targeted vesicle composition which utilizes the bioconjugate described in Example 63.

Targeted lipid vesicles comprising the bioconjugate of Example 63 were formulated using a dried lipid mixture of DPPC (82 mole %), DPPE-PEG5000 (8 mole %) and DPPA (8 mole %) and the compound from Example 63. The materials were mixed together at a 95:5 weight % ratio (lipid blend:bioconjugate) and lyophilized. The material was then resuspended at 5 mg/ml in 8:1:1 normal saline: propylene glycol: glycerol, and placed in 2 ml serum vials at 1.5 ml per vial. The headspace was replaced with perfluoropropane. The vials were then shaken on a modified dental amalgamator at 4,200 rpm for 60 seconds (ESPE, Secfeld, Germany) resulting in a composition containing perfluoropropane gas-filled targeted vesicles which comprised the bioconjugate of Example 63.

The size and concentration of the microbubbles was determined with an Accusizer Model No. 770 particle sizer (Particle Sizing Systems, Goleta, California). The gas filled vesicles had a similar size to those produced in Example 62, with a mean diameter of about 2 microns and particle concentration of about 1.5 billion bubbles per mL.

A testing system, as described in Example 62 was utilized. The images obtained are set forth in Figure 5. A baseline image was first obtained (Figure 5C). The targeted vesicle formulation from Example 63 (0.5 ml) was then injected, with the flow set at 6 ml per minute. The flow was maintained at this rate for 30 seconds. The flow was

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 192 -

then increased to 30 ml per minute for 2 minutes and then returned to 6 ml per minute to obtain the image shown in Figure 5D. Excellent visualization of the clot soaked phantom was obtained, as compared to both pre-administration and to a control performed with a non-targeted vesicle formulation (Figure 5B). This experiment demonstrates that excellent
5 visualization of a thrombus may be obtained using a bioconjugate compound and targeted vesicle composition of the present invention.

The disclosures of each patent, patent application and publication cited or described in this document are hereby incorporated herein by reference, in their entirety.

Various modifications of the invention, in addition to those described
10 herein, will be apparent to those skilled in the art from the foregoing description. Such modifications are also intended to fall within the scope of the appended claims.

WO 02/36161

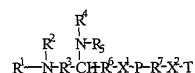
PCT/US01/32308

- 193 -

CLAIMS

What is claimed is:

1. A compound having the formula



5 (IV)

wherein:

X¹ and X² are independently a direct bond or a linking atom or group selected from the group consisting of -O-, -S-, -N(R⁸)-, -C(=X³)-, -C(=X³)-N(R⁸)-, -N(R⁸)-C(=X³)- and -C(=X³)-N(R⁸)-C(=X³)-;

10 X³ is -O- or -S-;

R¹ is acyl of from about 7 to about 23 carbons;

R² is hydrogen or lower alkyl;

R³ is a direct bond or alkylene of from 1 to about 10 carbons;

R⁴ is acyl of from about 7 to about 23 carbons;

15 R⁵ is hydrogen or lower alkyl;

R⁶ and R⁷ are independently a direct bond or alkylene of from 1 to about 10 carbons;

R⁸ is hydrogen or lower alkyl;

P is a hydrophilic polymer; and

20 T is a targeting ligand which targets cells or receptors selected from the group consisting of myocardial cells, endothelial cells, epithelial cells, tumor cells and the glycoprotein GPIIb/IIIa receptor.

2. A compound according to Claim 1 wherein:

25 X¹ and X² are independently a linking group selected from the group consisting of -C(=X³)-, -C(=X³)-N(R⁸)-, -N(R⁸)-C(=X³)- and -C(=X³)-N(R⁸)-C(=X³)-;

R¹ is acyl of from about 10 to about 22 carbons;

R² is hydrogen;

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 194 -

- 5 R³ is alkylene of from 1 to about 10 carbons;
 R⁴ is acyl of from about 10 to about 22 carbons;
 R⁵ is hydrogen;
 R⁶ and R⁷ are independent a direct bond or lower alkylene; and
 R⁸ is hydrogen.
- 10 3. A compound according to Claim 2 wherein:
 X¹ is -C(=O)-NH-C(=O)-;
 X² is -C(=O)-;
 R¹ is acyl of from about 15 to about 20 carbons;
 R³ is alkylene of from 1 to about 3 carbons;
 R⁴ is acyl of from about 15 to about 20 carbons; and
 R⁶ is a direct bond;
 R⁷ is lower alkylene.
- 15 4. A compound according to Claim 3 wherein:
 R¹ is acyl of from about 17 to about 19 carbons;
 R³ is methylene;
 R⁴ is acyl of from about 17 to about 19 carbons; and
 R⁷ is ethylene.
- 20 5. A compound according to Claim 4 wherein:
 R¹ and R² are acyl of about 18 carbons
6. A compound according to Claim 1 wherein said hydrophilic polymer
 is selected from the group consisting of polyalkyleneoxides, polyvinyl alcohol,
 polyvinylpyrrolidones, polyacrylamides, polymethacrylamides, polyphosphazenes,
 poly(hydroxyalkylcarboxylic acids) and polyoxazolidines.
- 25 7. A compound according to Claim 6 wherein said hydrophilic polymer
 comprises a polyalkyleneoxide.

WO 02/36161

PCT/US01/32308

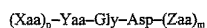
- 195 -

8. A compound according to Claim 7 wherein said hydrophilic polymer is selected from the group consisting of polyethylene glycol and polypropylene glycol.

9. A compound according to Claim 8 wherein said hydrophilic polymer is polyethylene glycol.

5 10. A compound according to Claim 8 wherein said hydrophilic polymer is PEG3400.

11. A compound according to Claim 1 wherein said targeting ligand comprises a peptide of the formula:



10 wherein:

m and n are independently an integer of from 1 to about 100;

Xaa and Zaa are independently selected from the group consisting of natural amino acids and synthetic amino acids;

15 Yaa is selected from Arginine, Homoarginine, and Lysine-N-acetimidate; and

with the proviso that when Xaa and Zaa are sulfur containing amino acids, Xaa and Zaa may be linked together via a disulfide linkage.

12. A compound according to Claim 11, wherein:

Xaa is Glycine;

20 Yaa is Arginine;

Zaa is Serine;

n is 1, 2 or 3; and

m is 1.

13. A compound according to Claim 12, wherein:

25 n is 3.

14. A compound according to Claim 11, wherein:

WO 02/36161

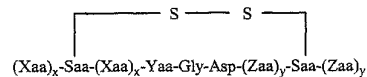
PCT/US01/32308

- 196 -

Xaa and Zaa comprise an amino acid independently selected from sulfur containing amino acids.

15. A compound according to Claim 1 wherein said targeting ligand comprises a peptide of the following formula:

5



wherein:

each x and y is independently an integer of from 0 to about 50;

each Saa is selected from the group consisting of natural and synthetic sulfur containing amino acids;

10 each Xaa and Zaa are independently selected from the group consisting of natural amino acids and synthetic amino acids; and

Yaa is selected from Arginine, Homoarginine, and Lysine-N-acetimidate.

15 16. A compound according to Claim 15 wherein:

each Saa is independently selected from the group consisting of D-Cysteine, L- Cysteine, D-Penicillamine and L-Penicillamine.

17. A targeted vesicle composition for therapeutic or diagnostic use *in vivo* comprising, in an aqueous carrier, lipid, protein or polymer gas filled vesicles,

20 wherein said vesicles further comprise a compound according to Claim 1.

18. A targeted vesicle composition according to Claim 17, wherein said vesicles are selected from the group consisting of liposomes and micelles.

19. A targeted vesicle composition according to Claim 18, wherein said vesicles comprise liposomes.

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 197 -

20. A targeted vesicle composition according to Claim 19 wherein said liposomes comprise a phospholipid selected from the group consisting of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and phosphatidic acid.

21. A targeted vesicle composition according to Claim 20 wherein said phosphatidylcholine is selected from the group consisting of dioleoylphosphatidylcholine, dimyristoylphosphatidylcholine, dipalmitoylphosphatidylcholine and distearoylphosphatidylcholine.

22. A targeted vesicle composition according to Claim 21 wherein said phosphatidylcholine comprises dipalmitoylphosphatidylcholine.

23. A targeted vesicle composition according to Claim 20 wherein said phosphatidylethanolamine is selected from the group consisting of dipalmitoylphosphatidylethanolamine, dioleoylphosphatidylethanolamine, N-succinyldioleoylphosphatidylethanolamine and 1-hexadecyl-2-palmitoylglycerophosphoethanolamine.

24. A targeted vesicle composition according to Claim 23 wherein said phosphatidylethanolamine comprises dipalmitoylphosphatidylethanolamine.

25. A targeted vesicle composition according to Claim 20 wherein said phosphatidic acid comprises dipalmitoylphosphatidic acid.

26. A targeted vesicle composition according to Claim 17, wherein said vesicles comprise a gas selected from the group consisting of perfluorocarbons and sulfur hexafluoride.

27. A targeted vesicle composition according to Claim 26 wherein said perfluorocarbon gas is selected from the group consisting of perfluoromethane, perfluoroethane, perfluoropropane, perfluorobutane and perfluorocyclobutane.

28. A targeted vesicle composition according to Claim 27 wherein said perfluorocarbon gas is selected from the group consisting of perfluoropropane and

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 198 -

perfluorobutane.

29. A targeted vesicle composition according to Claim 28 wherein said perfluorocarbon gas comprises perfluorobutane.

30. A targeted vesicle composition according to Claim 17 wherein said gas is derived, at least in part, from a gaseous precursor.

31. A targeted vesicle composition according to Claim 30 wherein said gaseous precursor has a boiling point of greater than about 37°C.

32. A targeted vesicle composition according to Claim 31 wherein said gaseous precursor comprises a perfluorocarbon.

33. A targeted vesicle composition according to Claim 32 wherein said perfluorocarbon is selected from the group consisting of perfluoropentane and perfluorohexane.

34. A targeted vesicle composition according to Claim 17 wherein said vesicles further comprise a bioactive agent that is different from said gas and said compound.

35. A targeted vesicle composition according to Claim 34 wherein said bioactive agent comprises a therapeutic agent selected from the group consisting of genetic material, dihydroergotamine, heparin sulfate, tissue plasminogen activator, streptokinase, urokinase, hirudin, and mixtures thereof.

36. A method of imaging a thrombus in a region of a patient, said method comprising (i) administering to the patient a targeted vesicle composition according to Claim 17; and (ii) scanning said region of the patient with diagnostic imaging.

37. A method according to Claim 36, wherein said diagnostic imaging comprises diagnostic ultrasound.

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 199 -

38. A method according to Claim 37, wherein said region of a patient comprises the cardiac region.
39. A method of lysing a thrombus in a blood vessel comprising (i) administering to a patient, by intravenous injection, a targeted vesicle composition according to Claim 17; (ii) scanning said patient with diagnostic imaging to visualize said thrombus; and (iii) applying ultrasonic energy to said thrombus.
40. A method of lysing a thrombus in a blood vessel comprising (i) administering to a patient, by intravenous injection, a targeted vesicle composition according to Claim 35; (ii) scanning said patient with diagnostic imaging to visualize said thrombus; and (iii) applying ultrasonic energy to said thrombus.
41. A method for providing an image of an internal region of a patient comprising (i) administering to the patient a targeted vesicle composition according to Claim 17; and (ii) scanning the patient using ultrasound to obtain a visible image of the region.
42. A method according to Claim 41 wherein said targeting ligand targets regions of arteriosclerosis.
43. A method according to Claim 41 wherein said arteriosclerosis comprises atherosclerotic plaque.
44. A method according to Claim 41 wherein said targeting ligand targets infarcted myocardium.
45. A method according to Claim 41 wherein said targeting ligand targets cancer cells.
46. A method for diagnosing the presence of diseased tissue in a patient comprising (i) administering to the patient a targeted vesicle composition according to

WO 02/36161

PCT/US01/32308

- 200 -

Claim 17; and (ii) scanning the patient using ultrasound to obtain a visible image of the region.

47. A method according to Claim 46 wherein said targeting ligand targets regions of arteriosclerosis.

5 48. A method according to Claim 47 wherein said arteriosclerosis comprises atherosclerotic plaque.

49. A method according to Claim 46 wherein said targeting ligand targets infarcted myocardium.

10 50. A method according to Claim 46 wherein said targeting ligand targets cancer cells.

51. A method for the therapeutic delivery *in vivo* of a bioactive agent comprising (i) administering to a patient a therapeutically effective amount of a targeted vesicle composition according to Claim 34; and (ii) applying ultrasonic energy to the patient to release said bioactive agent from said targeted vesicles.

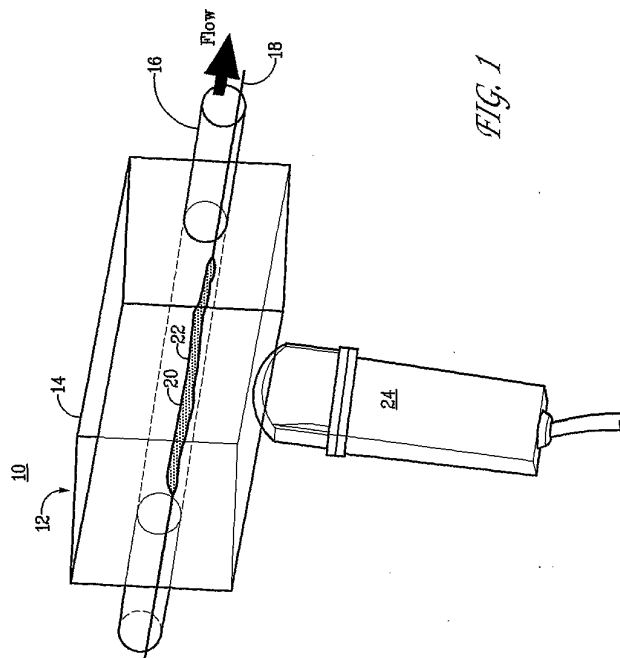
15 52. A method according to Claim 51, wherein said ultrasonic energy causes said vesicles to rupture.

53. A method according to Claim 51, further comprising the step of scanning the patient with diagnostic imaging to visualize the vesicles at the target site.

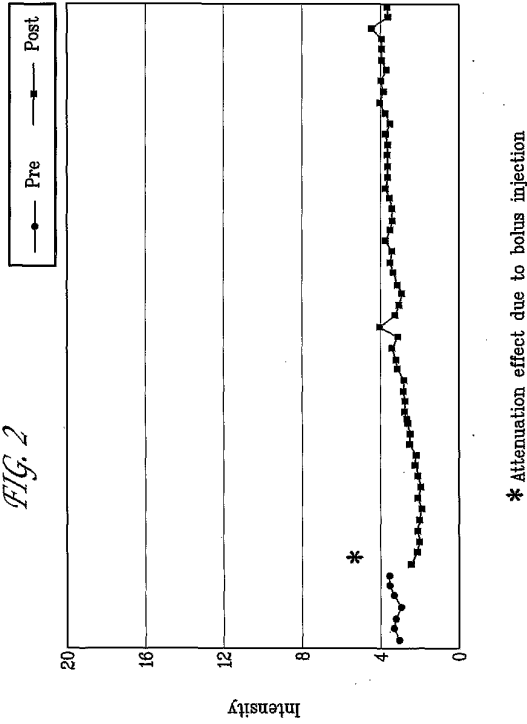
WO 02/36161

PCT/US01/32308

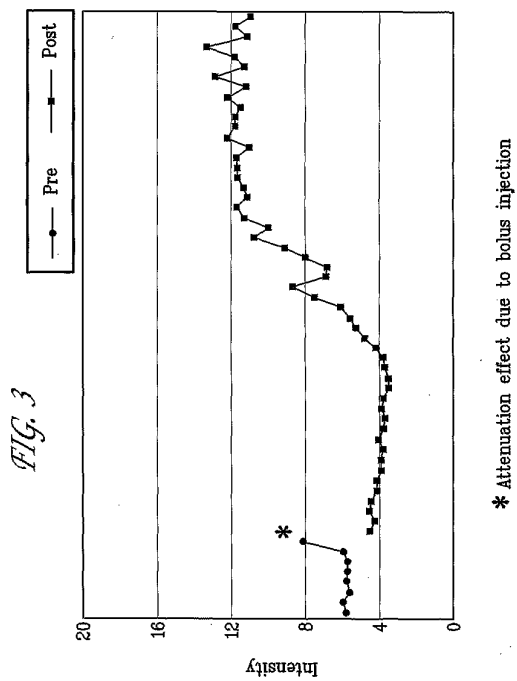
1/5

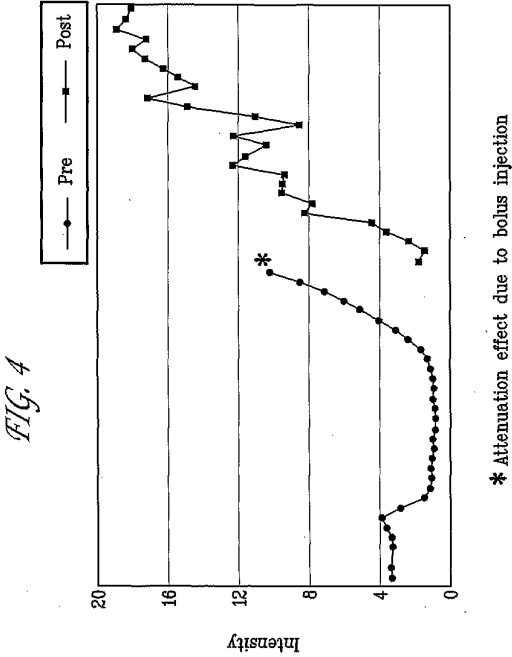


SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)



3/5

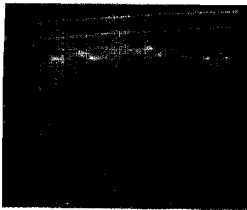




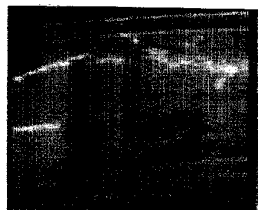
WO 02/36161

PCT/US01/32308

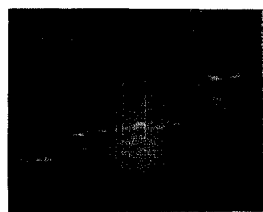
5/5

FIG. 5A

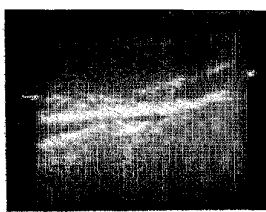
Nontargeted agent Pre

FIG. 5B

Post

FIG. 5C

Targeted agent Pre

FIG. 5D

Post

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
10 May 2002 (10.05.2002)

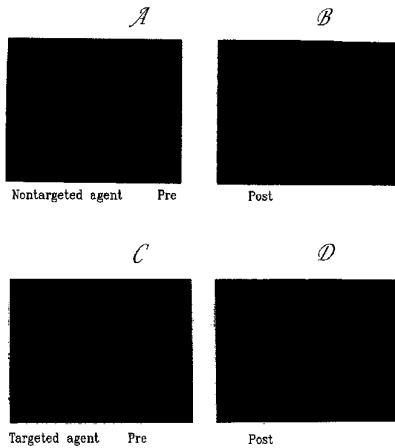
PCT

(10) International Publication Number
WO 02/036161 A3

- (51) International Patent Classification: A61K 41/00, O.; 3370 North Calle De Catalina, Tucson, AZ 85749 (US); SCHUMANN, Patricia, A.; 3560 North Camino De Oeste, Tucson, AZ 85745 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/32308
- (22) International Filing Date: 17 October 2001 (17.10.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/599,679 30 October 2000 (30.10.2000) US
- (71) Applicant: IMARX THERAPEUTICS, INC. [US/US]; 1635 East 18th Street, Tucson, AZ 85719 (US).
- (74) Agents: MILLER, Suzanne, E. et al.; Woodcock Washburn LLP, 46th Floor, One Liberty Place, Philadelphia, PA 19103 (US).
- (81) Designated States (national): AU, CA, JP.
- (84) Designated States (regional): European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- Published: with international search report
- (72) Inventors: UNGER, Evan, C.; 13365 E. Camino La Cebadilla, Tucson, AZ 85749 (US); MATSUNAGA, Terry;
- (88) Date of publication of the international search report: 25 September 2003

[Continued on next page]

(54) Title: NOVEL TARGETED COMPOSITIONS FOR DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC USE



(57) Abstract: Novel targeted compositions which may be used for diagnostic and therapeutic use. The compositions may comprise lipid, protein or polymer gas-filled vesicles which further comprise novel compounds of the general formula I-P-T, wherein I, comprises a hydrophobic compound, P comprises a hydrophilic polymer, and T comprises a targeting ligand which targets tissues, cells or receptors, including myocardial cells, endothelial cells, epithelial cells, tumor cells and the glycoprotein GPIIb/IIIa receptor. The compositions can be used in conjunction with diagnostic imaging, such as ultrasound, as well as therapeutic applications, such as therapeutic ultrasound.

WO 02/036161 A3

WO 02/036161 A3



For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/32308
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K41/00 A61K47/48 A61K49/22		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 45856 A (IMARX PHARMACEUTICAL CORP) 10 August 2000 (2000-08-10) claims 1,45,61,69; figure 1; examples 4,11	1-53
X	WO 99 13919 A (IMARX PHARMACEUTICAL CORP) 25 March 1999 (1999-03-25) claims 1,378,381,385; examples 9,10	1,17,18, 51-53
X	WO 96 40285 A (IMARX PHARMACEUTICAL CORP ; SHEN DEKANG (US); WU GUANLI (US); UNGER) 19 December 1996 (1996-12-19) claims 1,31-33,89,103 --/--	1-53
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *A* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 January 2003		Date of mailing of the international search report 31/01/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5518 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tlx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Berte, M

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/32308
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	SUCHKOVA VALENTINA N ET AL: "Enhancement of ultrasound-mediated fibrinolysis by platelet-targeted microbubble contrast agents." BLOOD, vol. 98, no. 11 Part 1, 16 November 2001 (2001-11-16), page 43a XP001109599 43rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Part 1; Orlando, Florida, USA; December 07-11, 2001, November 16, 2001 ISSN: 0006-4971 abstract -----	1-53

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 01/32308
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	☒	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2.	☒	Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3.	☐	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:		
1.	☐	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.	☐	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	☐	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	☐	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest		
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.		
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.		

International Application No. PCT/US 01 /2308

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 36-38, 41-50 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
Although claims 39-40, 51-53 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.2

Present claims 1-53 relate to an extremely large number of possible compounds or products. In fact, the claims contain so many options, that a lack of clarity (and/or conciseness) within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the application which do appear to be clear (and/or concise), namely those compounds or products which are recited in the examples.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 01/32308

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0045856	A	10-08-2000	AU 3586600 A
			EP 1146911 A2
			WO 0045856 A2
WO 9913919	A	25-03-1999	US 6139819 A
			AU 9383098 A
			EP 0959908 A1
			WO 9913919 A1
			US 6231834 B1
WO 9640285	A	19-12-1996	AU 709562 B2
			AU 6270396 A
			CA 2218541 A1
			CN 1187137 A ,B
			EP 0831932 A1
			JP 11507638 T
			WO 9640285 A1
			US 6139819 A
			US 6231834 B1
			15-05-2001

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/00	C 0 7 K 7/06	
C 0 7 K 7/06	C 0 7 K 14/31	
C 0 7 K 14/31	A 6 1 B 5/05	3 8 3
G 0 1 R 33/28	A 6 1 B 5/05	4 0 0
// A 6 1 B 8/08	G 0 1 N 24/02	B
	A 6 1 B 8/08	

(72)発明者 アンガー、エヴァン、シー
 アメリカ合衆国、アリゾナ、トゥーサン、 イー、カミノ ラ セバディラ 1 3 3 6 5

(72)発明者 マツナガ、テリー、オー
 アメリカ合衆国、アリゾナ、トゥーサン、 ノース カレ デ カタリナ 3 3 7 0

(72)発明者 シューマン、パトリシア、エイ
 アメリカ合衆国、アリゾナ、トゥーサン、 ノース カミノ デ ウエステ 3 5 6 0

F ターム(参考) 4C076 CC11 CC27 CC41 EE59
 4C084 AA11 BA41 BA42 BA47 NA10 NA15 ZA45 ZA54 ZB26
 4C085 AA08 AA21 AA22 AA32 HH09 JJ03 KA36 KB60 LL01 LL07
 LL18
 4C096 AA11 AB04 AB46 AD19 FC14
 4C601 DD03 DD14 DD15 DE07 EE09
 4H045 AA10 AA30 BA14 BA32 CA11 EA23 EA50

专利名称(译)	用于诊断和治疗用途的新型靶向组合物		
公开(公告)号	JP2005500245A	公开(公告)日	2005-01-06
申请号	JP2002538970	申请日	2001-10-17
[标]申请(专利权)人(译)	李马克斯Therapeutics公司		
[标]发明人	アンガーエヴァンシー マツナガテリーオー シューマンパトリシアエイ		
发明人	アンガー、エヴァン、シー マツナガ、テリー、オー シューマン、パトリシア、エイ		
IPC分类号	G01R33/28 A61B5/055 A61B8/08 A61K41/00 A61K47/48 A61K49/00 A61K49/22 A61P7/02 A61P9/10 A61P35/00 C07K7/06 C07K14/31		
CPC分类号	A61K49/223 A61K47/62 A61K47/6911 A61K47/6925 A61K49/227		
FI分类号	A61K49/00.C A61K41/00.ZNA A61K47/48 A61P7/02 A61P9/10 A61P35/00 C07K7/06 C07K14/31 A61B5/05.383 A61B5/05.400 G01N24/02.B A61B8/08		
F-TERM分类号	4C076/CC11 4C076/CC27 4C076/CC41 4C076/EE59 4C084/AA11 4C084/BA41 4C084/BA42 4C084/BA47 4C084/NA10 4C084/NA15 4C084/ZA45 4C084/ZA54 4C084/ZB26 4C085/AA08 4C085/AA21 4C085/AA22 4C085/AA32 4C085/HH09 4C085/JJ03 4C085/KA36 4C085/KB60 4C085/LL01 4C085/LL07 4C085/LL18 4C096/AA11 4C096/AB04 4C096/AB46 4C096/AD19 4C096/FC14 4C601/DD03 4C601/DD14 4C601/DD15 4C601/DE07 4C601/EE09 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA14 4H045/BA32 4H045/CA11 4H045/EA23 4H045/EA50		
代理人(译)	池田幸		
优先权	09/699679 2000-10-30 US		
其他公开文献	JP2005500245A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

新型靶向组合物，可用于诊断和治疗应用。所述的组合物，脂质，并且含有的蛋白质或高分子气体填充的囊泡，其进一步通式：包含LPT [的新化合物，其中，L是包含疏水性化合物，P是亲水性包含聚合物，并且T是心肌细胞，内皮细胞，上皮细胞，肿瘤细胞和糖蛋白的GPIIb包括靶向靶向组织，细胞或含有IIIa受体的受体的配体。该组合物可以与治疗应用结合使用，例如成像诊断，例如超声和进一步的治疗超声。

