(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2012-51932
(P2012-51932A)
(43)公開日　平成24年3月15日(2012.3.15)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 9/10	(2006.01)	A61K	9/10		4C076
A61B 8/00	(2006.01)	A61B	8/00		4C085
A61B 5/055	(2006.01)	A61B	5/05	383	4C096
A61K 49/00	(2006.01)	A61K	49/00	C	4C601
A61K 47/12	(2006.01)	A61K	49/00	A	

審査請求 有　請求項の数 43　ＯＬ　外国語出願　（全 133 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2011-237685 (P2011-237685)
(22)出願日　平成23年10月28日 (2011.10.28)
(62)分割の表示　特願2006-546389 (P2006-546389)の分割
原出願日　平成16年12月21日 (2004.12.21)
(31)優先権主張番号　03029534.9
(32)優先日　平成15年12月22日 (2003.12.22)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)

(71)出願人　510179423
ブラッコ・シュイス・ソシエテ・アノニム
Ｂｒａｃｃｏ　Ｓｕｉｓｓｅ　ＳＡ
スイス、ツェーハー－６９２８マンノ、チェントロ・ギャレリア２番、ヴィア・カントナーレ
(74)代理人　100068526
弁理士　田村　恭生
(74)代理人　100100158
弁理士　鮫島　睦
(74)代理人　100126778
弁理士　品川　永敏
(74)代理人　100150500
弁理士　森本　靖

最終頁に続く

(54)【発明の名称】造影イメージング用の気体封入マイクロベシクル・アセンブリー

(57)【要約】　（修正有）
【課題】気体封入マイクロベシクルおよび該マイクロベシクルの外面に静電相互作用によって会合でき、これによってマイクロベシクルの物理化学的性質を変性する構造実体（マイクロベシクルの会合成分，ＭＣＡ）から成るアセンブリーを提供する。
【解決手段】該ＭＣＡは必要に応じて、標的配位子、対生物活性剤、診断剤またはこれらの組合せを含有してもよい。該アセンブリーは、気体封入マイクロバブルまたはマイクロバルーンおよび１００ｎｍ以下の直径を有するＭＣＡ（特にミセル）から形成でき、かつ診断上および／または治療上活性な配合物の活性成分として、特に標的超音波イメージングを含む超音波造影イメージング、超音波－仲介薬物デリバリーおよび他のイメージング技法、たとえば分子共鳴イメージング（ＭＲＩ）または核イメージングの分野でのイメージングを高めるのに使用される。
【選択図】図１

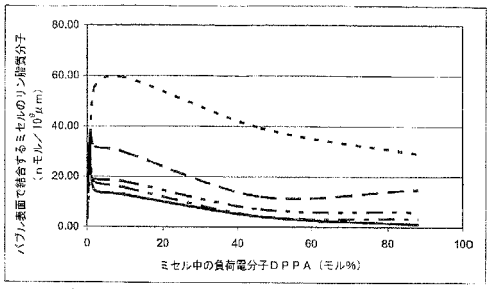


Figure 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
第１全正味電荷を帯びている気体封入マイクロベシクルおよびマイクロベシクルに会合している成分から成るアセンブリーであって、上記会合成分は第１全正味電荷と反対符号の第２全正味電荷を帯び、かつ生物学的適合性界面活性剤からなり、かつ１００ｎｍ以下の直径を有することを特徴とするアセンブリー。
【請求項２】
会合成分が８０ｎｍ以下の直径を有する請求項１に記載のアセンブリー。
【請求項３】
会合成分が５０ｎｍ以下の直径を有する請求項１に記載のアセンブリー。
【請求項４】
会合成分が標的配位子、対生物活性剤、診断剤またはこれらの組合せを含有する請求項１に記載のアセンブリー。
【請求項５】
さらに、全正味電荷を帯び、かつ必要に応じて別の標的配位子、対生物活性剤、診断剤またはこれらの組合せを含有する第２成分を包含する請求項４に記載のアセンブリー。
【請求項６】
第２成分が、マイクロベシクルの電荷と同じ符号の全正味電荷を帯びている請求項５に記載のアセンブリー。
【請求項７】
生物学的適合性界面活性剤が両親媒性物質である請求項１に記載のアセンブリー。
【請求項８】
生物学的適合性界面活性剤が、（C_2－C_{10}）有機酸、（C_{12}－C_{24}）脂肪族鎖を有する有機脂肪酸、その医薬的に許容しうる塩、ポリオキシエチレンとのそのエステル；ポリイオン性（アルカリ）塩；有機アミン；アミド；第四級アミン塩；アミノ酸；リン脂質；モノもしくはオリゴサッカリドと（C_{12}－C_{24}）有機脂肪酸のエステル；有機スルホネート；パーフルオロ有機酸；高分子界面活性物質；およびこれらの混合物の中から選ばれる請求項１に記載のアセンブリー。
【請求項９】
マイクロベシクルの１モル当りの電荷数と会合成分の１モル当りの電荷数の比が、約１０：１～１：１０である請求項１に記載のアセンブリー。
【請求項１０】
上記比が約３：１以下である請求項９に記載のアセンブリー。
【請求項１１】
上記比が約２：１以下である請求項９に記載のアセンブリー。
【請求項１２】
マイクロベシクルが、両親媒性薄膜形成化合物からなるエンベロープで安定化したマイクロバブルまたは有形のエンベロープを有するマイクロバルーンである請求項１に記載のアセンブリー。
【請求項１３】
マイクロベシクルを安定化するエンベロープに含まれる両親媒性薄膜形成化合物が、リン脂質である請求項１２に記載のアセンブリー。
【請求項１４】
エンベロープが、正または負の正味電荷を帯びているリン脂質もしくは脂質からなる請求項１３に記載のアセンブリー。
【請求項１５】
リン脂質もしくは脂質が、ホスファチジルセリン誘導体、ホスファチジン酸誘導体、ホスファチジルグリセロール誘導体、ポリエチレングリコール修飾ホスファチジルエタノールアミン、エチルホスファチジルコリン誘導体およびそれぞれのリゾ体；コール酸塩；デオキシコール酸塩；グリココール酸塩；その（C_{12}－C_{24}）脂肪酸塩；少なくとも１

つの（C_{10}－C_{20}）アルキル鎖を有するアルキルアンモニウム塩；（C_3－C_6）アルキレン橋を介して窒素原子に結合した少なくとも１つの（C_{10}－C_{20}）アシル鎖を有する第三または第四級アンモニウム塩；およびこれらの混合物から選ばれる請求項１４に記載のアセンブリー。

【請求項１６】

マイクロバルーンの有形のエンベロープが、ポリマー物質、蛋白様物質、水不溶性脂質またはこれらの混合物からなる請求項１２に記載のアセンブリー。

【請求項１７】

マイクロバルーンの有形のエンベロープが、イオン性生分解性ポリマーからなる請求項１２または１３に記載のアセンブリー。

【請求項１８】

マイクロバルーンの有形のエンベロープがさらに、正または負の正味電荷を帯びているリン脂質もしくは脂質を含有する請求項１３に記載のアセンブリー。

【請求項１９】

リン脂質もしくは脂質が、ホスファチジルセリン誘導体、ホスファチジン酸誘導体、ホスファチジルグリセロール誘導体、ポリエチレングリコール修飾ホスファチジルエタノールアミン、エチルホスファチジルコリン誘導体およびそれぞれのリゾ体；コール酸塩；デオキシコール酸塩；グリココール酸塩；その（C_{12}－C_{24}）脂肪酸塩；少なくとも１つの（C_{10}－C_{20}）アルキル鎖を有するアルキルアンモニウム塩；（C_3－C_6）アルキレン橋を介して窒素原子に結合した少なくとも１つの（C_{10}－C_{20}）アシル鎖を有する第三または第四級アンモニウム塩；およびこれらの混合物から選ばれる請求項１８に記載のアセンブリー。

【請求項２０】

マイクロベシクルに会合している成分がミセルである請求項１乃至６のいずれか１に記載のアセンブリー。

【請求項２１】

ミセルが、ポリエチレングリコール修飾リン脂質；少なくとも１つの（C_{10}－C_{20}）アルキル鎖を有するアルキルアンモニウム塩；（C_3－C_6）アルキレン橋を介して窒素原子に結合した少なくとも１つの（C_{10}－C_{20}）アシル鎖を有する第三または第四アンモニウム塩；（C_{12}－C_{24}）脂肪酸塩：高分子界面活性物質：またはこれらの混合物からなる請求項２０に記載のアセンブリー。

【請求項２２】

ミセルが、ホスファチジルコリン，エチルホスファチジルコリン，ホスファチジルグリセロール，ホスファチジン酸，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またはスフィンゴミエリンの（C_{12}－C_{24}）脂肪酸ジエステルからなる請求項２０に記載のアセンブリー。

【請求項２３】

ミセルが、正または負の正味電荷を帯びているリン脂質もしくは脂質、または高分子イオン性界面活性物質からなる請求項２０に記載のアセンブリー。

【請求項２４】

リン脂質もしくは脂質が、ホスファチジルセリン誘導体、ホスファチジン酸誘導体、ホスファチジルグリセロール誘導体、ポリエチレングリコール修飾ホスファチジルエタノールアミン、エチルホスファチジルコリン誘導体およびそれぞれのリゾ体；コール酸塩；デオキシコール酸塩；グリココール酸塩；その（C_{12}－C_{24}）脂肪酸塩；少なくとも１つの（C_{10}－C_{20}）アルキル鎖を有するアルキルアンモニウム塩；（C_3－C_6）アルキレン橋を介して窒素原子に結合した少なくとも１つの（C_{10}－C_{20}）アシル鎖を有する第三または第四級アンモニウム塩；およびこれらの混合物から選ばれる請求項２３に記載のアセンブリー。

【請求項２５】

マイクロベシクルに会合している成分が、コロイドナノ粒子である請求項１に記載のア

センブリー。
【請求項２６】
マイクロベシクルに会合している成分が、固体のポリマーナノ粒子である請求項１に記載のアセンブリー。
【請求項２７】
請求項１乃至２６のいずれか１に記載のアセンブリーを含有する生理的に許容しうる液体の水性懸濁液。
【請求項２８】
該アセンブリーの医薬的に許容しうる担体の水性懸濁液が、該アセンブリーを形成する気体封入マイクロベシクルの同じ担体中の水性懸濁液のζ－電位に対し絶対値で少なくとも５０％減少のζ（ゼータ）－電位を示す請求項１乃至２６のいずれか１に記載のアセンブリー。
【請求項２９】
該ζ－電位が、絶対値で少なくとも７５％の減少である請求項２８に記載のアセンブリー。
【請求項３０】
該ζ－電位が、絶対値で約１００％以上の減少である請求項２８に記載のアセンブリー。
【請求項３１】
ａ）第１成分として、第１全正味電荷を帯びている気体封入マイクロベシクル、もしくはその前駆体と、
ｂ）上記第１全正味電荷と反対符号の第２全正味電荷を帯び、上記マイクロベシクルに会合しうる第２成分、もしくはその前駆体
を別々に包含する製薬キットであって、上記成分は１００ｎｍ以下の直径を有することを特徴とする製薬キット。
【請求項３２】
さらに、医薬的に許容しうる液体担体を包含する請求項３１に記載の製薬キット。
【請求項３３】
第１および第２成分が、別々に凍結乾燥した調製品の形状にある請求項３２に記載の製薬キット。
【請求項３４】
ａ）第１成分として、第１全正味電荷を帯びている気体封入マイクロベシクル、もしくはその前駆体と、
ｂ）上記第１全正味電荷と反対符号の第２全正味電荷を帯び、上記マイクロベシクルに会合しうる第２成分、もしくはその前駆体
を含有する製薬キットであって、上記会合成分は生物学的適合性界面活性剤からなり、かつ１００ｎｍ以下の直径を有することを特徴とする製薬キット。
【請求項３５】
請求項１乃至２６のいずれか１に記載のアセンブリーを製造する方法であって、気体封入マイクロベシクルもしくはその前駆体を含有する調製品を、上記マイクロベシクルに会合すべき成分もしくはその前駆体を含有する調製品と混合することを特徴とするアセンブリーの製造法。
【請求項３６】
１）気体封入マイクロベシクルを含有する第１水性懸濁液を調製し；
２）上記気体封入マイクロベシクルに会合すべき成分を含有する第２水性懸濁液を調製し；次いで
３）該２つの懸濁液を混合して、該アセンブリーを含有する水性懸濁液を得る
ことから成る請求項３５に記載の製造法。
【請求項３７】
１）気体封入マイクロベシクルを含有する第１水性懸濁液を調製し；

２）該第一懸濁液を凍結乾燥して、第１凍結乾燥物を得；
３）上記気体封入マイクロベシクルに会合すべき成分を含有する第２懸濁液を調製し；
４）該第２懸濁液を凍結乾燥して、第２凍結乾燥物を得；次いで
５）該第１および第２凍結乾燥物を気体の存在下、生理的に許容しうる水性担体で再組成して、該アセンブリーを含有する水性懸濁液を得る
ことから成る請求項３５に記載の製造法。
【請求項３８】
工程５）が、
ａ）第２凍結乾燥物を生理的に許容しうる水性担体で再組成して、気体封入マイクロベシクルに会合すべき成分を含有する懸濁液を得；次いで
ｂ）第１凍結乾燥物を気体の存在下、該懸濁液で再組成する
工程からなる請求項３７に記載の製造法。
【請求項３９】
１）有機溶剤、リン脂質および分散保護剤を含有する水性エマルジョンを調製し；
２）気体封入マイクロベシクルに会合すべき成分を含有する水性懸濁液を調製し；
３）該水性懸濁液を上記水性エマルジョンと混合し；次いで
４）該混合物を凍結乾燥して水および有機溶剤を除去し、該アセンブリーを含有する凍結乾燥物を得る
ことから成る請求項３５に記載の製造法。
【請求項４０】
請求項６に記載のアセンブリーを製造する方法であって、請求項３５乃至３９のいずれか１に記載の製造法によって得られるアセンブリーに、気体封入マイクロベシクルの電荷と同じ符号の全正味電荷を帯びている第２成分を混合することを特徴とするアセンブリーの製造法。
【請求項４１】
医薬的に活性な配合物を製造するための、請求項１乃至２９のいずれか１に記載のアセンブリーの使用。
【請求項４２】
超音波診断イメージングの方法であって、請求項１乃至２６のいずれか１に記載のアセンブリーの水性懸濁液の造影増強量を投与することから成るイメージング法。
【請求項４３】
請求項１乃至２６のいずれか１に記載のアセンブリーのさらに対生物活性剤を含有する水性懸濁液の治療上有効量を投与することから成る治療処置の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、第１成分として気体封入マイクロベシクル（微小胞）（gas－filled microvesicle）および第２成分としてマイクロベシクルの外面に会合でき、これによってマイクロベシクルの物理化学的性質を変性する構造実体（structural entity）から成るアセンブリーに関する。該第２成分は必要に応じて、標的配位子、対生物活性剤（生体活性物質）、診断剤またはこれらのいずれかの組合せを含有してもよい。さらに本発明は、該アセンブリーを含有する配合物、該配合物の使用、該アセンブリーや配合物の製造法、および該アセンブリーを含有する診断キットに関する。本発明のアセンブリーは、診断上および／または治療上活性な配合物（製剤）の活性成分として、特に標的超音波イメージングを含む超音波造影イメージング（contrast imaging）および／または超音波－仲介薬物デリバリーおよび他のイメージング技法、たとえば分子共鳴イメージング（ＭＲＩ）または核イメージングの分野でのイメージングを高めるのに使用することができる。
【背景技術】
【０００２】
近年の超音波造影剤の急速な開発は、人体あるいは動物体の器官や組織の超音波イメー

ジングに有用な、種々幾つかの配合物（製剤）をもたらしている。これらの造影剤は主に、たとえばＢ－モード画像形成（後方散乱組織特性の空間的分布に基づく）またはドップラー・シグナルプロセシング（血液もしくは液体流パラメーターを測定する超音波エコーの持続波またはパルス処理ドップラープロセシングに基づく）を用いる、医療超音波検査装置の使用と共に、静脈内または動脈内への注射可能物質として使用できるようになっている。

超音波造影剤として有用な注射可能配合物の種類としては、数ミクロンの直径を有する気泡が水性媒体に分散した懸濁液が挙げられる。

【０００３】

有効な超音波レフレクターとして、担体液体中の気泡懸濁液の使用は、当該分野で周知である。超音波イメージングの向上のための超音波製剤（echopharmaceuticals）としてマイクロバブル懸濁液の開発は、水溶液の急静脈内注射によって溶解した気体がバブル形成により溶液から出てこれることの早期観測に追随した。血液との音響インピーダンスにおける実質的な差に基づき、これらの血管内気泡は超音波の優れたレフレクターであることがわかった。担体液体中の気泡懸濁液の、生きた生体の血流への注射は、超音波検査イメージングを強力に補強せしめ、これによって内部器官の可視化が高まる。器官や根深い組織のイメージングは、医療診断の確立が困難となりうるので、高濃度の気泡を有する安定な懸濁液（これは同時に調製や投与が簡単で、最小限の不活性種を含有し、かつ長期保存や簡素投与ができるものである）の開発に対し、多大な努力が払われている。

【０００４】

しかしながら、水性媒体中の自由気泡の単純な分散液は、実用的な重要性に限界があり、何故なら、これらの気泡は一般に、超音波造影剤として有用となるのに十分な安定性がないからである。

従って、超音波検査や他の超音波実験用の気泡をたとえば乳化剤、オイル、増粘剤もしくは糖を用いて安定化する方法、あるいは気体もしくはその前駆体を種々の系に閉じ込めもしくは封入による方法に対し、関心が示されるようになった。これらの安定化された気泡は一般に、当該分野において“マイクロベシクル（微小胞）”と称せられ、２つの主なカテゴリーに分けることができる。

【０００５】

安定化気泡もしくはマイクロベシクルの第１カテゴリーは一般に、当該分野において、“マイクロバブル（microbubbles）”と称せられ、気体と液体界面に位置する安定化両親媒性物質を必要とする非常に薄いエンベロープ（envelope、囲い）（薄膜）によって、気体／液体界面で気体のバブルとバブルの結合している水性懸濁液が挙げられる。マイクロバブル懸濁液は典型例として、粉末の両親媒性物質、たとえば凍結乾燥した予備形成リポソームまたは凍結乾燥もしくは噴霧乾燥リン脂質溶液を、空気または他の気体と接触、次いで水性担体と接触させ、その間攪拌しながらマイクロバブル懸濁液を生成することによって製造され、次いでこれを好ましくはその製造のすぐあとに投与することができる。

【０００６】

気体マイクロバブルの水性懸濁液の具体例およびその製法は、たとえばＵＳ５２７１９２８、ＵＳ５４４５８１３、ＵＳ５４１３７７４、ＵＳ５５５６６１０、５５９７５４９、ＵＳ５８２７５０４およびＷＯ０４／０６９２８４に開示されている。

マイクロベシクルの第２カテゴリーは一般に、当該分野において、“マイクロバルーン（microballoons）”または“マイクロカプセル（microcapsules）”と称せられ、気体のバブルが脂質または天然もしくは合成ポリマーの固体物質エンベロープで包囲されている懸濁液が挙げられる。マイクロバルーンの具体例およびその製法は、たとえばＵＳ５７１１９３３およびＵＳ６３３３０２１に開示されている。

【０００７】

全正味電荷（overall net charges）を帯びているマイクロベシクルも公知であり（たとえば国際特許出願ＷＯ９７／２９７８３参照）；これらのマイクロベシクルの外部エンベロープは、最終マイクロベシクルに所望の全電荷を付与しうるイオン性化合物を含有す

る。
これらの気体封入マイクロベシクルの配合物に加えて、より最近では、診断効果の改善および／または治療目的のため、気体封入マイクロベシクルの変性配合物の方への関心も示されている。
【０００８】
たとえば、マイクロベシクルは、患者の体内の限定標的、たとえば特定病原部位に結合しうる特定成分（“標的配位子”として公知）と会合することができる（たとえばその境界エンベロープにおける混入により）。これらの配合物は一般に、当該分野において、“標的マイクロベシクル”として知られている。標的マイクロベシクルの具体例、標的配位子の具体例およびそれらの製法は、たとえば国際特許出願ＷＯ９８／１８０５１に開示されている。
【０００９】
変性配合物の別の具体例は、治療剤がマイクロベシクルと会合しているものである。マイクロベシクルを含有する配合物が病原部位に到達すると、たとえば該マイクロベシクルを破裂しうる制御音響エネルギーを加えることによって、薬物を有利に放出させることができ、このようにして治療剤は局所放出される。この技法は一般に、当該分野において、“超音波－仲介薬物放出”として知られている。治療剤を含有するマイクロベシクル配合物の具体例は、たとえば国際特許出願ＷＯ９４／２８８７３に開示されている。
【００１０】
当該分野でのさらなる発展は、マイクロベシクルが、所望の治療剤あるいは標的化合物を有する第２成分と会合しているアセンブリーの製造に導いた。
たとえばＷＯ９９／３９７３８に、気体封入マイクロベシクルおよび該マイクロベシクルと会合する液体封入リポソームから成るアセンブリーが開示され、この場合のリポソームは、中に治療上活性な物質を含有する。リポソームは、マイクロベシクルとの単なる混合によって、あるいは結合対間の結合を介してマイクロベシクルと会合し、マイクロベシクルおよびリポソームのそれぞれに、上記対の各相補部分（たとえばビオチンとアビジンまたはストレプトアビジン），２つの内１つを有する成分が備えられている。
【００１１】
ＷＯ０３／０１５８３１に、気体封入マイクロベシクル（この出願では“微小球”）がリポソームに会合して成る配合物（微小球－リポソーム複合物と称す）が開示されている。該複合物のリポソームは、薬物および／または標的部分を含有しうる。複合物を形成するマイクロベシクルとリポソームは、同じ出発物質から作られ；複合物は、脂質混合物を含有する水溶液を調製し、該水溶液を所望の気体を有する密封バイアルに入れ、最後に水溶液をかきまぜることにより得られる。すなわち、このようにして得られる複合物は、同じ化学的性質を有するマイクロベシクルとリポソームの単純な混合物である。特にこの出願明細書には、マイクロベシクルとリポソーム間の特異的な化学的または物理的相互作用の開示はない。
【００１２】
さらに、国際特許出願ＷＯ９９／５３９６３に、水性媒体に分散しかつある物質で安定化された気体封入マイクロベシクルを含有する第１組成物と、エマルジョンを安定化する物質を含有する油／水型エマルジョンである第２組成物から成る組合せ配合物が開示されている。マイクロベシクルと分散油相を安定化する表面物質は、相互の親和力を有する。１つの実施態様において、上記親和力は反対電荷を持つ表面物質の使用によって得られ、この結果、両表面物質は相互作用し、かつ互いに静電気で結合する。
【００１３】
別法として、会合（association）の各表面物質は、化学的または生物学的結合による相互作用の可能な化合物を包含しうる。エマルジョンのオイルは、インビボで気体または蒸気圧を生成しうる物質であり、“拡散可能成分”と称せられる。上記乳化物質の液体粒子とマイクロベシクルの会合は、該物質からの気体または蒸気分子の内方拡散を介して、マイクロベシクルにおける分散気相の制御可能な生長を決定することができる。

【発明の概要】
【００１４】
そこで本発明者らは、医薬的に活性な配合物に用いる新規なアセンブリーを見出したが、該アセンブリーは、実質的な静電相互作用によって第２成分に会合している気体封入マイクロベシクルを含有し、該第２成分は必要に応じて、標的配位子、対生物活性剤、診断剤またはこれらのいずれかの組合せを含有する。
【００１５】
本発明の１つの側面は、第１全正味電荷を帯びている気体封入マイクロベシクルおよび該マイクロベシクルに会合している成分から成るアセンブリーであって、上記会合成分は第１全正味電荷と反対符号の第２全正味電荷を帯び、かつ生物学的適合性界面活性剤からなり、かつ１００ｎｍ以下の直径を有することを特徴とするアセンブリーに関する。
【００１６】
好ましい実施態様によれば、上記会合成分は標的配位子、対生物活性剤、診断剤またはこれらの組合せを含有する。
好ましくは、上記界面活性剤は乳化剤、分散剤またはこれらの組合せであって、特に好ましいのは両親媒性物質である。
【００１７】
本明細書の以下の説明で、アセンブリーの第２成分はマイクロベシクルの会合成分（“ＭＡＣ”）と称せられる。
本発明の実施態様によれば、超音波造影剤は、複数のアセンブリーが医薬的に許容しうる水性担体に分散した懸濁液の形状にある。
本発明の他の実施態様によれば、超音波造影剤は、凍結乾燥した組成物の形状にある。
【００１８】
本発明の別の側面は、上記アセンブリーを製造する方法であって、気体封入マイクロベシクルもしくはその前駆体を含有する調製品を、上記第２成分もしくはその前駆体を含有する調製品と混合することを特徴とするアセンブリーの製造法に関する。
【００１９】
本願の目的のため、語句“気体封入マイクロベシクルの前駆体”とは、その意義の範囲内で、気体封入マイクロベシクルの懸濁液を形成しうる、中間体物質、組成物、配合物または構造物のいずれかを包含し、たとえば、水性媒体で再組成されて上記マイクロベシクル懸濁液を形成しうる凍結乾燥配合物、あるいは凍結乾燥プロセスに付されて凍結乾燥生成物を得、次いで水性担体で再組成されて上記マイクロベシクル懸濁液を形成しうるミクロエマルジョンが挙げられる。
【００２０】
同様に、語句“第２成分の前駆体”とは、第２成分を形成しうる、中間体物質、組成物、配合物または構造物のいずれかを包含し、たとえば上記ＭＡＣを含有する水性懸濁液に再組成可能な凍結乾燥組成物が挙げられる。
【００２１】
本発明の実施態様によれば、本発明のアセンブリーは、
１）気体封入マイクロベシクルを含有する第１水性懸濁液を調製し；
２）上記気体封入マイクロベシクルに会合すべき成分を含有する第２水性懸濁液を調製し；次いで
３）該２つの懸濁液を混合して、該アセンブリーを含有する水性懸濁液を得る
ことにより得ることができる。
【００２２】
必要に応じて、第１および／または第２懸濁液の調製後に、洗浄工程を含ませることができる。最終懸濁液の洗浄工程も、必要に応じて行なうことができる。語句“洗浄工程”とは、その意義の範囲内で、所望化合物（たとえばマイクロベシクル、ＭＡＣまたはアセンブリー）の懸濁液から、過剰の非会合物質、成分、粒子等を分離および／または少なくとも部分的に除去する目的に向けられる方法またはプロセスのいずれかを包含する。適当

な分離法としては、たとえばデカンテーション、遠心分離、限外濾過またはマイクロ濾過が挙げられる。

【００２３】

別の実施態様によれば、本発明のアセンブリーは、

１）気体封入マイクロベシクルを含有する第１水性懸濁液を調製し；

２）該第１懸濁液を凍結乾燥して、第１凍結乾燥物を得；

３）上記気体封入マイクロベシクルに会合すべき成分を含有する第２懸濁液を調製し；

４）該第２懸濁液を凍結乾燥して、第２凍結乾燥物を得；次いで

５）該第１および第２凍結乾燥物を気体の存在下、生理的に許容しうる水性担体で再組成して、該アセンブリーを含有する水性懸濁液を得る

ことにより得ることができる。

【００２４】

必要に応じて、第１および／または第２懸濁液の調製後に、洗浄工程を含ませることができる。最終懸濁液の洗浄工程も、必要に応じて行なうことができる。

好ましい実施態様によれば、該製造プロセスの最終工程５）は、ａ）第２凍結乾燥物を生理的に許容しうる水性担体で再組成して、気体封入マイクロベシクルに会合すべき成分を含有する懸濁液を得；次いでｂ）第１凍結乾燥物を気体の存在下、該懸濁液で再組成する工程からなる。

【００２５】

さらに好ましい実施態様によれば、該アセンブリーは、

１）水不混和性有機溶剤、リン脂質および分散保護剤（lyoprotecting agent）を含有する水性エマルジョンを調製し；

２）気体封入マイクロベシクルに会合すべき成分を含有する水性懸濁液を調製し；

３）該水性懸濁液を上記エマルジョンと混合し；次いで

４）該混合物を凍結乾燥して水および有機溶剤を除去し、該アセンブリーを含有する凍結乾燥物を得る

ことにより、凍結乾燥組成物として得られる。

【００２６】

得られる凍結乾燥物は、再組成して本発明のアセンブリーを含有する水性懸濁液とすることができるが、これは、該凍結乾燥物を気体および水性担体の存在下でかきまぜることによる。

本発明の他の側面は、必要に応じて標的配位子を含有する上述のアセンブリーの水性懸濁液の造影を高める量を投与することから成る超音波診断イメージング法に関する。

【００２７】

さらに本発明の他の側面は、対生物活性剤を含有する上述のアセンブリーの水性懸濁液の治療上有効量を投与することから成る治療法に関する。

さらにまた本発明の他の側面は、上記アセンブリーの各成分を以下に示す形態で含有する製薬キットに関する：

ａ）マイクロベシクルとＭＡＣｓの２つの別々の懸濁液で；

ｂ）必要に応じて再組成用の水性担体と共に、２つの成分の別々の凍結乾燥調製品で；または

ｃ）再組成用の水性担体と共に、アセンブリーの凍結乾燥調製品で。

【００２８】

本発明に係るアセンブリーの利点は、マイクロベシクルのエンベロープの形成に一般に用いられる通常の成分を使用してＭＡＣを得ることができ、しかも、上記エンベロープに追加の成分もしくは部分を導入する必要がなく、さもないと、マイクロベシクルの安定性を害しうることになる。

【００２９】

得られるアセンブリーは、これをいったん患者の体に投与すれば、気体封入マイクロベシクルの挙動（たとえば血流循環からのクリアランス速度など）を有利に改変または調節

することができる。たとえば、正荷電マイクロベシクルと負荷電ＭＡＣｓを含有するアセンブリーを用いて、正荷電マイクロベシクルの調製品を投与することができ、しかし、これはいったん体内では、負荷電マイクロベシクルと同じ挙動を示すだろう。

【００３０】

別法として、負荷電マイクロベシクルと正荷電ＭＡＣｓを含有するアセンブリーを用いて、負荷電マイクロベシクルの調製品を投与することができ、しかし、これはいったん体内では、正荷電マイクロベシクルと同じ挙動を示すだろう。加えて、所望の標的化合物または医薬活性剤をマイクロベシクルに対し、その安定性（特に気体を包囲する境界層の安定性）を害せずに会合することができ、現実に、標的化合物または医薬活性剤は、アセンブリーの第２成分に会合しており、安定性は標的化合物または医薬活性剤の存在によって実質的に影響されない。

【００３１】

本発明の他の利点は、異なる目的用の種々アセンブリーの製造における非常な柔軟性である。実際、単一基本調製品の荷電マイクロベシクルは、特定の診断／治療ニーズに応じて、異なる反対電荷のＭＡＣｓに対し、必要ならば同時に２回以上会合することができる。たとえば、マイクロベシクルの調製品に対し、標的配位子（たとえばアセンブリーを特定の病原部位に結合させるため）を有する第１調製品のＭＡＣと、対生物活性剤（いったんこれにアセンブリーが結合すると、特定病原部位で放出されうる）を含む第２調製品のＭＡＣを会合させることができる。

【００３２】

加えて、本発明者らは、本発明のアセンブリーが、該マイクロベシクル単独に比し高い耐圧性を示しうることを認識した。

添付図面において、図１は、同じ物質（材料）からなるが量が異なる、マイクロベシクルとＭＡＣｓで形成される種々アセンブリーの組成を示すグラフである。図２および３は、荷電マイクロベシクルのインビボ挙動および該マイクロベシクルと反対電荷のＭＡＣｓを持つ対応アセンブリーのインビボ挙動を示す。

【００３３】

（発明の詳細）

本発明に係るアセンブリーは典型例として、全正味電荷を帯びている気体封入マイクロベシクルの形状の第１成分（“担体”成分ともみなす）および該担体成分（ＭＡＣ）と会合し１００ｎｍ以下の直径を有し、第１成分と反対符号の全正味電荷を帯び、かつ界面活性剤、特に乳化剤および／または分散剤、より好ましくは両親媒性化合物の少なくとも１種からなる第２成分から成る。

好ましくは、ＭＡＣは所望の標的配位子、対生物活性剤、診断剤またはこれらの組合せを含有する。

【００３４】

マイクロベシクルの会合成分（ＭＡＣ）は好ましくは、界面活性剤１種以上の複数分子の会合によって形成される安定な超分子構造の形状にある。好ましくは、上記超分子構造物は、正味電荷を帯びている界面活性剤、より好ましくはイオン性界面活性剤の少なくとも１種からなる。上記安定な超分子構造はたとえば、上記各分子の疎水性部間の疎水性相互作用によって決定することができる。特に好ましい実施態様によれば、ＭＡＣはミセルの形状にある。別法として、ＭＡＣは、必要に応じて適当な標的、対生物活性および／または診断成分を含有するのに官能化された、高分子イオン性界面活性物質の単一分子によって形成することができる。

【００３５】

本発明のアセンブリーは、診断および／または治療法に用いる医薬的に活性な配合物の製造に有用である。

語句“医薬的に活性な配合物”とは、その意義の範囲内において、患者に有効量を投与すると医薬効果（たとえば診断、生体活性および／または治療効果）を発揮しうる、診断活性、生体活性および／または治療活性な配合物を含むまたはその前駆体のいずれをも包

含する。同様に、化合物、作用物質（剤）またはキットに対して称するときの語句“医薬的に活性なもの”とは、その意義の範囲内において、診断、生体活性および／または治療化合物、作用物質またはキットを包含する。

【００３６】

語句“標的配位子”とは、その意義の範囲内において、生きている体内の生物学または病理学部位への本発明アセンブリーの標的活性を有するまたは該標的活性を促進しうる化合物、成分（部分）また残余（残基）のいずれをも包含する。標的配位子が会合しうる標的としては、たとえば心筋組織（心筋細胞を含む）、膜様組織（内皮および上皮を含む）、板、結合組織（間隙組織を含む）または腫瘍などの組織；血餅；およびペプチドホルモン、神経伝達物質、抗原、補体フラグメントおよび免疫グロブリンの細胞表面レセプタやステロイドホルモンの細胞質レセプタなどのレセプタが挙げられる。

【００３７】

語句“対生物活性剤”とは、その意義の範囲内において、いずれかの治療用途、たとえば患者の病気の処置のための方法で使用しうる物質、組成物または粒子のいずれも、並びにインビトロおよび／またはインビボで生物学的効果を発揮しうるまたは発揮能力がある物質のいずれも包含する。対生物活性剤の具体例は、薬物、製薬、たん白質、天然もしくは合成ペプチド（オリゴペプチドおよびポリペプチドを含む）、ビタミン、ステロイドおよび遺伝子物質（ヌクレオシド、ヌクレオチドおよびポリヌクレオチドを含む）である。患者の治療法または処置としては、たとえば対生物活性剤の使用が挙げられる。

【００３８】

語句“診断剤”とは、その意義の範囲内において、患者の内部領域のイメージングおよび／または患者の病気の有無の診断を含む診断法と共に使用しうる化合物、組成物または粒子のいずれも包含する。診断剤の具体例としては、たとえば磁気共鳴イメージング、Ｘ線イメージング、特に患者のコンピューター使用Ｘ線断層撮影法、光学イメージングまたは分子イメージングと共に用いる造影剤を包含し、たとえば磁気ナノ粒子が挙げられる。

【００３９】

“生物学的適合性”または“生理的に許容しうる”とは、患者に対し選択した量で、その生体の健康なまたは正常な機能に消極的な影響を及ぼしたりあるいは該機能を少し変えたりすることなく（たとえば許容できない毒性のいずれかの状態を決定したり、極度のもしくは手に負えないアレルギー性レスポンスを起こしたりあるいはいずれかの異常な病的症状もしくは疾患状態を決定したりすることなく）、投与できる化合物、物質または配合物のいずれも指称する。

【００４０】

語句“界面活性剤”とは、そうでなければ一般に混和しない物質の混合物、たとえば２つの不混和性液体（たとえば水と油）の混合物、気体を有する液体混合物（たとえば水中の気体マイクロバブル）または不溶粒子を有する液体混合物（たとえば水中の金属ナノ粒子）を安定化しうる化合物のいずれをも指称する。これらの化合物は概して、当該分野で“乳化剤”または“分散剤”とも称せられる。該化合物は好ましくは、“両親媒性化合物”、すなわち、親水性極性頭部（たとえば極性もしくはイオン性基）と疎水性有機尾部（たとえば炭化水素鎖）を持つ分子を有する化合物である。

【００４１】

界面活性剤、特に乳化剤および／または分散剤の具体例は、（C_2－C_{10}）有機酸、（C_{12}－C_{24}）、好ましくは（C_{14}－C_{22}）脂肪族鎖を有する有機脂肪酸、その医薬的に許容しうる（アルカリ）塩、ポリオキシエチレンとのそのエステル、たとえばパルミチン酸、ステアリン酸、アラキドン酸、オレイン酸、ドデカン酸ナトリウム、シュウ酸もしくは酒石酸ナトリウムまたはポリオキシエチレン脂肪酸ステアレート；ポリイオン性（アルカリ）塩、たとえばクエン酸ナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、リン酸ナトリウム；好ましくは（C_8－C_{22}）炭化水素鎖（そのポリオキシエチル化誘導体を含む）を含有する、有機アミン、アミド、第四級アミン（ハライド）塩、たとえばエタノールアミン、トリエタノールアミン、アルキルアミン、アルカノールアミド、トリメチルア

ルキルアミンクロリド、ポリオキシエチル化アルキルアミン、ポリオキシエチル化アルカノールアミド；

【００４２】

アミノ酸；リン脂質、たとえばホスファチジルコリン，エチルホスファチジルコリン，ホスファチジルグリセロール，ホスファチジン酸，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もしくはスフィンゴミエリンの脂肪酸ジエステル；モノもしくはオリゴサッカリドと（C_{12}－C_{24}）、好ましくは（C_{14}－C_{22}）有機脂肪酸のエステル、たとえばソルビタンラウレート；高分子界面活性物質、すなわち、疎水性および親水性部分を含有するブロックコポリマー、たとえばエチレンオキシド／プロピレンオキシドブロックコポリマー；有機スルホネート、たとえばアルカリ（たとえばナトリウム）（C_{12}－C_{24}）アルキル、好ましくは（C_{14}－C_{22}）アルキルスルホネート；パーフルオロ有機酸、たとえばパーフルオロオクタン酸；およびこれらの混合物である。

【００４３】

またＭＡＣは、そのナノメートル寸法のため、ミクロメートル寸法を有するマイクロベシクルとは対照的に、該アセンブリーのナノ成分と呼ばれることもある。マイクロベシクルは典型例として、少なくとも０．５μｍ、好ましくは０．８～２０μｍ、より好ましくは約１～８μｍの寸法を有し；たとえばコウルター・カウンター（Coulter Counter）で測定した、マイクロベシクルの数平均直径（D_N）は、好ましくは少なくとも０．８μｍ、より好ましくは少なくとも１μｍ（約８μｍ以下）、さらにより好ましくは約１～５μｍである。

【００４４】

一般に、製造のそれぞれの方法に応じて、マイクロベシクルおよびＭＡＣｓは、幾分狭い寸法分布を持つ粒子の母集団で得られる。従って、異なる母集団のマイクロベシクルやＭＡＣｓを比較する場合、通常、上記分布の平均値を用いる。当業者によって知られているように、ミクロ／ナノ粒子の寸法およびその各粒度分布は、幾つかのパラメーターで特性決定することができ、最も頻繁に用いられているパラメーターは、数平均直径D_N、数中央直径D_{N50}、容量平均直径D_Vおよび容量中央直径D_{V50}である。

【００４５】

数の上での寸法は、粒子の平均数寸法を表示するが、容量における直径は、総容量の粒子が母集団全体の中でどのように分布しているかを知らせる。小容量粒子の母集団におけるそうでない大容量粒子の極くわずかな存在は、対応するD_V値を高値へシフトさせるので、粒子母集団の分布を評価するのに、D_{V50}値の使用が時としてより好都合なことがある。

【００４６】

D_{V50}は、粒子の総内部容量の半分がD_{V50}より低い直径を有する粒子に存在していることを示す計算値であり；これは粒度分布の評価において、偶然に形成した大容量粒子の効果を減少せしめる。単一の大きさを持つ粒子は明らかに、同一のD_N、D_{N50}、D_VおよびD_{V50}値を示す。一方、粒子分布の幅が広くなると、これらの各種値に大きな差が生じ、これに対応してこれらのそれぞれの比が変化するだろう（たとえばD_V／D_N比の増加）。たとえば、主として小粒子（たとえば直径約２μｍの粒子）を含有し、大粒子（たとえば直径約８μｍの粒子）の割合が小さい粒子母集団は、D_N値と比べて高いD_VまたはD_{V50}値を示し、これに対応してD_V／D_NまたはD_{V50}／D_N比が高くなる。

【００４７】

アセンブリーの２成分間の静電相互作用は、第１正味電荷を帯びている第１分子化合物（マイクロベシクルのエンベロープに含まれる）と、第１分子化合物と反対符号の第２正味電荷を帯びている第２分子化合物（ＭＡＣの構造に含まれる）の使用によって得られる。そして、第１全正味電荷を有するマイクロベシクルと、第１電荷と反対符号の第２全正味電荷を有するＭＡＣとが、静電相互作用を介して、相互に会合して、本発明に係るアセンブリーが得られる。

【００４８】
本発明に係るアセンブリーの第１成分を構成する気体封入マイクロベシクルは、全正味電荷を帯びている当該分野で公知のいずれのマイクロベシクルであってもよい。マイクロベシクルの好ましい具体例は、マイクロバブルおよびマイクロバルーン（またはマイクロカプセル）である。
【００４９】
マイクロバブル
適当な気体封入マイクロベシクルの第１例を、以下、“気体封入マイクロバブル”と称する。
本発明に係るアセンブリーの製造に有用な気体封入マイクロバブルは一般に、気体が水性懸濁液に分散したバブルであって、気体／液体界面に位置する、両親媒性（薄膜形成）化合物からなる（非常に薄い）エンベロープで安定化されている。上記安定化のエンベロープは、当該分野で時々“きゃしゃな（evanescent）エンベロープ”と呼ばれているが、これは一般に、５ｎｍ以下、たとえば約２～３ｎｍの厚みを有し、このため、多くの場合実質的な単分子層となる。エンベロープに含まれる両親媒性物質の少なくとも一部は、マイクロベシクルのエンベロープに所望の全正味電荷を付与できるように、荷電分子からなる。
【００５０】
マイクロベシクルのエンベロープに含まれる両親媒性化合物は、合成または天然産出の生物学的適合性化合物であってよく、たとえば薄膜形成脂質、特にリン脂質を包含しうる。両親媒性化合物の具体例としては、リン脂質；リゾ脂質；脂肪酸、たとえばパルミチン酸、ステアリン酸、アラキドン酸またはオレイン酸；たとえばキチン、ヒアルロン酸、ポリビニルピロリドンまたはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）などのポリマー含有の脂質（“ペジル化(pegylated)脂質”とも呼ばれる）；スルホン化モノ、ジ、オリゴまたはポリサッカリド含有の脂質；コレステロール、コレステロール・スルフェートまたはコレステロール・ヘミスクシネート；トコフェロール・ヘミスクシネート；エーテルまたはエステルを持つ脂質－結合脂肪酸；重合脂質；ジアセチルホスフェート；ジセチルホスフェート；ステアリルアミン；セラミド；
【００５１】
ポリオキシエチレン脂肪酸エステル（たとえばポリオキシエチレン脂肪酸ステアレート）、ポリオキシエチレン脂肪アルコール、ポリオキシエチレン脂肪アルコールエーテル、ポリオキシエチル化ソルビタン脂肪酸エステル、グリセロールポリエチレングリコール・リシノールエート、エトキシル化大豆ステロール、エトキシル化ヒマシ油またはエチレンオキシド（ＥＯ）およびプロピレンオキシド（ＰＯ）ブロックコポリマー；ステロール脂肪族酸エステル（コレステロールブチレート、コレステロールイソブチレート、コレステロールパルミテート、コレステロールステアレート、ラノステロールアセテート、エルゴステロールパルミテート、またはフィトステロールｎ－ブチレート；糖酸のステロールエステル（コレステロールグルクロニド、ラノステロールグルクロニド、７－デヒドロコレステロールグルクロニド、エルゴステロールグルクロニド、コレステロールグルコネート、ラノステロールグルコネート、またはエルゴステロールグルコネートを含む）；
【００５２】
糖酸およびアルコールのエステル（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、ラウリルグルコネート、ミリストイルグルコネート、またはステアロイルグルコネートを含む）；糖と脂肪族酸のエステル（スクロースラウレート、フラクトースラウレート、スクロースパルミテート、スクロースステアレート、グルクロン酸、グルコン酸またはポリウロン酸を含む）；サポニン（サルササポゲニン、スミラゲニン、ヘデラゲニン、オレアノール酸、またはジギトキシゲニンを含む）；グリセロールまたはグリセロールエステル（グリセロールトリパルミテート、グリセロールジステアレート、グリセロールトリステアレート、グリセロールジミリステート、グリセロールトリミリステート、グリセロールジラウレート、グリセロールトリラウレート、グリセロー

ルジパルミテートを含む）；
【００５３】
長鎖アルコール（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、またはｎ－オクタデシルアルコールを含む）；６－（５－コレステン－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－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；
【００５４】
Ｎ－スクシニル－ジオレイルホスファチジルエタノールアミン；１，２－ジオレイル－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またはパルミトイルホモシステイン；少なくとも１つの（C_{10}－C_{20}）、好ましくは（C_{14}－C_{18}）アルキル鎖を有するアルキルアンモニウム塩、たとえばステアリルアンモニウムクロリド、ヘキサデシルアンモニウムクロリド、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド（ＤＤＡＢ）、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド（ＣＴＡＢ）；
【００５５】
１または好ましくは２つの（C_{10}－C_{20}）、好ましくは（C_{14}－C_{18}）アシル鎖が（C_3－C_6）アルキレン橋を介してＮ原子に結合している第三または第四級アンモニウム塩、たとえば１，２－ジステアロイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＳＴＡＰ）、１，２－ジパルミトイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＰＴＡＰ）、１，２－オレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＴＡＰ）、１，２－ジステアロイル－３－ジメチルアンモニウム－プロパン（ＤＳＤＡＰ）；およびこれらの混合物もしくは組合せ
が挙げられる。
【００５６】
成分の組合せやマイクロベシクルの製造プロセスに基づき、マイクロベシクルのエンベロープを形成する主な化合物として、あるいは単なる添加成分（すなわち、ほんの少量で存在）として、上記列挙した具体的な化合物を使用することができる。
【００５７】
好ましい実施態様によれば、マイクロベシクルのエンベロープを形成する化合物の少なくとも１つは、必要に応じて他の上記薄膜形成物質と混合してもよいリン脂質である。本明細書の記載によれば、語句リン脂質とは、その分子が最終のマイクロバブル懸濁液において気体－水境界界面で物質（材料）の安定化薄膜（典型例として単分子層の形状で）を形成しうる、両親媒性リン脂質化合物のいずれも包含することが意図される。
【００５８】
従って、これらの物質も当該分野において、“薄膜形成リン脂質”と称せられる。
両親媒性リン脂質化合物は典型例として、少なくとも１つのホスフェート基と少なくとも１つ、好ましくは２つの脂肪親和性長鎖炭化水素基を含有する。
【００５９】
適当なリン脂質の具体例としては、グリセロールと、脂肪酸の１つまたは好ましくは２つ（同一または異なる）残基とのエステルおよびリン酸とのエステル［ここで、リン酸残基は順次、親水性基、たとえばコリン（ホスファチジルコリン，ＰＣ）基、セリン（ホスファチジルセリン，ＰＳ）基、グリセロール（ホスファチジルグリセロール，ＰＧ）基、エタノールアミン（ホスファチジルエタノールアミン，ＰＥ）基、イノシトール（ホスファチジルイノシトール）基等に結合する］が挙げられる。

【００６０】
リン脂質と脂肪酸のたった１つの残基とのエステルは一般に、当該分野でリン脂質の“リゾ”体と呼ばれる。リン脂質に存在する脂肪酸残基は一般に、たとえば１２～２４の炭素原子、好ましくは１４～２２の炭素原子を含有する長鎖脂肪族酸であり；脂肪族鎖は１つ以上の不飽和を含有してもよく、あるいは完全飽和が好ましい。
【００６１】
リン脂質に含まれる適当な脂肪酸の具体例は、たとえばラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキドン酸、ベヘニン酸、オレイン酸、リノール酸およびリノレン酸である。好ましくは、飽和脂肪酸、たとえばミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸およびアラキドン酸が使用される。
【００６２】
リン脂質のさらなる具体例は、ホスファチジン酸、すなわち、グリセロール－リン酸と脂肪酸のジエステル；スフィンゴミエリンなどのスフィンゴ脂質、すなわち、脂肪酸によるグリセロールジエステルの残基がセラミド鎖で置換されたホスファチジルコリン誘導体；カルジオリピン、すなわち、１,３－ジホスファチジルグリセロールと脂肪酸のエステル；グリコ脂質、たとえばガングリオシドＧＭ１（またはＧＭ２）またはセレブロシド；グルコ脂質；スルファチドおよびグリコスフィンゴ脂質である。
【００６３】
本明細書で用いる語句リン脂質とは、単独または混合物で使用できる、天然産出生成物、半合成または合成の製造生成物のいずれも包含する。
天然産出リン脂質の具体例は、たとえば大豆または卵黄レシチンなどの天然レシチン（ホスファチジルコリン（ＰＣ）誘導体）である。
【００６４】
半合成リン脂質の具体例は、天然産出レシチンの部分または完全水素化誘導体である。好ましいリン脂質は、ホスファチジルコリン，エチルホスファチジルコリン，ホスファチジルグリセロール，ホスファチジン酸，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またはスフィンゴミエリンの脂肪酸ジエステルである。
【００６５】
好ましいリン脂質の具体例は、ジラウロイル－ホスファチジルコリン（ＤＬＰＣ）、ジミリストイル－ホスファチジルコリン（ＤＭＰＣ）、ジパルミトイル－ホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジアラキドイル－ホスファチジルコリン（ＤＡＰＣ）、ジステアロイル－ホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、ジオレオイル－ホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、１,２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－エチルホスフォコリン（エチル－ＤＳＰＣ）、ジペンタデカノイル－ホスファチジルコリン（ＤＰＤＰＣ）、１－ミリストイル－２－パルミトイル－ホスファチジルコリン（ＭＰＰＣ）、１－パルミトイル－２－ミリストイル－ホスファチジルコリン（ＰＭＰＣ）、１－パルミトイル－２－ステアロイル－ホスファチジルコリン（ＰＳＰＣ）、１－ステアロイル－２－パルミトイル－ホスファチジルコリン（ＳＰＰＣ）、１－パルミトイル－２－オレイル－ホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、１－オレイル－２－パルミトイル－ホスファチジルコリン（ＯＰＰＣ）、ジラウロイル－ホスファチジルグリセロール（ＤＬＰＧ）およびそのアルカリ金属塩、
【００６６】
ジアラキドイルホスファチジルグリセロール（ＤＡＰＧ）およびそのアルカリ金属塩、ジミリストイルホスファチジルグリセロール（ＤＭＰＧ）およびそのアルカリ金属塩、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（ＤＰＰＧ）およびそのアルカリ金属塩、ジステアロイルホスファチジルグリセロール（ＤＳＰＧ）およびそのアルカリ金属塩、ジオレオイル－ホスファチジルグリセロール（ＤＯＰＧ）およびそのアルカリ金属塩、ジミリストイルホスファチジン酸（ＤＭＰＡ）およびそのアルカリ金属塩、ジパルミトイルホスファチジン（ＤＰＰＡ）およびそのアルカリ金属塩、ジステアロイルホスファチジン酸（ＤＳＰＡ）、ジアラキドイルホスファチジン酸（ＤＡＰＡ）およびそのアルカリ金属塩、
【００６７】

ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＭＰＥ）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、ジステアロイルホスファチジル－エタノールアミン（ＤＳＰＥ）、ジオレイルホスファチジル－エタノールアミン（ＤＯＰＥ）、ジアラキドイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＡＰＥ）、ジリノレイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＬＰＥ）、ジミリストイルホスファチジルセリン（ＤＭＰＳ）、ジアラキドイルホスファチジルセリン（ＤＡＰＳ）、ジパルミトイルホスファチジルセリン（ＤＰＰＳ）、ジステアロイルホスファチジルセリン（ＤＳＰＳ）、ジオレオイルホスファチジルセリン（ＤＯＰＳ）、ジパルミトイルスフィンゴミエリン（ＤＰＳＰ）、およびジステアロイルスフィンゴミエリン（ＤＳＳＰ）である。

【００６８】

語句リン脂質はさらに、修飾リン脂質、たとえば親水性基が順次別の親水性基に結合するリン脂質を包含する。修飾リン脂質の具体例は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）で修飾したホスファチジルエタノールアミン、すなわち、親水性エタノールアミン成分が可変分子量たとえば３００～５０００ダルトンのＰＥＧ分子に結合したホスファチジルエタノールアミン、たとえばＤＰＰＥ－ＰＥＧまたはＤＳＰＥ－ＰＥＧ、すなわち、ＰＥＧポリマーが付加したＤＰＰＥ（またはＤＳＰＥ）である。たとえば、ＤＰＰＥ－ＰＥＧ２０００とは、平均分子量約２０００のＰＥＧポリマーが付加したＤＰＰＥを指称する。

【００６９】

特に好ましいリン脂質は、ＤＡＰＣ、ＤＳＰＣ、ＤＰＰＡ、ＤＳＰＡ、ＤＭＰＳ、ＤＰＰＳ、ＤＳＰＳおよびエチル－ＤＳＰＣである。最も好ましいのは、ＤＡＰＣまたはＤＳＰＣである。

またリン脂質の混合物、たとえばＤＰＰＣ、ＤＳＰＣおよび／またはＤＡＰＣと、ＤＳＰＳ、ＤＰＰＳ、ＤＳＰＡ、ＤＰＰＡ、ＤＳＰＧ、ＤＰＰＧ、エチル－ＤＳＰＣおよび／またはエチル－ＤＰＰＣの混合物も使用できる。

【００７０】

幾つかの実施態様において、リン脂質はマイクロベシクルの安定化エンベロープの主成分であって、気体封入マイクロベシクルのエンベロープを構成する成分の総量の少なくとも５０％（Ｗ／Ｗ）にも及ぶ。幾つかの好ましい実施態様において、エンベロープの全体は実質上（すなわち、少なくとも９０重量％で１００重量％以下）、リン脂質で形成することができる。

【００７１】

リン脂質は便宜上、上記列挙した両親媒性化合物のいずれかと混合して使用できる。このようにたとえば、上述のリン脂質の１種以上に対し、０～５０重量％、好ましくは２５重量％以下の割合で、コレステロール、エルゴステロール、フィトステロール、シトステロール、ラノステロール、トコフエロール、没食子酸プロピルまたはアスコルビルパルミテートなどの脂質、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキジン酸およびこれらの誘導体などの脂肪酸またはブチル化ヒドロキシトルエンおよび／または他の非リン脂質化合物を必要に応じて加えることができる。特にパルミチン酸が好ましい。

【００７２】

マイクロベシクルに所望の全正味電荷を付与するため、エンベロープは全正味電荷を帯びている少なくとも１種の成分、特に荷電両親媒性物質、好ましくは脂質またはリン脂質を含有するだろう。

全負電荷を帯びているリン脂質の具体例は、ＤＭＰＳ、ＤＰＰＳ、ＤＳＰＳなどのホスファチジルセリンの；ＤＭＰＡ、ＤＰＰＡ、ＤＳＰＡなどのホスファチジン酸の；ＤＭＰＧ、ＤＰＰＧおよびＤＳＰＧなどのホスファチジルグリセロールの誘導体、特に脂肪酸ジエステルである。

【００７３】

また修飾リン脂質、特にＰＥＧ－修飾ホスファチジルエタノールアミン、たとえばＤＭＰＥ－ＰＥＧ２０００、ＤＭＰＥ－ＰＥＧ３０００、ＤＭＰＥ－ＰＥＧ４０００、ＤＭＰＥ－ＰＥＧ５０００、ＤＰＰＥ－ＰＥＧ２０００、ＤＰＰＥ－ＰＥＧ３０００、ＤＰＰＥ

－ＰＥＧ４０００、ＤＰＰＥ－ＰＥＧ５０００、ＤＳＰＥ－ＰＥＧ２０００、ＤＳＰＥ－ＰＥＧ３０００、ＤＳＰＥ－ＰＥＧ４０００、ＤＳＰＥ－ＰＥＧ５０００、ＤＡＰＥ－ＰＥＧ２０００、ＤＡＰＥ－ＰＥＧ３０００、ＤＡＰＥ－ＰＥＧ４０００またはＤＡＰＥ－ＰＥＧ５０００も、負荷電分子として使用できる。また上記リン脂質のリゾ体、たとえばリゾホスファチジルセリン誘導体（たとえばリゾ－ＤＭＰＳ、－ＤＰＰＳまたは－ＤＳＰＳ）、リゾホスファチジン酸誘導体（たとえばリゾ－ＤＭＰＡ、－ＤＰＰＡまたは－ＤＳＰＡ）およびリゾホスファチジルグリセロール誘導体（たとえばリゾ－ＤＭＰＧ、－ＤＰＰＧまたは－ＤＳＰＧ）も、負荷電化合物として有利に使用できる。

【００７４】

負（陰）荷電脂質の具体例は、胆汁酸塩、たとえばコール酸塩、デオキシコール酸塩またはグリココール酸塩；および（C_{12}－C_{24}）、好ましくは（C_{14}－C_{22}）脂肪酸塩、たとえばパルミチン酸塩、ステアリン酸塩、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－３－スクシニルグリセロール塩または１，３－ジパルミトイル－２－スクシニルグリセロール塩である。

【００７５】

好ましくは、負荷電化合物はＤＰＰＡ、ＤＰＰＳ、ＤＳＰＧ、ＤＳＰＥ－ＰＥＧ２０００、ＤＳＰＥ－ＰＥＧ５０００またはこれらの混合物の中で選ばれる。

負荷電成分は典型例として、対応する正（陽）反対イオン［これは１価（たとえばアルカリ金属またはアンモニウム）、２価（たとえばアルカリ土類金属）または３価（たとえばアルミニウム）であってよい］と会合する。反対イオンは好ましくは、アルカリ金属カチオン、たとえばLi^+、Na^+またはK^+、より好ましくはNa^+の中で選ばれる。

【００７６】

全正電荷を帯びているリン脂質の具体例は、エチルホスファチジルコリンの誘導体、特にエチルホスファチジルコリンと脂肪酸のエステル、たとえば１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－エチルホスホコリン（エチル－ＤＳＰＣまたはＤＳＥＰＣ）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－エチルホスホコリン（エチル－ＤＰＰＣまたはＤＰＥＰＣ）である。負反対イオンは好ましくは、ハロゲンイオン、特に塩素または臭素である。正荷電脂質の具体例は、少なくとも１つの（C_{10}－C_{20}）、好ましくは（C_{14}－C_{18}）アルキル鎖を含有しハロゲン反対イオン（たとえば塩素または臭素）を持つアルキルアンモニウム塩、たとえばステアリルアンモニウムクロリド、ヘキサデシルアンモニウムクロリド、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド（ＤＤＡＢ）、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド（ＣＴＡＢ）などである。

【００７７】

さらに正荷電脂質の具体例は、（C_3－C_6）アルキレン橋を介してＮ原子に結合した１または好ましくは２つの（C_{10}－C_{20}）、好ましくは（C_{14}－C_{18}）アシル鎖を有し、ハロゲン反対イオン（たとえば塩素または臭素）を持つ第三または第四アンモニウム塩、たとえば１，２－ジステアロイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＳＴＡＰ）、１，２－ジパルミトイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＰＴＡＰ）、１，２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＴＡＰ）、１，２－ジステアロイル－３－ジメチルアンモニウム－プロパン（ＤＳＤＡＰ）などである。

【００７８】

マイクロベシクルのエンベロープの正荷電化合物として、ＤＳＥＰＣ、ＤＰＥＰＣおよび／またはＤＳＴＡＰが好ましく使用される。

正荷電成分は典型例として、対応する負反対イオン［これは１価（たとえばハロゲン）、２価（たとえばスルフェート）または３価（たとえばホスフェート）であってよい］と会合する。この反対イオンは好ましくは、ハロゲンイオン、たとえばF^-（フッ素）、Cl^-（塩素）またはBr^-（臭素）の中で選ばれる。

【００７９】

ＭＡＣとの有効な静電作用を可能にするため、マイクロベシクルのエンベロープ中の荷

電化合物の総量は、該エンベロープを形成する物質の総量に対し少なくとも１モル％、好ましくは少なくとも５モル％、より好ましくは少なくとも１０モル％にすべきである。マイクロベシクルとＭＡＣｓの幾つかの好ましい組合せにおいて、マイクロベシクルのエンベロープ中少なくとも２０％、好ましくは少なくとも４０％量の荷電化合物が、上記マイクロベシクルへの比較的多量のＭＡＣｓの結合を可能にすることが認められた。

【００８０】

幾つか実施態様において、マイクロベシクルのエンベロープ全体は荷電化合物によって形成されうるが、該エンベープを形成する配合物に少なくとも最小限量の中性化合物の添加が有利となりうることが認められた。すなわち、好ましくは、荷電成分の総量はマイクロベシクルのエンベロープを形成する成分の総量に対し約９５モル％に匹敵もしくはそれより低い量、より好ましくは９０モル％に匹敵もしくはそれより低い量から、特に好ましい８０モル％に匹敵もしくはそれより低い量までであってもよい。

【００８１】

中性および荷電リン脂質および／または荷電脂質の混合物を用いて、本発明アセンブリーのマイクロベシクルを満足に形成することができる。好ましくは、２種以上の脂質もしくはリン脂質、すなわち、中性電荷を持つ少なくとも１種と全正味電荷を持つ少なくとも１種の混合物が使用される。より好ましくは、２種以上の脂質もしくはリン脂質、すなわち、中性の少なくとも１種と正電荷を持つ少なくとも１種の混合物を用いることにより、全正電荷を持つマイクロベシクルが得られる。

【００８２】

荷電脂質もしくはリン脂質の量は、脂質とリン脂質の総量に対し約９５～１モル％、好ましくは８０～２０モル％の範囲で適宜に変化させてよい。

中性リン脂質と荷電脂質またはリン脂質の好ましい混合物は、たとえばＤＰＰＧ／ＤＳＰＣ、ＤＳＴＡＰ／ＤＡＰＣ、ＤＰＰＳ／ＤＳＰＣ、ＤＰＰＳ／ＤＡＰＣ、ＤＳＰＡ／ＤＡＰＣ、ＤＳＰＡ／ＤＳＰＣおよびＤＳＰＧ／ＤＳＰＣである。

【００８３】

マイクロベシクルの安定化エンベロープの配合物において、必ずしも必要でないが（もしくは部分的にのみ必要）、他に賦形剤もしくは添加剤を乾燥配合物に存在させるか、または再組成に用いる水性担体といっしょに加えられてよい。これらの物質としては、ｐＨ調整剤、浸透度調整剤、増粘剤、乳化剤、増量剤等が挙げられ、通常の量で使用されてよい。たとえば、ポリオキシプロピレングリコールやポリオキシエチレングリコール並びにそのコポリマーのような化合物が使用できる。増粘剤もしくは安定化剤の具体例は、線状および架橋ポリおよびオリゴサッカリド、糖、ポリエチレングリコールのような親水性ポリマーから選ばれる化合物である。

【００８４】

気体封入マイクロベシクルの製造には凍結乾燥あるいは噴霧乾燥工程が必要となりうるので、配合物に凍結防止および／または分散保護効果を持つ作用物質の１種以上および／または増量剤の１種以上、たとえばグリシンなどのアミノ酸；炭水化物、たとえばスクロース、マンニトール、マルトース、トレハロース、グルコース、ラクトースもしくはシクロデキストリンなどの糖、またはデキストランなどのポリサッカリド；またはポリエチレングリコールなどのポリグリコールを含ませることが有利かもしれない。

【００８５】

本発明に係るアセンブリーに使用しうるマイクロバブルは、当該分野で公知の方法に従って製造することができる。典型例として、製造法は、上記の両親媒性物質からなる乾燥粉末物質の、好ましくは該両親媒性物質を含有する水性または有機懸濁液の凍結乾燥による製造を要する。

【００８６】

たとえば、ＷＯ９１／１５２４４に記載の如く、薄膜形成両親媒性化合物を先ず、リポソーム形成法により、ラメラ形状に変えることができる。たとえば、薄膜形成脂質および必要に応じて他の添加剤（たとえば増粘剤、非薄膜形成界面活性物質、電解質等）を含有

する水溶液を高速機械式均質化、または音波もしくは超音波振動数下の音波処理に付し、次いで凍結乾燥して自由流動性粉末を形成することができ、これを気体の存在下に貯蔵する。凍結乾燥の前に必要に応じて、たとえばＵＳ特許５５９７５４９に開示の洗浄工程を行なうことができる。

【００８７】

他の実施態様によれば（たとえば上記ＵＳ特許５５９７５４９に記載）、薄膜形成化合物および親水性安定剤（たとえばポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、グリコール酸、リンゴ酸またはマルトール）を、有機溶剤（たとえばｔ－ブタノール、２－メチル－２－ブタノールまたは$C_2Cl_4F_2$）に溶解でき、該溶液を凍結乾燥して乾燥粉末を形成することができる。

【００８８】

別法として、上記ＷＯ０４／０６９２８４に開示の如く、リン脂質（上記のものから選択および同じ荷電リン脂質の少なくとも１種を含む）および分散保護剤（たとえば前記のもの、特に炭水化物、糖アルコール、ポリグリコールおよびこれらの混合物）を、水不混和性有機溶剤（たとえば分枝または線状のアルカン、アルケン、シクロアルカン、芳香族炭化水素、アルキルエーテル、ケトン、ハロゲン化炭化水素、パーフルオロ化炭化水素またはこれらの混合物）と共に、水のエマルジョンに分散させることができる。

【００８９】

このようにして得られるエマルジョンは、溶剤で包囲されかつリン脂質物質（および必要に応じて他の両親媒性薄膜形成化合物）で安定化された微小液滴（microdroplets）を含有し、次いでこれを通常の技法に従って凍結乾燥し、これを貯蔵し（たとえば適当な気体存在下のバイアルにて）、また最後に水性担体で再組成して、気体封入マイクロバブル懸濁液を得ることができる。

【００９０】

気体封入マイクロバブルを製造するさらなる方法は、リン脂質（および必要に応じて他の両親媒性薄膜形成化合物および／または添加剤）を含有する水性媒体を、所望の気体存在下、制御高撹拌エネルギーに付して（たとえば回転固定子ミキサーで）気体マイクロバブル分散液を生成せしめ、次いで得られる分散液を凍結乾燥に付し、乾燥した再組成しうる生成物を得ることから成る。

【００９１】

この方法の一例は、たとえばＷＯ９７／２９７８２に示されている。

また噴霧乾燥技法（たとえばＵＳ特許５６０５６７３に開示）を用いても、本発明アセンブリーのマイクロベシクルを含有する乾燥粉末を得ることができる。

【００９２】

上記技法のいずれかで得られる乾燥または凍結乾燥生成物は概して、粉末またはケークの形状を有し、所望の気体と接触させて貯蔵できる（たとえばバイアルにて）。生成物を、生理的に許容でき無菌かつ注射しうる適当な水性液体担体中で容易に再組成が可能で、気体封入マイクロベシクルが形成される。適当な液体担体は水、食塩水（これは注射用の最終生成物が低張性を示さないように有利にバランスをとることができる）などの水溶液、または塩もしくは糖、糖アルコール、グリコールまたは他の非イオン性ポリオール物質（たとえばグルコース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、グリセロール、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等）などの張度調整物質１種以上の溶液である。

【００９３】

マイクロバルーン

本発明に係るアセンブリーに適する他の気体封入マイクロベシクルは、当該分野において、“マイクロバルーン”と称されている。一般に、これらの気体封入マイクロベシクルは有形のエンベロープ（material envelope）を有し、その厚みはマイクロベシクルの安定化薄膜－エンベロープの厚みより大きい。該エンベロープを形成する物質（たとえば、ポリマー物質、蛋白様物質、水不溶性脂質、またはこれらの組合せであってよい）に基づ

き、厚みは一般に、少なくとも５０ｎｍ、典型例として少なくとも１００ｎｍから数百ナノメーター（たとえば３００ｎｍ）までである。

【００９４】

またマイクロバルーンは概して、超音波処理に対する音波レスポンスの点でマイクロバブルと相違する。マイクロバブルの超音波挙動は実際に“自由な”気泡の挙動に近いが、マイクロバルーンは一般に（多分、エンベロープの剛性が高いため）、低レベルの音波加圧エネルギー（acoustic pressure energy）（たとえば約０．１のメカニカルインデックス）で照射すると、反応が少ない（反射エコーシグナルの強度の点で）。

【００９５】

本発明に係るアセンブリーの製造に有用なマイクロバルーンの具体例は好ましくは、生分解性ポリマーからなるポリマーエンベロープ、または生分解性水不溶性脂質、たとえばＵＳ特許５７１１９３３および６３３３０２１に記載のものをベースとするエンベロープを有するマイクロバルーンである。また蛋白様エンベロープを有する、すなわち、ＵＳ－Ａ－４２７６８８５またはＥＰ－Ａ－０３２４９３８に記載のものなどの天然蛋白質（アルブミン、ヘモグロビン）で作ったマイクロバルーンも使用することができる。

【００９６】

注射可能なマイクロバルーンのエンベロープを形成するポリマーは好ましくは、親水性、生分解性の生理的に適合しうるポリマーである。かかるポリマーの具体例は、天然または合成のものであってよく、実質的不溶性のポリサッカリド（たとえばキトサンまたはキチン）、ポリシアノアクリレート、ポリアクチドおよびポリグリコリドおよびそれらのコポリマー、ラクチドとラクトン（たとえばγ－カプロラクトンまたはδ－バレロラクトン）のコポリマー、エチレンオキシドとラクチドのコポリマー、ポリエチレンイミン、ポリペプチド、および蛋白質、たとえばゼラチン、コラーゲン、グロブリンまたはアルブミンである。

【００９７】

上記のＵＳ特許５７１１９３３に記載の他の適当なポリマーとしては、ポリ－（オルト）エステル、ポリ乳酸およびポリグリコール酸およびそれらのコポリマー（たとえばＤＥＸＯＮ（登録商標）、カナダ、モントリオールの Davis & Geck）；ポリ（ＤＬ－ラクチド－ｃｏ－γ－カプロラクトン）、ポリ（ＤＬ－ラクチド－ｃｏ－δ－バレロラクトン）、ポリ（ＤＬ－ラクチド－ｃｏ－γ－ブチロラクトン）、ポリアルキルシアノアクリレート；ポリアミド；ポリヒドロキシブチレート；ポリジオキサノン；ポリ－β－アミノケトン；ポリホスファゼン；およびポリアンヒドリドが包含される。またポリアミノ酸、たとえばポリグルタミン酸やポリアスパラギン酸、並びにそれらの誘導体、たとえば低級アルコールもしくはグリコールによる部分エステルも使用できる。

【００９８】

また他のアミノ酸、たとえばメチオニン、ロイシン、バリン、プロリン、グリシン、アラニン等とのコポリマーも使用できる。制御生分解性を持つポリグルタミン酸やポリアスパラギン酸の誘導体（たとえばＷＯ８７／０３８９１、ＵＳ特許４８８８３９８またはＥＰ１３０９３５に記載のもの）も使用できる。

【００９９】

これらのポリマー（および他のアミノ酸とのコポリマー）は、下記タイプの式を有する：

－（ＮＨ－ＣＨＡ－ＣＯ）$_{w}$－（ＮＨ－ＣＨＸ－ＣＯ）$_{y}$－

式中、Ｘはアミノ酸残基の側鎖（たとえばメチル、イソプロピル、イソブチルまたはベンジル）を表わし；Ａは式：－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＣＯＯＲ^{1}Ｒ^{2}－ＯＣＯＲ、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＣＯＯ－ＣＨＲ^{1}ＣＯＯＲ、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＣＯ（ＮＨ－ＣＨＸ－ＣＯ）$_{m}$ＮＨ－ＣＨ（ＣＯＯＨ）－（ＣＨ$_{2}$）$_{p}$ＣＯＯＨ、またはこれらそれぞれの無水物の基、ここで、Ｒ^{1}およびＲ^{2}はＨまたは低級アルキル、またはＲ^{1}とＲ^{2}は置換もしくは非置換結合部で共に合して、５または６員環を形成し、ｎ，ｍおよびｐは低級整数（但し、５を越えない）；およびｗおよびｙは分子量が５０００より小さくならないように選ばれる整数である。

【０１００】
非生分解性ポリマー（たとえば消化管で使用すべきマイクロバルーンを作る場合の）は、ポリオレフィン（ポリスチレン）、アクリル樹脂（ポリアクリレート、ポリアクリロニトリル）、ポリエステル（ポリカーボネート）、ポリウレタン、ポリウレアおよびそれらのコポリマーを含む、非常に水不溶性の生理的に許容しうる生抵抗性（bioresistant）ポリマーから選ぶことができる。ＡＢＳ（アクリル－ブタジエン－スチレン）が好ましいコポリマーである。
【０１０１】
本発明に係るアセンブリーのマイクロバルーンの形成に有用な生分解性で水不溶性の脂質はたとえば、水不溶性固体のモノ、ジもしくはトリ－グリセリド、脂肪酸、脂肪酸エステル、コレステロールなどのステロール、ワックスおよびこれらの混合物を包含する。モノ、ジおよびトリ－グリセリドとしては、主にモノ、ジおよびトリ－ラウリン化合物、並びに対応する－ミリスチン、－パルミチン、－ステアリン、－アラキジンおよび－ベヘニン誘導体が挙げられる。モノ、ジおよびトリ－ミリスチン、－パルミチン、－ステアリン、およびジパルミトイルモノオレイルグリセリドなどの混合トリグリセリドが特に有用で；トリパルミチンおよびトリステアリンが好ましい。
【０１０２】
脂肪酸としては、固体の（室温，約１８～２５℃にて）炭素数１２以上の脂肪酸（好ましくは飽和）が含まれ、たとえばラウリン酸、アラキジン酸、ベヘン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、セバシン酸、ミリスチン酸、セロチン酸、メリシン酸（melissic acid）およびエルカ酸およびこれらの脂肪酸エステルが挙げられる。好ましくは、脂肪酸およびそのエステルは、他のグリセリドと混合して使用される。
【０１０３】
ステロールは好ましくは、他のグリセリドおよび／または脂肪酸と混合して使用され、かつコレステロール、フイトステロール、ラノステロール、エルゴステロール等、および上記脂肪酸によるステロールのエステルから選ばれ；しかしながら、コレステロールが好ましい。
好ましい生分解性脂質はトリグリセリド、たとえばトリパルミチン、トリステアリンまたは上記トリグリセリドの混合物である。
【０１０４】
必要に応じて、７５重量％以下の生分解性ポリマー、たとえば上記列挙したポリマーを、マイクロバルーンのエンベロープを形成する生分解性水不溶性脂質といっしょに混合することができる。
有利には、イオン性ポリマー（すなわち、その構造にイオン性部分を有するポリマー）、好ましくは生分解性イオン性ポリマーも使用して、マイクロバルーンの安定化エンベロープを形成することができ、このように所望の全正味電荷が付与される。イオン性ポリマーは、安定化エンベロープの主成分として使用するか、あるいは非イオン性ポリマーといっしょに種々の量（たとえば２～８０重量％）で混合することができる。適当なイオン性ポリマーは、たとえば第四級化アミンなどの第四級化窒素原子を含有するポリマーまたはカルボキシル、スルフェート、スルホネートまたはホスホネート部分を含有するポリマーである。
【０１０５】
適当なイオン性ポリマーの具体例としては、これらに限定されないが、ポリエチレンイミン、ポリ（ジアリルジメチルアンモニウムクロリド）、第四級化ポリ｛ビス（２－クロロエチル）エーテル－ａ／ｔ－１，３－ビス［３－（ジメチルアミノ）プロピル］ウレア｝（Polyquaternium（登録商標）－２）、ポリ（４－ビニルピリジニウムトリブロミド）、第四級化ヒドロキシエチルセルロースエトキシラート（Polyquaternium－４）、ポリ（ｐ－キシレンテトラヒドロチオフエニウムクロリド）、ポリ（Ｌ－リシン）、キチン、ジエチレンアミノエチルデキストラン、ポリ（アクリル酸）、ポリ（メタクリル酸）、ポリ（スチレン－ａ／ｔ－マレイン酸）、ポリ（アミノ酸）、アルギン酸、ポリ（ウリジン酸

）、ヒアルロン酸、すなわち、ポリ（β－グルクロン酸－ａ／ｔ－β－Ｎ－アセチルクルコサミド）、ポリ（ガラクツロン酸）、ポリ（酢酸ビニル－コ－クロトン酸）、ＤＮＡ、ポリ（３，３’，４，４’－ベンゾフエノンテトラカルボン酸ジ無水物－コ－４，４’－オキシジアニリン）、ポリ（イソプレン－グラフト－マレイン酸モノメチルエーテル）、グルタミン酸とグルタミン酸アルキルのコポリマー、ヘパリン、ポリ（スチレンスルホネート）、スルホン化ポリ（イソフタル酸）、ポリ（ビニルスルホン酸カリウム塩）、ポリ（ビニル硫酸カリウム塩）、コンドロイチン硫酸Ａ、硫酸デキストラン、フコイダン（fucoidan）、ポリリン酸、ポリリン酸ナトリウム、ポリビニルリン酸ナトリウム、ポリ－Ｌ－リシン臭酸塩、キトサン、硫酸キトサン、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸およびリグニンスルホネートが挙げられる。

【０１０６】

またマイクロバルーンのエンベロープに、通常の添加剤を入れて、その物理的性質、たとえば分散性、弾性および水透過性を改変することもできる。特に、上記マイクロバルーンの製造で調製したエマルジョンに、有効量の両親媒性物質を安定性を高めるのに加えることができる。かかる物質は、上述の列挙した脂質、リン脂質および変性リン脂質などの両親媒性化合物から有利に選ぶことができる。

【０１０７】

加える両親媒性化合物は有利には、全正味電荷を帯びている化合物であってよい。好ましい荷電脂質、リン脂質および変性リン脂質は、上記列挙のものである。

ＭＡＣとの有効な静電相互作用を可能にするため、マイクロバルーンのエンベロープにおける荷電添加剤の総量は、該エンベロープを形成する物質の総量に対して少なくとも１モル％にすべきである。しかしながら、荷電成分の総量はマイクロバルーンのエンベロープを形成する物質の総量に対し約７０モル％以下が好ましい。荷電化合物の量は約２～４０％が好ましい。

特にマイクロバルーンの製造に用いる他の賦形剤もしくは添加剤、たとえば再分散剤や増粘剤をエンベロープの中に加えることができる。

【０１０８】

生分解性ポリマー含有のマイクロバルーンは、たとえばＵＳ特許５７１１９３３に開示の方法に従って製造することができ、該方法は、（ａ）疎水性有機相を水相の中で、該疎水性相の液滴が水相中の油／水エマルジョンとして得られるように乳化せしめ；（ｂ）水相に不溶性の揮発性溶剤中のポリマー少なくとも１種の溶液を、上記エマルジョンに加えることにより、該ポリマーは上記液滴のまわりに層を形成し；（ｃ）該揮発性溶剤を蒸発することにより、ポリマーは液滴のまわりの界面沈澱によって沈着し、次いでポリマーの膜で包まれた疎水性相のコアを持つビーズが形成され（該ビーズは水相中懸濁状態にあり）；（ｄ）該懸濁液を減圧に付して蒸発させ、包まれた疎水性相を除去し；次いで（ｅ）蒸発する疎水性相を適当な気体に取り替えることから成る。

【０１０９】

生分解性脂質含有のマイクロバルーンは、たとえばＵＳ特許６３３３０２１に開示の方法に従い、以下の手順で製造することができる。すなわち、有機溶剤に溶解したマイクロカプセルエンベロープの固体成分の１種以上の混合物を水担体相に、油／水エマルジョンが生成するように分散させる。エマルジョン水相は、エマルジョンの安定化に用いる両親媒性物質の有効量を含有しうる。

【０１１０】

次いで水相中の有機溶液の小液滴のエマルジョンに、前記で示したような一定量の再分散剤および／または凍結防止剤もしくは分散保護剤を加えた後、－３０℃以下の温度で凍結させる。便利な再分散剤であればいずれも使用でき；糖、アルブミン、ゼラチン、ポリビニルピロリドン（ＰＶＰ）、ポリビニルアルコール（ＰＶＡ）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）およびエチレンオキシド－プロピレンオキシドブロックコポリマー（たとえば Pluronic(登録商標)または Synperonic(登録商標)）またはこれらの混合物から選ばれる再分散剤が好ましい。粒子凝集の防止に加える再分散剤は特に、マイクロカプセルが非

融合性で乾燥しかつ即座に分散しうる粉末の形状にあるときに有用である。次に凍結エマルジョンを減圧に付して、凍結乾燥を行い、すなわち、昇華によって液滴からの有機溶剤および担体相の水の除去を行い、次いで凍結乾燥した生成物を所望の気体と接触させる。

【０１１１】

生物学的適合性の気体

上記マイクロベシクルに充填するのに、生物学的適合性の気体、気体前駆体またはこれらの混合物のいずれかを使用しうる。気体は選定したモダリティーに応じて選ばれる。

気体としては、たとえば空気；窒素；酸素；二酸化炭素；水素；亜酸化窒素；ヘリウム、アルゴン、キセノンまたはクリプトンなどの貴もしくは不活性ガス；Xe^{133}またはKr^{81}などの放射性ガス；超分極ヘリウム、超分極キセノンまたは超分極ネオンなどの超分極貴ガス；低分子量炭化水素（たとえば７個以下の炭素原子含有）、たとえばメタン、エタン、プロパン、ブタン、イソブタン、ペンタンまたはイソペンタンなどのアルカン、シクロブタンまたはシクロペンタンなどのシクロアルカン、プロペン、ブテンまたはイソブテンなどのアルケン、またはアセチレンなどのアルキン；エーテル；ケトン；エステル；ハロゲン化ガス、好ましくはフッ素化ガス、たとえばハロゲン化、フッ素化またはパーフッ素化低分子量炭化水素（たとえば７個以下の炭素原子含有）；またはこれらのいずれかの混合物が包含される。ハロゲン化炭化水素を用いる場合、上記化合物中のハロゲン原子の、好ましくは少なくとも幾つか、より好ましくは全てがフッ素原子である。

【０１１２】

特に超音波イメージングの分野で、フッ素化ガス、特にパーフッ素化ガスが好ましい。フッ素化ガスは少なくとも１個のフッ素原子を含有する物質を包含し、たとえばフッ素化炭化水素（１個以上の炭素原子とフッ素を含有する有機化合物）；六フッ化イオウ；フッ素化、好ましくはパーフッ素化ケトン、たとえばパーフルオロアセトン；およびフッ素化、好ましくはパーフッ素化エーテル、たとえばパーフルオロジエチルエーテルなどが挙げられる。

【０１１３】

好ましい化合物はパーフッ素化ガス、たとえばSF_6またはパーフルオロカーボン（パーフッ素化炭化水素）、すなわち、全ての水素原子がフッ素原子で置換された炭化水素であって、これらは、たとえばＥＰ０５５４２１３に開示の如く、特に安定なマイクロバブル懸濁液を形成することが知られている。

【０１１４】

語句パーフルオロカーボンとは、飽和、不飽和および環式のパーフルオロカーボンを包含する。生物学的適合性の生理的に許容しうるパーフルオロカーボンの具体例は、パーフルオロアルカン、たとえばパーフルオロメタン、パーフルオロエタン、ハーフルオロプロパン、パーフルオロブタン（たとえばパーフルオロ－ｎ－ブタン、必要に応じて他の異性体、たとえばパーフルオロ－イソブタンと混合）、パーフルオロペンタン、パーフルオロヘキサンまたはパーフルオロヘプタン；パーフルオロアルケン、たとえばパーフルオロプロペン、パーフルオロブテン（たとえばパーフルオロブト－２－エン）またはパーフルオロブタジエン；パーフルオロアルキン（たとえばパーフルオロブト－２－イン）；および

【０１１５】

パーフルオロシクロアルカン（たとえばパーフルオロシクロブタン、パーフルオロメチルシクロブタン、パーフルオロジメチルシクロブタン、パーフルオロトリメチルシクロブタン、パーフルオロシクロペンタン、パーフルオロメチルシクロペンタン、パーフルオロジメチルシクロペンタン、パーフルオロシクロヘキサン、パーフルオロメチルシクロヘキサンおよびパーフルオロシクロヘプタン）である。

【０１１６】

好ましい飽和パーフルオロカーボンは、式：C_nF_{n+2}（ここで、ｎは１～１２、好ましくは２～１０、最も好ましくは３～８、より一層好ましくは３～６である）を有する。適当なパーフルオロカーボンとしては、たとえばCF_4、C_2F_6、C_3F_8、C_4F_8、C_4F_{10}、C_5F_{12}、C_6F_{12}、C_6F_{14}、C_7F_{14}、C_7F_{16}、C_8

F_{18}、およびC_9F_{20}が挙げられる。
特に好ましい気体は、SF_6、またはCF_4、C_2F_6、C_3F_8、C_4F_8、C_4F_{10}またはこれらの混合物から選ばれるパーフルオロカーボンであり；SF_6、C_3F_8またはC_4F_{10}が特に好ましい。
【０１１７】
また上記気体のいずれかの割合の混合物の使用も、有利となりうる。たとえば混合物は、通常の気体、たとえば窒素、空気または二酸化炭素と、安定なマイクロバブル懸濁液を形成する気体、たとえば六フッ化イオウまたは上述のパーフルオロカーボンからなる。
【０１１８】
以下の組合せ、すなわち、気体（Ａ）および（Ｂ）の混合物が特に好ましく、ここで、気体（Ｂ）は好ましくはSF_6、CF_4、C_2F_6、C_3F_6、C_3F_8、C_4F_6、C_4F_8、C_4F_{10}、C_5F_{10}、C_5F_{12}またはこれらの混合物から選ばれるフッ素化ガスで、気体（Ａ）は空気、酸素、窒素、二酸化炭素またはこれらの混合物から選ばれる。気体（Ｂ）の量は、該混合物総量の約０．５～９５Ｖ／Ｖ％、好ましくは約５～８０％であってよい。
【０１１９】
一定の情況下で、気体物質への前駆体（すなわち、インビボで気体に変換されうる物質）を含ませることが望まれるかもしれない。気体前駆体およびそれから得られる気体は、生理的に許容しうることが好ましい。気体前駆体はｐＨ賦活、光賦活、温度賦活等のものであってよい。たとえば、温度賦活の気体前駆体として、一定のパーフルオロカーボンを使用しうる。これらのパーフルオロカーボン、たとえばパーフルオロペンタンまたはパーフルオロヘキサンは、室温（または該作用剤の製造および／または貯蔵温度）を越えるが体温より低い液体／気体相の転移温度を有し、従って、それらは液体／気体相転移をうけ、かつ人体内で気体に変換する。
【０１２０】
超音波検査の場合、生物学的適合性気体または気体混合物は好ましくは、空気、窒素、二酸化炭素、ヘリウム、キリプトン、キセノン、アルゴン、メタン、ハロゲン化炭化水素（パーフルオロカーボンや六フッ化イオウなどのフッ素化ガスを包含）またはこれらの混合物から選ばれる。有利には、パーフルオロカーボン（特にC_4F_{10}またはC_3F_8）またはSF_6は、必要に応じて空気または窒素との混合物で使用できる。
【０１２１】
ＭＲＩにおけるアセンブリーの使用の場合、マイクロベシクルは好ましくは、超分極ネオン、超分極ヘリウム、超分極キセノンもしくはこれらの混合物などの超分極貴ガス、またはこれと必要に応じて空気、CO_2、酸素、窒素、ヘリウム、キセノン、あるいは上述のハロゲン化炭化水素のいずれかとの混合物を含有する。
【０１２２】
シンチグラム造影での使用の場合、本発明に係るアセンブリーのマイクロベシクルは好ましくは、Xe^{133}、Kr^{81}もしくはこれらの混合物などの放射性ガス、またはこれと必要に応じて空気、CO_2、酸素、窒素、ヘリウム、クリプトン、あるいは上述のハロゲン化炭化水素との混合物を含有する。
【０１２３】
マイクロベシクルの会合成分（ＭＡＣ）
アセンブリーのマイクロベシクルに会合する第２成分（ＭＡＣ）は、全正味電荷を帯びている生物学的適合性界面活性剤からなる構造実体（structural entity）のいずれであってもよい。特に、該構造実体は、複数の好ましく両親媒性の分子の会合によって形成される超分子構造が好ましい。幾つかの実施態様において、荷電化合物は他の界面活性剤および／または中性の添加剤と混合される。
【０１２４】
ＭＡＣはさらに、アセンブリーの特別な用途に応じて、所望の標的配位子、対生物活性剤および／または診断剤を包含してもよい。

【０１２５】
本発明に係るアセンブリーのＭＡＣを調製するのに適する生物学的適合性界面活性物質は、前記列挙した化合物、たとえば（$Ｃ_{2}$－$Ｃ_{10}$）有機酸、（$Ｃ_{12}$－$Ｃ_{24}$）、好ましくは（$Ｃ_{14}$－$Ｃ_{22}$）脂肪族鎖を有する有機脂肪酸、その医薬的に許容しうる（アルカリ）塩、ポリオキシエチレンとのそのエステル、たとえばパルミチン酸、ステアリン酸、アラキドン酸、オレイン酸、ドデカン酸ナトリウム、シュウ酸もしくは酒石酸ナトリウムまたはポリオキシエチレン脂肪酸ステアレート；

【０１２６】
ポリイオン性（アルカリ）塩、たとえばクエン酸ナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、リン酸ナトリウム；好ましくは（$Ｃ_{8}$－$Ｃ_{22}$）炭化水素鎖（そのポリオキシエチル化誘導体を含む）を含有する、有機アミン、アミド、第四級アミン（ハライド）塩、たとえばエタノールアミン、トリエタノールアミン、アルキルアミン、アルカノールアミド、トリメチルアルキルアミンクロリド、ポリオキシエチル化アルキルアミン、ポリオキシエチル化アルカノールアミド；アミノ酸；

【０１２７】
リン脂質、たとえばホスファチジルコリン，エチルホスファチジルコリン，ホスファチジルグリセロール，ホスファチジン酸，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もしくはスフインゴミエリンの脂肪酸ジエステル；モノもしくはオリゴサッカリドと（$Ｃ_{12}$－$Ｃ_{24}$）、好ましくは（$Ｃ_{14}$－$Ｃ_{22}$）有機脂肪酸のエステル、たとえばソルビタンラウレート；高分子界面活性物質、すなわち、疎水性および親水性部分を含有するブロックコポリマー、たとえばエチレンオキシド／プロピレンオキシドブロックコポリマー；

【０１２８】
有機スルホネート、たとえばアルカリ（たとえばナトリウム）（$Ｃ_{12}$－$Ｃ_{24}$）アルキル、好ましくは（$Ｃ_{14}$－$Ｃ_{22}$）アルキルスルホネート；パーフルオロ有機酸、たとえばパーフルオロオクタン酸；およびこれらの混合物の中から選ぶことができる。好ましい化合物は、マイクロベシクルの適当な成分の中で前記列挙した、脂質、リン脂質および修飾リン脂質を含む、中性のまたは荷電両親媒性物質である。好ましいＭＡＣは、ミセルの形状にある。

【０１２９】
ＭＡＣの配合物は、通常の技法に従って、たとえばＭＡＣを形成する関連成分を水性担体に分散し、次いで必要に応じ過剰物質を除去するため、得られる懸濁液を洗浄することにより得ることができる。

【０１３０】
上記第２成分はナノ成分であって、すなわち、その相対寸法は約１００ｎｍもしくはそれ以下、好ましくは約８０ｎｍもしくはそれ以下、より好ましくは約５０ｎｍもしくはそれ以下のものである。ＭＡＣの寸法、特にその数平均直径は、通常の技法に従いたとえば光子相関分光分析などにより測定することができる。たとえば、ZetaSizer３０００Has(Malvern Instruments Gmbh)を使用できる。特にＭＡＣがその構造の中に、所望の標的配位子、対生物活性剤および／または診断剤を取入れているとき、その寸法は好ましくは、少なくとも０．１ｎｍ、より好ましくは少なくとも１ｎｍのものである。

【０１３１】
好ましくはＭＡＣは、ＭＡＣが会合するマイクロベシクルの平均寸法より少なくとも１０倍小もしくはそれより小さい（at least 10 times less or smeller than）、より好ましくは少なくとも５０倍小もしくはそれより小さい平均寸法を有する。上記平均寸法は概して、１０００倍以上、好ましくは５００倍以上である。

【０１３２】
正しく認識されうるように、気体封入マイクロベシクルに対するＭＡＣの比較的小さい寸法故に、比較的多量のＭＡＣｓをマイクロベシクルに会合させることができ、従って、より大きな数の結合標的配位子および／またはＭＡＣに取入れられる放出可能な治療剤も

しくは診断剤の量によって、アセンブリーの有効性が増大する。さらに、上記ＭＡＣの比較的小さな寸法は、マイクロベシクルの寸法に匹敵する寸法を持つアセンブリーを得るのを可能ならしめる。実際に、本発明に係るアセンブリーの数平均直径は、組立（assembling）前に測定したマイクロベシクルの平均直径の約３０％以下が好ましく、より好ましくは２０％以下、より一層好ましくは１０％以下である。

【０１３３】

本発明の幾つかの実施態様において、荷電物質がＭＡＣの実質的全体、すなわち、９０モル％もしくはそれ以上を構成しうる。他の幾つかの実施態様において、ＭＡＣの構造を形成する荷電分子は、該構造を形成する化合物の全体に相当せず、一定量の中性化合物と混合されているのが好ましい。一方、本発明者は、荷電マイクロベシクルとの有効な相互作用を可能にするため、ＭＡＣ中の荷電分子の量は好ましくは、上記エンベロープを形成する物質の総量に対し少なくとも０．５モル％のものにすべきことを認識した。好ましくは、上記量は少なくとも１モル％、より好ましくは少なくとも２モル％である。本発明の幾つかの好ましい実施態様において、ＭＡＣの構造を形成する荷電分子の量は好ましくは、約５０％以下、より好ましくは約２０％以下である。

【０１３４】

ミセル

前述の如く、本発明のアセンブリーにおいてマイクロベシクルと会合すべき好ましい成分は、ミセルである。本明細書で用いる語句“ミセル”とは、ミセルと混合ミセルの両方を包含し、ここで、語句混合ミセルとは、２種以上の化合物（その少なくとも１種は、ミセル構造を形成しうる両親媒性化合物である）の混合物によって形成されるミセル構造を指称する。すなわち、語句混合ミセルは、その意義の範囲内において、それ自体が水性担体に分散したとき概してミセル構造を形成できないが、適量のミセル形成両親媒性化合物と組合せて使用するとミセル構造を形成しうる、少なくとも１種の化合物、好ましくは両親媒性化合物によって形成されるミセルをも包含する。

【０１３５】

混合ミセルの具体例は、未修飾のリン脂質（一般に、単独物質で水性担体に分散したときミセルを形成することができない）と、ミセル形成化合物（たとえばＰＥＧ－修飾リン脂質または脂肪酸塩）とで形成されるミセルである。当該分野で公知の如く、ミセルは水に分散した両親媒性分子により、これらの分子の濃度がＣＭＣ（臨界ミセル濃度）として公知の所定の値を越えたときに形成される。ＣＭＣ以下の濃度では、かかる分子は単一分子として水溶液に分散する。

【０１３６】

ＣＭＣより高いと、両親媒性分子は、溶液中自由分子と平衡状態で、超分子構造に組織化する傾向にあり、該構造は、分子の疎水性（脂質）尾部（tail）が構造の内部の方に配置し、一方、分子の親水性（極性またはイオン性）頭部基（headgroup）が構造の外部に配置するという事実によって特性決定される。両親媒性分子のＣＭＣは実験的に、当該分野の標準技法を用いて測定することができる。たとえば、界面活性剤のＣＭＣは、１つの特性（性質）を界面活性剤の濃度の関数としてプロットすることにより、測定することができる。

【０１３７】

特性は通常、界面活性剤濃度のＣＭＣまでの上昇に伴なって直線的に変化し、ＣＭＣを越えると、線（または特性）は非直線となる。ＣＭＣの測定に使用できる適当な特性としては、屈折率、光散乱、表面張力、導電率、浸透圧等が挙げられる。本発明の目的のため、好ましいミセル形成物質は、たとえば約１０ｍＭもしくはそれ以下の比較的低いＣＭＣを持つものである。

【０１３８】

ミセルは典型例として、約０．１～１００ｎｍ、好ましくは約１～５０ｎｍの寸法を有する。数平均直径（D_N）は、約５０ｎｍもしくはそれ以下、好ましくは約２０ｎｍもしくはそれ以下、より一層好ましくは１０ｎｍもしくはそれ以下で、たとえば１ｎｍ、好ま

しくは約２ｎｍ以上である。

【０１３９】

ミセル、ミセル系およびこれらの製造法の再検討はたとえば、参考文献：“Surfactants and Polymers in Drug Delivery”, by M. Malmsten, Ch. 2, pp. 19-50, Marcel Dekker Inc. Ed., 2002で見ることができる。

【０１４０】

本発明のアセンブリーにおいてマイクロベシクルと会合すべきミセルを形成するのに有用な適当な物質は、先に列挙した脂質およびリン脂質物質の中から選ぶことができる。

【０１４１】

ミセル形成化合物の具体例は、特にＰＥＧ－修飾ホスファチジルエタノールアミンを含むＰＥＧ－修飾リン脂質、たとえばＤＭＰＥ－ＰＥＧ２０００、ＤＭＰＥ－ＰＥＧ３０００、ＤＭＰＥ－ＰＥＧ４０００、ＤＭＰＥ－ＰＥＧ５０００、ＤＰＰＥ－ＰＥＧ２０００、ＤＰＰＥ－ＰＥＧ３０００、ＤＰＰＥ－ＰＥＧ４０００、ＤＰＰＥ－ＰＥＧ５０００、ＤＳＰＥ－ＰＥＧ２０００、ＤＳＰＥ－ＰＥＧ３０００、ＤＳＰＥ－ＰＥＧ４０００、ＤＳＰＥ－ＰＥＧ５０００、ＤＡＰＥ－ＰＥＧ２０００、ＤＡＰＥ－ＰＥＧ３０００、ＤＡＰＥ－ＰＥＧ４０００またはＤＡＰＥ－ＰＥＧ５０００；少なくとも１つの（$Ｃ_{10}$－$Ｃ_{20}$）、好ましくは（$Ｃ_{14}$－$Ｃ_{18}$）アルキル鎖を有するアルキルアンモニウム塩、たとえばステアリルアンモニウムクロリド、ヘキサデシルアンモニウムクロリド、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド（ＤＤＡＢ）、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド（ＣＴＡＢ）；

【０１４２】

（$Ｃ_{3}$－$Ｃ_{6}$）アルキレン橋を介してＮ原子に結合した、１または好ましくは２つの（$Ｃ_{10}$－$Ｃ_{20}$）、好ましくは（$Ｃ_{14}$－$Ｃ_{18}$）アシル鎖を有する第三または第四アンモニウム塩、たとえば１，２－ジステアロイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＳＴＡＰ）、１，２－ジパルミトイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＰＴＡＰ）、１，２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＴＡＰ）、１，２－ジステアロイル－３－ジメチルアンモニウム－プロパン（ＤＳＤＡＰ）；脂肪酸塩、好ましくはアルカリ、特にナトリウム塩、たとえばパルミチン酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、オレイン酸ナトリウム、リノレン酸ナトリウム、ドデカン酸ナトリウム、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－３－スクシニルグリセリン酸ナトリウム塩または１，３－ジパルミトイル－２－スクシニルグリセロールナトリウム塩である。

【０１４３】

またミセル懸濁液の調製に、中に疎水性部と親水性部分を含有するポリマー（“高分子界面活性物質”としても公知）も使用できる。適当な高分子界面活性物質の具体例としては、これらに限定されないが、ポリエチレンオキシド（ＰＥＯ）、たとえば（$Ｃ_{8}$－$Ｃ_{16}$）ｎ－アルキルＰＥＯモノエーテル、（$Ｃ_{8}$－$Ｃ_{10}$）ｎ－アルキルフェニルＰＥＯ、テトラメチルブチルフェニルＰＥＯ、ＰＥＯポリソルベート（これらのＰＥＯはBrij、Lubrol、Triton、NonidetまたはTween（これらは全て登録商標）の商品名で売られている）；ブロックコポリマー、たとえば好ましくは、約３０００～２００００ダルトン、好ましくは５０００～１５０００ダルトンのＭＷを有するエチレンオキシド／プロピレンオキシドブロックコポリマー（たとえばPluronicまたはSynperonic（いずれも登録商標））；糖誘導体、たとえば（$Ｃ_{6}$－$Ｃ_{10}$）アルキル－β－Ｄ－グルコピラノシド、（$Ｃ_{8}$－$Ｃ_{12}$）アルキル－β－Ｄ－マルトシド；（$Ｃ_{8}$－$Ｃ_{16}$）アルキルジメチルアンモニウムプロパン－スルホネート；および胆汁酸およびその誘導体、たとえばコール酸ナトリウムまたはデオキシコール酸ナトリウムが挙げられる。

【０１４４】

本発明のアセンブリーに含ませるべきミセルの製造に使用できる追加の脂質としては、たとえば未修飾リン脂質、たとえば上述のホスファチジルコリン，エチルホスファチジルコリン，ホスファチジルグリセロール，ホスファチジン酸，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またはスフィンゴミエリンの脂肪酸ジエステルが挙げられる

。これらの未修飾リン脂質は一般に、水性担体に分散したときミセル構造を形成できないので（これらの化合物はむしろ、水溶液に分散したときにリポソームとして会合する傾向にあるので）、未修飾リン脂質は好ましくは、上述のミセル形成化合物のいずれかと混合して使用される。

【０１４５】

特にそれらの量は好ましくは、ミセル構造を形成する化合物混合物の総重量の約８０％以下、より好ましくは約７０％もしくはそれ以下とする。好ましい実施態様によれば、ミセル成分は、約３０～７０重量％、好ましくは約４０～６０重量％の未修飾リン脂質を含有する混合物から形成される。混合物の残りは、上記列挙したミセル形成界面活性物質のいずれであってもよい。

【０１４６】

所望の全正味電荷は、上記列挙した負または正荷電化合物、特に脂質またはリン脂質（修飾リン脂質を含む）のいずれかによってミセルに付与される。

すなわち、全負電荷をミセルに付与するのに適当なリン脂質の具体例は、ホスファチジルセリン誘導体、たとえばＤＭＰＳ、ＤＰＰＳ、ＤＳＰＳ；ホスファチジン酸誘導体、たとえばＤＭＰＡ、ＤＰＰＡ、ＤＳＰＡ；ホスファチジルグリセロール誘導体、たとえばＤＭＰＧ、ＤＰＰＧおよびＤＳＰＧである。

【０１４７】

また修飾リン脂質、特にＰＥＧ－修飾ホスファチジルエタノールアミンも有利に使用でき、たとえばＤＭＰＥ－ＰＥＧ７５０、－ＰＥＧ１０００、－ＰＥＧ２０００、－ＰＥＧ３０００または－ＰＥＧ５０００；ＤＰＰＥ－ＰＥＧ７５０、－ＰＥＧ１０００、－ＰＥＧ２０００、－ＰＥＧ３０００または－ＰＥＧ５０００；ＤＳＰＥ－ＰＥＧ７５０、－ＰＥＧ１０００、－ＰＥＧ２０００、－ＰＥＧ３０００または－ＰＥＧ５０００；ＤＡＰＥ－ＰＥＧ７５０、－ＰＥＧ１０００、－ＰＥＧ２０００、－ＰＥＧ３０００または－ＰＥＧ５０００；および上記リン脂質の各リゾ体、たとえばリゾホスファチジルセリン誘導体、リゾホスファチジン酸誘導体（たとえばリゾ－ＤＭＰＡ、－ＤＰＰＡまたは－ＤＳＰＡ）およびリゾホスファチジルグリセロール誘導体（たとえばリゾ－ＤＭＰＧ、－ＤＰＰＧまたは－ＤＳＰＧ）が挙げられる。

【０１４８】

負荷電脂質の具体例は、胆汁酸塩、たとえばコール酸塩、デオキシコール酸塩またはグリココール酸塩；および脂肪酸塩、たとえばパルミチン酸塩、ステアリン酸塩、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－３－スクシニルグリセロール塩または１，３－ジパルミトイル－２－スクシニルグリセロール塩である。

好ましくは、負荷電化合物はＤＰＰＡ、ＤＰＰＳ、ＤＳＰＧ、ＤＳＰＥ－ＰＥＧ２０００、ＤＳＰＥ－ＰＥＧ５０００またはこれらの混合物から選ばれる。

【０１４９】

負荷電成分は典型例として、対応する正の反対イオンと会合し、該反対イオンは、一価（たとえばアルカリ金属）、二価（たとえばアルカリ土類金属）または三価（たとえばアルミニウム）であってよい。かかる反対イオンは好ましくは、アルカリ金属カチオン、たとえばLi^+、Na^+またはK^+、より好ましくはNa^+から選ばれる。

【０１５０】

マイクロベシクルに全正電荷を付与するのに適するリン脂質の具体例は、ホスファチジルコリンのエステル、たとえば１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－エチルホスホコリン（エチル－ＤＳＰＣ）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－エチルホスホコリン（エチル－ＤＰＰＣ）である。負反対イオンは好ましくは、ハロゲンイオン、特に塩素または臭素である。正荷電脂質の具体例は、上記で列挙したような、少なくとも１つの（C_{10}－C_{20}）、好ましくは（C_{14}－C_{18}）アルキル鎖を有するアルキルアンモニウム塩、または（C_3－C_6）アルキレン橋を介してＮ－原子に結合した１または好ましくは２つの（C_{10}－C_{20}）、好ましくは（C_{14}－C_{18}）アシル鎖を有する第三または第四アンモニウムである。

【０１５１】
正荷電化合物として、エチル－ＤＰＰＣ、エチル－ＤＳＰＣ、ＤＳＴＡＰまたはこれらの混合物が使用される。
正荷電成分は典型例として、対応する負の反対イオンと会合し、該反対イオンは、一価（たとえばハロゲン）、二価（たとえばスルフェート）または三価（たとえばホスフェート）であってよい。かかる反対イオンは好ましくは、ハロゲンイオン、たとえばF^-（フッ素）、Cl^-（塩素）またはBr^-（臭素）から選ばれる。
さらに、全（負または正）正味電荷を有するミセルの形成に、上記マイクロバルーン形成物質の中で列挙したものなどのイオン性ポリマーを有利に使用することができる。
【０１５２】
上記の如く幾つかの実施態様において、所望のミセル構造を形成するのに、荷電分子を上記列挙したものなどの中性両親媒性化合物（中性リン脂質を含む）と有利に混合することができる。上記列挙の荷電化合物と混合すべき好ましい中性化合物は、高分子界面活性物質、たとえばPluronic F68、Pluronic F108、Pluronic F-127（ＵＳＡミズーリ州のSigma Aldrich）などのエチレンオキシド－プロピレンオキシドブロックコポリマー；ポリオキシエチル化アルキルエーテル、たとえばBrij（登録商標）78（ＵＳＡミズーリ州のSigma Aldrich）；ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、たとえばMyrj（登録商標）53またはMyrj 59（ＵＳＡミズーリ州のSigma Aldrich）；ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、たとえばTween（登録商標）60（ＵＳＡミズーリ州のSigma Aldrich）；ポリエチレングリコールｔ－オクチルフェニルエーテル、たとえばTriton（登録商標）X-100（ＵＳＡミズーリ州のSigma Aldrich）；ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）である。本発明の１実施態様によれば、ミセルは、荷電両親媒性化合物と中性リン脂質および１種以上の上記列挙中性化合物の混合物によって形成される。
【０１５３】
本発明の幾つかの好ましい実施態様において、荷電界面活性物質の量は、ミセルの実質的全体を構成しうる（すなわち、ミセル形成物の総重量の少なくとも８０％、好ましくは少なくとも９０％、より好ましくは約１００％を構成）。幾つかの他の好ましい実施態様において、特にミセルを形成する化合物の少なくとも１種が未修飾リン脂質であるとき、ミセルを形成する荷電界面活性物質の総量は好ましくは、約１～８０％、より好ましくは約２～５０％である。
【０１５４】
ミセルは当該分野で公知の手順により、上記化合物を水性液体担体に分散し、次いで必要に応じて混合物をかきまぜることによって製造することができる。適当な液体担体の具体例は、水、食塩水（塩化ナトリウム０．９％）、リン酸塩緩衝食塩水（１０ｍＭ、ｐＨ７．４）、ＨＥＰＥＳ緩衝液（２０ｍＭ、ｐＨ７．４）、水中グルコース５％ｗ／ｗである。たとえば、上記化合物を水性液体中約１～１００ｍｇ／ｍＬの濃度で分散させ、次いで攪拌または音波破砕（音波処理）で溶解させることができる。
【０１５５】
次いでミセルを水性分散液（たとえばその調製に用いた水性担体中）として貯蔵してから、マイクロベシクル含有の懸濁液とあるいは（以下に詳細に説明するように）水性－有機エマルジョンに混ぜることができ、これによってマイクロベシクルを製造する。別法として、ミセル懸濁液を通常の技法に従い凍結乾燥して、液体を除去し、次いで最終乾燥生成物を次の使用のため貯蔵することができる。
【０１５６】
リポソーム
本発明に係るアセンブリーにおいてマイクロベシクルにＭＡＣと同様に会合させることができる別の超分子構造は、リポソーム、特に小さな一枚膜の（unilamella）ベシクル（ＳＵＶ）リポソームである。
語句リポソームとは、概して１以上の同心層（concentric）形状の、脂質化合物を含む両親媒性化合物の実質上球状の凝集を包含する。一般的にリポソームは、水性懸濁液中で

形成され、かつ両親媒性化合物の少なくとも１つの二層構造を有する。

【０１５７】

二層構造の外面層を形成する両親媒性化合物の親水性頭部は、球状構造の外部の方に向き、一方、二層構造の内面層を形成する両親媒性化合物の親水性頭部は、球状構造の内部の方に向いている。リポソームの球状構造の内部には一般に、外側の水性懸濁液には存在しない（あるいは存在してもほんのわずかな）追加の化合物を必要に応じて含有する、水性懸濁液の同じ液体が充填される。

【０１５８】

リポソームを製造する好ましい物質は、上記列挙したものなどのリン脂質であって、必要に応じて他の上記列挙の両親媒性化合物のいずれかと混合されてよい。

ＳＵＶリポソームは、通常の技法に従いたとえば、超音波処理、エクストルージョン法または微小流動化により、ＭＬＶ（多重層ベシクル（Multilamellar large vesicles））懸濁液を適切に加工することによって、形成することができる。ＭＬＶはたとえば、リン脂質を有機溶剤に溶解し、有機溶剤を減圧蒸発して、リン脂質薄膜を得、最後にリン脂質の転移温度を越える温度で薄膜を水和することによって、得ることができる。

【０１５９】

すなわち、得られるＭＬＶを超音波放射にさらすことにより、所望のＳＵＶリポソームが得られる。別法として、ＭＬＶを、減少孔径を持つ（たとえば１．０、０．８、０．６、０．４および０．２μｍ）多数の膜（たとえばポリカーボネートの）で押出し、次いでより小さな孔寸法を持つ押出機（たとえばＬＩＰＥＸ　Biomembranes（登録商標）、カナダ）で押出して、最終ＳＵＶを得ることができる。さらにＳＵＶの他の製造加工として、ＭＬＶを微小流動化装置（たとえばMicrofluidics Corporation製）にて、該微小流動化装置内のリポソームの再循環の量に応じて高圧下で均質化し、リポソームのサイズを約１００ｎｍもしくはそれ以下に縮小することができる。

【０１６０】

これらおよび他のＳＵＶ製造法はたとえば、参考文献“Liposomes, a practical approach”, edited by Roger R.C. New, Oxford University Press, 1989に開示されている。

ＳＵＶリポソームの寸法は典型例として、約２５～１００ｎｍ、好ましくは約３０～１００ｎｍである。数平均直径は、約３０～６０ｎｍ、好ましくは約３０～５０ｎｍで変化しうる。

リポソームの再検討およびその製造法も、上記引用の参考文献“Surfactants and Polymers in Drug Delivery”, by M. Malmsten, Ch. 4, pp. 87-131, Marcel Dekker Inc. Ed., 2002に記載されている。

【０１６１】

ＭＡＣとして本発明のアセンブリーのマイクロベシクルに会合しうる他の構造としては、コロイドナノ粒子、たとえばコロイド金ナノ粒子が挙げられる。これらのナノ粒子は典型例として、実質的不溶の固体ナノ粒子を含有する水溶液に、適当な分散剤を加えて、コロイドナノ粒子（すなわち、分散剤で被覆された固体ナノ粒子）の水性懸濁液を形成することによって得られる。

【０１６２】

たとえば、コロイド金ナノ粒子は、金ナノ粒子（約２～５０ｎｍの直径を持つ）を水溶液中クエン酸ナトリウムで分散することによって、得ることができる（たとえば、Grabarの“Preparation and Characterization of Au colloid monolayers”, Analytical Chemistry, Vol. 67, p.735, 1995参照）。気体封入マイクロベシクルと会合するコロイド金ナノ粒子を用いることにより、上記マイクロベシクルが崩壊を起こすとき（たとえば制御高エネルギー超音波照射によって誘発）、選択組織における浸透深さを大きくすることができる。

【０１６３】

すなわち、コロイド金ナノ粒子からなるアセンブリーはたとえば、対生物活性剤からなる他のＭＡＣと会合して、該対生物活性剤の選択組織への浸透深さを大きくすることがで

き、これによって治療処置の有効性を高めることができる。

【０１６４】

他のＭＡＣｓは、固体ポリマーナノ粒子によって形成することができる。これらの固体ポリマーナノ粒子は、気体封入マイクロベシクルの製法に関して前記列挙したポリマー物質のいずれかで形成でき、かかるポリマー物質としては、生分解性の生理的に許容しうるポリマー、たとえば実質的に水不溶性のポリサッカリド（たとえばキトサンまたはキチン）、ラクチドとラクトン、たとえばγ－カプロラクトンまたはδ－バレロラクトンのコポリマー、エチレンオキシドとラクチド、ポリエチレンイミン、ポリペプチド、およびたん白、たとえばゼラチン、コラーゲン、グロブリンまたはアルブミンのコポリマーが挙げられる。

【０１６５】

他の適当なポリマーは、上記ＵＳ特許５７１１９３３に記載および上記列挙のポリマーである。非生分解性ポリマー、特に水不溶性の生理的に許容性および生体抵抗性ポリマーも使用でき、好ましくは上記生分解性ポリマーのいずれかと混合される。かかる非生分解性ポリマーはたとえば、ポリスチレンなどのポリオレフィン、ポリアクリレートあるいはポリアクリロニトリルなどのアクリル樹脂、ポリカーボネートなどのポリエステル、ポリウレタン、ポリウレアおよびこれらのコポリマーであってよい。ＡＢＳ（アクリル－ブタジエン－スチレン）が好ましいコポリマーである。

【０１６６】

標的配位子および対生物活性／診断剤

本発明に係るアセンブリーの、特にミセル形状のＭＡＣは、その構造内に、標的、診断および／または生物学的活性を有する化合物を有利に包含しうる。

ＭＡＣに含まれる標的配位子は、合成、半合成または天然産出のものであってよい。標的配位子として役立ちうる材料もしくは物質としては、たとえば、これらに限定されないが、抗体、抗体フラグメント、レセプタ分子、レセプタ結合分子、糖たん白およびレクチンを含むたん白；オリゴペプチドおよびポリペプチドを含むペプチド；ペプチド擬似体；モノおよびポリサッカリドを含むサッカリド；ビタミン；ステロイド、ステロイド類縁体、ホルモン、補因子、対生物活性剤、およびヌクレオシド、ヌクレオチドおよびポリヌクレオチドを含む遺伝子物質が挙げられる。

【０１６７】

適当な標的や標的配位子の具体例は、たとえばＵＳ特許６１３９８１９に開示されている。

標的配位子は、ＭＡＣの最終構造に含ませるべきＭＡＣ組成物の他の成分と混合される化合物そのもの、あるいはＭＡＣの形成に用いる両親媒性分子に結合する化合物であってよい。

【０１６８】

１の好ましい実施態様において、標的配位子は共有結合を介してＭＡＣの両親媒性化合物に結合しうる。このような場合、両親媒性分子上に存在させる必要がある特定の反応性部分は、これにカップリングさせる個々の標的配位子に依存するだろう。一例として、標的配位子がアミノ基を介して両親媒性分子に結合しうる場合、両親媒性分子の適当な反応性部分は、イソシアネート基（チオ尿素結合を形成する）、反応性エステル（アミド結合を形成）、アルデヒド基（アルキルアミン結合に還元すべきイミン結合の形成のため）等であってよく；標的配位子がチオール基を介して両親媒性分子に結合しうる場合、両親媒性分子の適当な相補反応性部分は、ハロアセチル誘導体またはマレイミド（maleimides）（チオエーテル結合を形成）を包含し；および標的配位子がカルボキシル基を介して両親媒性分子に結合しうる場合、両親媒性分子の適当な反応性部分は、アミンやヒドラジド（アミドまたはアルキルアミド結合を形成）であってよい。

【０１６９】

所望の標的配位子を共有結合させるためには、ＭＡＣを形成する両親媒性化合物の少なくとも一部は、適当な反応性部分を含有するだろうし、また相補性官能基を含有する標的

配位子は、公知の技法に従い、たとえばそれをＭＡＣの両親媒性成分を有する水性分散液に加えることによって、上記反応性部分に結合するだろう。ＭＡＣの調製前に、両親媒性化合物を所望標的配位子とコンバインでき、そして得られる併用物をＭＡＣの調製プロセスで使用できる。別法として、標的配位子はＭＡＣの調製プロセス中にそれぞれの両親媒性化合物に結合することができ、あるいはミセル構造の前に両親媒性化合物に直接結合することができる。

【０１７０】

他の実施態様によれば、標的配位子は物理的および／または静電相互作用を介してＭＡＣに適宜会合してもよい。一例として、相補部分に対し高い親和性と選択性を有する官能部分を、両親媒性分子に導入することができ、同時に相補部分が標的配位子に結合するだろう。たとえば、アビジン（またはストレプトアビジン）部分（ビオチンに対し高い親和性を有する）は、リン脂質に共有結合が可能で、同時に相補性ビオチン部分を、適当な標的配位子、たとえばペプチドまたは抗体に導入することができる。

【０１７１】

すなわち、ビオチン－標識標的配位子は、アビジン－ビオチンカップリングシステムにより、ＭＡＣのアビジン－標識リン脂質に会合するだろう。別法として、リン脂質と標的配位子の両方にビオチン部分を付与した後、アビジン（２つのビオチン部分をブリッジしうる二官能性成分）で互いにカップリングさせることもできる。またリン脂質とペプチドのビオチン／アビジンカップリングの具体例も、上記ＵＳ特許６１３９８１９に開示されている。別法として、ファンデルヴァールス相互作用、静電相互作用および他の会合法により、標的配位子を両親媒性分子に会合もしくは結合させることができる。

【０１７２】

他の実施態様によれば、標的配位子は、結果的にＭＡＣ構造に取込むべき、ＭＡＣ形成成分と混合される化合物、たとえば国際特許出願ＷＯ９８／１８５０１または９９／５５３８３に開示のリポペプチドなどであってよい。

【０１７３】

別法として、最初に、標的配位子の対応する相補部分と相互作用しうる適当な部分を有する化合物からなるＭＡＣを製造し；その後に該ＭＡＣ懸濁液に所望の標的配位子を加えて、ＭＡＣの対応相補部分に結合させることができる。さらに別法として、標的配位子の対応する相補部分と相互作用しうる適当な部分を有する化合物を包含するＭＡＣからなるアセンブリーを製造し；その後に該アセンブリー懸濁液に所望の標的配位子を加えて、ＭＡＣの対応部分に結合させることができる。

【０１７４】

アセンブリーが指向されうる適当な特定標的の具体例は、フィブリンおよび賦活した血小板のＧＰIIｂIIIａ結合レセプタである。フィブリンや血小板は実際には概して“血栓”、すなわち、血流中に形成して、血管閉塞を起しうる凝塊に存在する。適当な結合ペプチドは、たとえば上記のＵＳ特許６１３９８１９に開示されている。フィブリン－ターゲティングに対し特異的な他の結合ペプチドは、たとえば国際特許出願ＷＯ０２／０５５５４４に開示されている。

【０１７５】

重要な標的の他の具体例としては、傷つきやすいプラクのレセプタや腫瘍特異性レセプタ、たとえばキナーゼ・ドメイン領域（ＫＤＲ）およびＶＥＧＦ（血管内皮成長因子）／ＫＤＲ複合体が挙げられる。ＫＤＲまたはＶＥＧＦ／ＫＤＲ複合体に適する結合ペプチドは、たとえば国際特許出願ＷＯ０３／７４００５およびＷＯ０３／０８４５７４に開示されている。

【０１７６】

対生物活性剤としては、患者の病的状態（疾患、心身苦悩、病気、外傷または損傷）のいずれかの処置（診断、予防、軽減、苦痛除去または治癒を含む）で使用できる化合物または物質のいずれをも包含する。対生物活性剤の具体例は、前記列挙のものである。これらの中で、薬物または製薬、特に実質的に疎水性であるか、あるいは実質的疎水性の関連

部分を含有する有機分子（典型例として合成分子）からなる薬物が好ましい。これらの分子は実際に、ＭＡＣ形成両親媒性物質の親油性（または疎水性）との親和力故に、ＭＡＣ、特にミセルの構造に比較的容易に取込むことができる。

【０１７７】

たとえば、ＭＡＣ、特にミセルを形成する両親媒性物質含有の水性担体に、有機分子を分散させることができ、この場合、親和力によってＭＡＣの疎水性部の中へ取込まれるだろう。別法として、親水性薬物または有機分子も、特にＭＡＣがリポソームの形状にあるとき、該ＭＡＣの中に取込むことができる。この場合、親水性化合物はリポソームの内部水性部に入れられているのが好ましい。

【０１７８】

ＭＡＣの構造に取込むかあるい会合できる薬物の具体例はたとえば、上記ＷＯ９９／５３９６３に記載のものであって、抗腫瘍剤、たとえばビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン、ブスルファン、クロラムブシル、スピロプラチン、シスプラチン、カルボプラチン、メトトレキサート、アドリアマイシン、ミトマイシン、ブレオマイシン、アラビノシルシトシン、アラビノシルアデニン、メルカプトプリン、ミトーテン、プロカルバジン、ダクチノマイシン（アンチノマイシンＤ）、ダウノルビシン、塩酸ドキソルビシン、タキソール、プリカマイシン、アミノグルテチミド、エストラマスチン、フルタミド、ロイプロリド、酢酸メゲストロール、タモキシフェン、テストラクトン、トリロスタン、アムサクリン（ｍ－ＡＭＳＡ）、アスパラギナーゼ（ラスパラギナーゼ）、エトポシド、インターフェロンα－２Ａおよび２Ｂ、ヘマトポルフィリンまたはその誘導体などの血液生成物；

【０１７９】

生物学的レスポンス変性剤、たとえばムラミルペプチド；抗真菌剤、たとえばケトコナゾール、ナイスタチン、グリセオフルビン、フルシトシン、ミコナゾールまたはアンホテリシンＢ；ホルモンまたはホルモン類縁体、たとえば成長ホルモン、メラニン細胞刺激ホルモン、エストラジオール、ジプロピオン酸ベクロメタゾン、酢酸コルチゾン、デキサメタゾン、フルニソリド、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、酢酸パラメタゾン、プレドニゾロン、プレドニゾン、トリアムシノロンまたは酢酸フルドロコルチゾン；ビタミン、たとえばシアノコバラミンまたはレチノイド；酵素、たとえばアルカリ性ホスファターゼまたはマンガンスーパーオキシドジスムターゼ；抗アレルギー剤、たとえばアメレキサノックス；

【０１８０】

抗凝固剤、たとえばワルファリン、フェンプロクーモンまたはヘパリン；抗血栓剤；血液運搬薬、たとえばプロプラノロール；代謝増強剤、たとえばグルタチオン；抗結核薬、たとえばｐ－アミノサリチル酸、イソニアジド、硫酸カプレオマイシン、サイクロセキシン、エタンブトール、エチオナミド、ピラジナミド、リファンピンまたは硫酸ストレプトマイシン；抗ウイルス薬、たとえばアシクロビル、アマンタジン、アジドチミジン、リバビリンまたはビダラビン；血管拡張剤、たとえばジルチアゼム、ニフェジピン、ベラパミル、四硝酸エリトリトール、イソソルビドジニトレート、ニトログリセリンまたは四硝酸ペンタエリトリトール；

【０１８１】

抗生物質、たとえばダプソン、クロラムフェニコール、ネオマイシン、セファクロール、セファドロキシル、セファレキシン、セフラジン、エリスロマイシン、クリンダマイシン、リンコマイシン、アモキシリン、アンピシリン、バカンピシリン、カルベニシリン、ジクロキサシリン、シクラシリン、ピクロキサシリン、ヘタシリン、メチシリン、ナフシリン、ペニシリンまたはテトラサイクリン；抗炎症薬、たとえばジフルニサル、イブプロフェン、インドメタシン、メクロフェナメート、メフェナム酸、ナプロキセン、フェニルブタゾン、ピロキシカム、トルメチン、アスピリンまたはサリチル酸塩；抗原生動物薬、たとえばクロロキン、メトロニダゾール、キニンまたはメグルミン・アンチモネート；

【０１８２】

抗リウマチ薬、たとえばペニシラミン；麻酔薬、たとえばアヘン安息香チンキ；アヘン剤、たとえばコデイン、モルヒネまたはオピウム；強心薬グリコシド、たとえばデスラノシド、ジギトキシン、ジゴキシン、ジギタリンまたはジギタリス；神経筋遮断薬、たとえばアトラクリウム・メシレート、ガラミントリエチオライド、臭化ヘキサフルオレニウム、沃化メトクリン、臭化パンクロニウム、塩化スクシニルコリン、塩化ツボクラリンまたは臭化ベクロニウム；鎮静薬、たとえばアモバルビタール、アモバルビタール・ナトリウム、アプロバルビタール、ブタバルビタール・ナトリウム、抱水クロラール、エトクロルビノール、エチナメート、塩酸フルラゼパム、グルテチミド、塩酸メトトリメプラジン、メチプリロン、塩酸ミダゾラム、パラアルデヒド、ペントバルビタール、セコバルビタール・ナトリウム、タルブタール、テマゼパムまたはトリアゾラム；

【０１８３】

局所麻酔薬、たとえばブピバカイン、クロロプロカイン、エチドカイン、リドカイン、メピバカイン、プロカインまたはテトラカイン；全身麻酔薬、たとえばドロペリドール、エトミデート、クエン酸フェンタニールとドロペリドール、塩酸ケタミン、メトヘキシタール・ナトリウムまたはチオペンタールおよびこれらの医薬的に許容しうる塩（たとえば塩酸塩あるいは臭酸塩などの酸付加塩、またはナトリウム、カルシウムあるいはマグネシウム塩などの塩基塩）または誘導体（たとえば酢酸塩）；および放射化学薬品、たとえば^{177}Ｌｕ、^{90}Ｙまたは^{131}Ｉなどのアルファ、ベータまたはガンマ－エミッター含有薬品が挙げられる。

【０１８４】

特別に重要なものは、ヘパリンなどの抗血栓剤やヘパリン様活性を持つ作用物質、たとえばアンチトロンビンIII、ダルテパリンおよびエノキサパリン（enoxaparin）；血小板凝集インヒビター、たとえばチクロピジン、アスピリン、ジピリダモール、イロプロスト（iloprost）およびアブシキシマブ（abciximab）；および血栓崩壊酵素、たとえばストレプトキナーゼおよびプラスミノゲン・アクチベーターである。対生物活性剤の他の具体例としては、組換えＲＮＡおよびＤＮＡを含む、核酸、ＲＮＡ、および天然もしくは合成オリジンのＤＮＡなどの遺伝物質が挙げられる。

【０１８５】

上記特許に記載の如く、一定たん白質をコード化するＤＮＡを、多種にわたる多くの病気の処置に使用しうる。たとえば、前進性癌の処置には腫瘍壊死因子あるいはインターロイキン－２を用い；卵巣癌や脳腫瘍の処置にはチミジンキナーゼを用い；神経芽腫、悪性黒色腫または腎臓癌の処置にはインターロイキン－２を用い；および癌の処置にはインターロイキン－４を用いることができる。

【０１８６】

本発明のアセンブリーにおいてＭＡＣに取込むまたは会合させる診断剤は、診断技法に関してイメージング向上を可能ならしめるいずれかの化合物、組成物または粒子であって、上記イメージングとして磁気共鳴イメージング、Ｘ線、特にコンピューター使用Ｘ線断層撮影、光学イメージング、核イメージングまたは分子イメージングが包含される。適当な診断剤の具体例は、磁鉄鉱ナノ粒子、沃素化化合物、たとえばIomeprol（登録商標）、または常磁性イオン複合体、たとえば疎水性ガドリニウム複合体である。

【０１８７】

たとえば、磁鉄鉱ナノ粒子を上述の負荷電両親媒性物質（および必要に応じて中性物質）と混合して、該粒子を安定化し、かつ水溶液に分散保持することができる。ＵＳ特許５５４５３９５には、上記磁鉄鉱粒子を安定化するのにＤＰＰＡとPluronic（登録商標）の混合物の使用による、安定化した磁鉄鉱粒子の幾つかの製造例が示されている。別法として、たとえばヨーロッパ特許ＥＰ８０４２５１に開示の如く、ガドリニウム複合体を適当なミセル形成化合物と混合して、ガドリニウム含有ＭＡＣを形成することができる。

【０１８８】

アセンブリー

本発明アセンブリーの相対組成を評価するため、本発明者は、マイクロベシクルおよび

ＭＡＣ中の荷電化合物の量（“電荷当量”で表示）と、マイクロベシクルおよびアセンブリーの懸濁液のζ－電位を参照することが有用であることがわかった。

語句“電荷当量”（ＥＣ）とは、化合物１モル当りの電荷の数を示す。すなわち、１モルのモノイオン性化合物は１つのＥＣを含有し、１モルのジイオン性化合物は２つのＥＣを含有する等々である。

【０１８９】

ζ－電位（ゼータ電位）は、界面動電電位とも呼ばれているが、これは長い距離をおいて、内部媒体（bulk medium）中の電位とコロイド粒子の表面電位の差である。それは通常のマイクロ電気泳動分析法に従って、たとえばレーザー－ドップラー－アネモメトリー（Laser－Doppler－Anemometry）によるドライビング電場内の粒子速度の測定によって測定するとができる。

【０１９０】

たとえば、ZetaSizer 3000 Has（Malvern Instrument GmbH）を有利に使用できる。実際には、マイクロベシクルの初期懸濁液のζ－電位を最初に測定し、該電位はマイクロベシクルがそれぞれ、正または負の荷電化合物を含有するかどうかに基づき、正または負の値を有することができる。次に、アセンブリーを含有する最終懸濁液のζ－電位を測定する（すなわち、ひょっとして未結合のＭＡＣｓを除去する必要な洗浄工程後に）。

【０１９１】

一般に、マイクロベシクルに対し反対符号のＭＡＣｓの添加は、懸濁液のζ－電位の絶対値の多少の明らかな減少を決定する。特に、正荷電マイクロベシクルを有する懸濁液は、負荷電ＭＡＣｓの懸濁液を加えるとζ－電位の減少を示し、一方、負荷電マイクロベシクルを有する懸濁液は、正荷電ＭＡＣｓの懸濁液を加えるとζ－電位の相対的増加（すなわち、絶対値の減少）を示すだろう。

【０１９２】

本発明者が認めるように、好ましいアセンブリーは、初期のマイクロベシクル懸濁液に対して絶対値の実質的な減少、すなわち、初期値の少なくとも５０％、好ましくは少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも９０％の減少を示す懸濁液である。特に好ましいアセンブリーの懸濁液は、実質的中性電位（すなわち、０±１０ｍＶ、マイクロベシクル懸濁液の初期電位に対し約１００％の絶対減少に相当）または初期のマイクロベシクル懸濁液のζ－電位に対し反対符号のζ－電位を示すものである。

【０１９３】

本発明者が認めるように、アセンブリー懸濁液のζ－電位が同じ符号のままで、初期マイクロベシクル懸濁液のζ－電位に対して５０％以下の絶対減少を有するとき、これは、マイクロベシクルに会合するＭＡＣｓの数が不十分であることの表示となりうる。

【０１９４】

好ましい実施態様によれば、アセンブリーにおける荷電ＭＡＣｓの量は、該アセンブリーに実質的中性ζ－電位またはマイクロベシクルのζ－電位に対し反対符号のζ－電位を付与するような量である。しかしながら、本発明者が認めるように、上記中性または反対符号のζ－電位のアセンブリーを得るのに、アセンブリーがＭＡＣからの過剰な電荷当量を含有する必要はない。

【０１９５】

実を言うと、それにもかかわらず、正のマイクロベシクルと負のＭＡＣｓからなり、かつＭＡＣのＥＣとマイクロベシクルの反対電荷の当量との比が約１：５（すなわち、マイクロベシクル上の正電荷約５倍過剰）であるアセンブリーは、実質上中性または負のζ－電位を示しうることが認められた。いずれかの個々の理論に拘束されることを望まないが、ＭＡＣｓに含まれる（負）電荷は、アセンブリーの外面に配置し；マイクロベシクルに会合するＭＡＣｓの数が十分に大きければ、マイクロベシクル上の過剰の（正）電荷は結果的にＭＡＣｓによって、少なくとも部分的に遮蔽される（screened）ことが推測される。

【０１９６】

すなわち、粒子に関して測定したζ－電位は、該粒子の外境界に存在する電荷によって強く影響されるので、マイクロベシクルから由来する過剰の（正）電荷当量を有するアセンブリーでさえも、（負）荷電ＭＡＣｓの量が、マイクロベシクルの（正）電荷を部分的に遮蔽するのに十分であれば、負のζ－電位を示しうる。これらの事項の全ては勿論、負荷電マイクロベシクルと正荷電ＭＡＣｓによって形成されるアセンブリーにも適用可能である。

【０１９７】

一般に、アセンブリーの最終懸濁液におけるマイクロベシクルのＥＣとＭＡＣの電荷のＥＣとの比は、約１０：１～１：１０の範囲で変化しうる。好ましい実施態様によれば、形成したアセンブリーのマイクロベシクル／ＭＡＣのＥＣ比は、好ましくは約３：１もしくはそれ以下、より好ましくは約２：１もしくはそれ以下、より一層好ましくは約３：２もしくはそれ以下である。マイクロベシクルとＭＡＣｓを形成する荷電化合物の量に左右されるが、その比は勿論、小さく、たとえば約１：１から約１：４もしくはそれ以下まで下がってもよい。

【０１９８】

ＭＡＣの比較的小さな寸法を考慮して、アセンブリーの寸法（数平均直径）は典型例として、約１０μｍもしくはそれ以下で一般に約１μｍもしくはそれ以上のものである。本発明に係るアセンブリーの好ましい寸法は、約１～８μｍ、より好ましくは約２～５μｍである。

【０１９９】

さらに本発明の実施態様によれば、多層アセンブリーは、気体封入マイクロベシクルを、交番電荷（alternate charge）を有する複数の成分層に会合させることによって、形成することができる。すなわち、たとえば、正電荷を有する第１成分層（たとえばミセル）を負荷電マイクロベシクルに会合させることは可能で；次いでこのアセンブリーに、負電荷を有する第２成分層（たとえば再度ミセルまたはリポソーム）を会合させるとができる等々である。

【０２００】

第１成分層のマイクロベシクルへの会合は、ζ－電位の絶対値の減少（マイクロベシクル単独懸濁液について測定したζ－電位に対して）を引き起すだろうが、さらに第２成分層（第１成分と反対電荷を有する）の会合によって、ζ－電位が再びマイクロベシクル単独懸濁液のζ－電位に近い値へ変化することになるだろう。

【０２０１】

第１製造法によれば、マイクロベシクルを有する水性懸濁液（上記引用の製造法のいずれかに従って得る）を、アセンブリーの第２成分を有する水性懸濁液（上記引用の製造法のいずれかに従って得る）と混合することにより、アセンブリーを得ることができる。

【０２０２】

このようにして得られる混合物を必要に応じて、過剰の非会合成分を除去するため、１以上の洗浄工程に付すことができる。洗浄は、通常の洗浄技法により、適当な洗浄液、たとえば蒸留水、リン酸塩緩衝食塩水、Tris／グリセロール緩衝液、食塩水または５％グルコース溶液を用いて行なうことができる。洗浄混合物の相（一般に、上澄み相）は、本発明のアセンブリーを有することから、これを分離し、収集し；必要に応じて使用前に、回収したアセンブリー含有懸濁液を最終的に、たとえば上記の生理的に許容しうる担体のいずれかで希釈する。

【０２０３】

本発明のアセンブリーを有する懸濁液が形成すれば、これを後の投与のため貯蔵するか、あるいはそのまま投与することができる。所望ならば、懸濁液の液体担体を除去して（たとえば凍結乾燥により）、アセンブリーの乾燥粉末を得ることができ、これを再組成する前に、比較的長期間にわたって貯蔵することができる（好ましくは再組成時に気体封入マイクロベシクルを形成するのに適当な気体の存在下で）。

【０２０４】

別法として、アセンブリーの２つの成分を乾燥形状（たとえば凍結乾燥）の別々の組成物で貯蔵し、投与の前に懸濁液に再組成することができる。貯蔵の場合、乾燥成分は、水で再組成したときにマイクロベシクルを形成する気体の雰囲気中に保持することが好ましい。アセンブリーの各成分を有する２つの乾燥組成物について別々に、水性液体担体による再組成を行なうことができ、このようにして２つの別々の懸濁液が得られ、次いでこれらを混合して、所望のアセンブリー懸濁液を得る。

【０２０５】

別法として、２つの乾燥組成物をいっしょに混合し、次いで水性液体担体により単一の懸濁液として再組成しうる。この後者の場合、アセンブリーの混合成分は、水性液体担体で再組成したときにマイクロベシクルを形成する気体の存在下で貯蔵される。好ましい実施態様によれば、最初に乾燥ＭＡＣ組成物を生理的に許容しうる水性担体で再組成し、次いで得られる懸濁液を、乾燥マイクロベシクル組成物の再組成に用いて、最終的にアセンブリーの懸濁液を得る。

【０２０６】

また上記製造法のいずれかを用いて、上述の多層アセンブリーを製造することができ、すなわち、最初に荷電気体封入マイクロベシクルを、反対電荷を有する第１成分と混合し、次いで形成したアセンブリーを、マイクロベシクルと同じ電荷を有する第２成分と混合することによる。

【０２０７】

マイクロベシクルとＭＡＣｓの別々の２配合物からのアセンブリーの製造の場合、最終アセンブリーに望まれるＭＡＣｓの相対量に対して過剰量のＭＡＣｓを加えることが有利となりうるが、それは特に、アセンブリー懸濁液の任意の洗浄工程中に一定量のＭＡＣｓを除去できるからである。一般に、ＭＡＣの製造に用いる組成物中のＥＣの量は、マイクロベシクルの製造に用いる組成物中のＥＣと少なくとも実質的に等しいこと（すなわち、ＥＣ比が約１：１）が好ましい。好ましくは上記ＥＣ比は約２：１もしくはそれ以上、より好ましくは少なくとも約３：１もしくはそれ以上でたとえば３０：１までの比である。

【０２０８】

好ましい実施態様によれば、上記引用のＷＯ０４／０６９２８４に開示の方法に従って製造した、リン脂質と分散保護剤を有する水性／有機エマルジョンに、ＭＡＣ（特に上記規定のミセル）の水性懸濁液を加える。この場合、荷電ＭＡＣｓは、エマルジョンの微小液滴を包囲する両親媒性物質の反対荷電層と会合するだろう。

【０２０９】

ＭＡＣは一般に、ＭＡＣの電荷当量と懸濁液のマイクロベシクルのＥＣとの比が、少なくとも約１：２もしくはそれ以上、好ましくは２：３もしくはそれ以上、より一層好ましくは少なくとも１：１もしくはそれ以上でたとえば１０：１までの比となるような量で加えられる。同様に、前述の如く、リン脂質（および必要に応じて他の両親媒性薄膜形成化合物および／または添加剤）を有する水性媒体を所望気体の存在下で、制御高撹拌エネルギーに付すことにより得られた気体マイクロバブル分散液に、ＭＡＣの水性懸濁液を加えることができる。

【０２１０】

混合物の凍結乾燥により、所望のアセンブリーが凍結乾燥粉末で得られ、これを所望の気体と接触させて貯蔵し、次いで水性担体の添加により生理的懸濁液に再組成することができる。

貯蔵凍結乾燥物（アセンブリー、マイクロベシクルおよび／またはＭＡＣｓ）と接触する気体は、相当な大気圧（すなわち、約１０２０ｍバール±５％）で、またはヨーロッパ特許出願ＥＰ１２２８７７０に開示の大気圧より低い圧力（たとえば９００ｍバールもしくはそれ以下）で貯蔵容器に存在しうる。

【０２１１】

凍結乾燥した造影剤の再組成後の注射可能組成物は、血液との等張性をできるだけ大きくすべきである。このため、注射の前に、本発明アセンブリーを有する懸濁液に、少量の

等張剤を加えてもよい。等張剤は薬に普通に用いられる生理的溶液であって、たとえば食塩水（０．９％のＮａＣｌ）、２．６％グリセロール溶液または５％デキストロース溶液などが挙げられる。水性懸濁液の再組成は一般に、気体－貯蔵し乾燥した薄膜形成界面活性剤の簡単な溶解と穏やかな撹拌によって達成される。

【０２１２】

再組成液体の容量と濃度は、得られてすぐに使用できる配合物を等張性とするようにバランスをとることが望まれる。このため、再組成液体の選ばれる容量および濃度は、凍結乾燥生成物に存在する安定化剤（および他の増量剤）の種類や量に左右されるだろう。

【０２１３】

当業者によって認識されるように、本発明に係るアセンブリーは、種々の目的に合った異なるアセンブリーの製造において非常な順応性を可能ならしめる。実を言うと、超音波診断／治療方法に使用される基本担体成分（すなわち、マイクロベシクル）の構造は、いずれの特別な改変にも付す必要がなく、従って、上記成分の安定性の点で可能な欠点が回避される。かかる成分は、そのエンベロープに全正味電荷を有することのみが必要で、その結果は、上記エンベロープの形成に普通に用いられる通常の物質の使用によって、容易に達成することができる。

【０２１４】

実際に、マイクロベシクルとＭＡＣの静電相互作用は、両２成分の有効な会合を可能ならしめ、しかも、マイクロベシクルの構造を改変する必要がない。他方、アセンブリーの第２成分は、その安定性のその組成物の可能な改変に対する感受性が極めて少ないが、所望の標的配位子および／または生体活性化合物をそれに会合させることにより、アセンブリーに要求される特定目的に容易に適合しうる。さらに、マイクロベシクルに対するＭＡＣの比較的小さな寸法に基づき、比較的多数のＭＡＣｓを各マイクロベシクルに会合させることが可能で、これによってシステムの効率が高まる。

【０２１５】

加えて、アセンブリーのマイクロベシクルは、２種以上の異なるナノ成分と容易に会合することができ、これによって、“多目的”アセンブリーが得られる。特に、荷電マイクロベシクル（たとえば正荷電）の１つの単一配合物を、反対電荷（たとえば負）を帯びている所望タイプのＭＡＣと会合させるべき担体として使用することができる。別法として、多目的アセンブリーは、前記の多層アセンブリーの製造において、反対電荷の異なる成分を交互に層としてマイクロベシクルのまわりに配置させることによっても、得ることができる。

【０２１６】

マイクロベシクルに会合させる種々のＭＡＣｓは、それらの化学的組成または超分子構造（たとえばミセル対リポソーム）、並びにそれらに含まれる標的配位子、診断剤および／または対生物活性剤が異なってよく；多目的アセンブリーはこれらＭＣＳｓのいずれかの組合せを含有することが有利であろう。

【０２１７】

たとえば、マイクロベシクル成分は、その構造に少なくとも１種の標的配位子（病的状態または病気に付随する特定レセプタへの結合が可能な）を有する第１ナノ成分（たとえばミセル形状の）と、および第２標的配位子または生体活性化合物（たとえば上記の病的状態または病気を処置する治療化合物）を有する第２ナノ成分（たとえばミセル形状またはリポソームとしてのいずれか）とコンバイン（組合せ）することができる。

【０２１８】

“標的配位子含有成分”と“生体活性化合物含有成分”の組合せを有するアセンブリーを使用するとき、特に“多層”アセンブリーを製造するとき、アセンブリーの有効な標的活性を可能にするために、標的配位子含有成分は好ましくは、気体封入マイクロベシクルへの最後の成分として別々に会合される。

【０２１９】

多目的アセンブリーの一例は、気体封入マイクロベシクル、腫瘍特異性レセプタに結合

する標的配位子を有するミセル形状の第１成分、および腫瘍の治療処置のための放射化学薬品（ミセル形成化合物に結合またはリポソームに取込められる）を有する第２成分から成るアセンブリーである。

このように本発明のアセンブリーは、様々な診断および／または治療方法に使用できる。

【０２２０】

たとえば、適当な標的配位子を持つＭＡＣを有するアセンブリーは、特定の器官または組織を標的にするのに使用でき、次いでこれを通常の超音波イメージング技法に従って選択的にイメージング（画像形成）することができるが、それは、上記器官または組織に結合する気体封入マイクロベシクルによって決定されるイメージング増強によるものである。さらに該アセンブリーに診断剤（たとえばＭＲＩ用）が含まれれば、診断技法の併用使用が可能となる。さらに、対生物活性剤がアセンブリーに（たとえばリポソームに）含まれれば、たとえばＷＯ９９／３９７３８に開示の如く、気体封入マイクロベシクルを破壊しうる制御音波力の適用によって、選択標的（たとえば標的配位子が結合する場所）で、上記対生物活性剤の超音波－仲介放出をひき起こすことが可能である。

【０２２１】

勿論、本発明のアセンブリーは、標的配位子または医薬活性剤を有する成分といっしょに、たとえばアセンブリーの全電荷のバランスのために、使用される上記化合物の無い成分も含有しうる。

前述の通り、本発明に係るアセンブリーを形成する、特に複数ミセルの成分と気体封入マイクロベシクルの会合は、該マイクロベシクルの耐圧性を高めることがわかった。たとえば、本発明のアセンブリーを形成するため種々のミセルに会合するとき、約５００ｍｍＨｇのP_{c50}（すなわち、マイクロベシクル母集郡の５０％以上が破壊する限界圧）を示すマイクロベシクルは、該P_{c50}値を少なくとも６００ｍｍＨｇから約８００ｍｍＨｇまでに増加しうることが認められた。

【０２２２】

キット

本発明の別の側面は、本発明のアセンブリーまたはその別々の各成分を包含し、さらに必要に応じて水性液体担体を包含する診断キットに関係する。

第１実施態様によれば、水性液体担体といっしょに本発明アセンブリーを包含する２成分キットである。該２成分キットは、２つの別々の容器または二室容器を有することができる。

【０２２３】

前者の場合、第１容器は好ましくは、通常の隔壁－封鎖バイアルであって、ここで、バイアルはアセンブリーを凍結乾燥残留物（上述の方法のいずれかに従って得られる）として所望の気体に接触させて含有し、隔壁で封鎖されており、該隔壁を通じて、気体封入マイクロベシクル／ＭＡＣｓアセンブリーの懸濁液を再組成するため、担体液体を注射できるようになっている。担体液体は、好ましくは注射器の形状をとる第２容器に入れられる。注射器は好ましくは、再組成した懸濁液が補充された後に、造影剤を注射で投与するために使用される。

【０２２４】

形成アセンブリーの代わりに、第１容器は別法として、別々に凍結乾燥したＭＡＣおよびマイクロベシクル組成物の混合物を含有することができ、これを水性担体で再組成すると、所望のアセンブリーが形成される。一般に容器の手振動により、懸濁液の再組成に所望のエネルギーが得られるが、アセンブリー懸濁液の適切な再組成を確実にするために、容器への十分なエネルギーの作用を指示または可能にする手段を備えることができる（たとえば Vortex ミキサー）。

【０２２５】

二室容器は好ましくは、二室注射器であって、この場合、各成分はたとえば移動できる隔壁で別々に保持され、いったん凍結乾燥物が穏やかな振動で再組成されると、造影剤の

注射に該容器を直接使用することができる。前のとおり、容器への十分なエネルギーの作用を指示または可能にする手段を備えることができる。

【０２２６】

乾燥粉末と水溶液を無菌状態でコンバインしうる他の二室再組成システムも、本発明の技術的範囲に属することは、当業者が認識できるところである。かかるシステムにおいて、水不溶性気体と周囲間に水性相を介在できれば、生成物の保存寿命の増加に特に有利である。

別の実施態様によれば、本発明に係るキットは、ＭＡＣ組成物、マイクロベシクル組成物および必要に応じて水性担体を包含する、少なくとも２成分キットである。

【０２２７】

これらは好ましくは、少なくとも２つの別々の容器で表わされ、第１の容器は凍結乾燥したマイクロベシクル組成物を含有し（たとえば所望気体に接触させて）、第２の容器は所望の凍結乾燥したＭＡＣ組成物を含有する（必要に応じて所望の気体に接触または減圧下）。任意の第３の容器は、再組成のための水性担体を含有し、キットの中に有利に含ませることができる。要すれば、さらに凍結乾燥したＭＡＣ組成物を含有する追加の容器も、キットの中に含ませることができる。投与に際し、先ずＭＡＣ組成物を水性担体中で再組成し、次いで得られる懸濁液をマイクロベシクル組成物の再組成に用い、このようにして所望のアセンブリー懸濁液を形成する。

【０２２８】

特殊な、容器やバイアルあるいは接続システムの必要は全くなく；本発明は通常の容器、バイアルおよびアダプターを使用しうる。唯一の要件は、ストッパーと容器の良好なシールである。従って、シールの質は、主な関心の事項であり；シール保全性のいずれの低下も、望ましくない物質のバイアルへの侵入を可能ならしめるだろう。無菌状態の確実化以外に、安全かつ正確な再組成を確実にするため、製品を大気圧または減圧で栓をするのに、真空保持が必要である。容器の気体－シールを構成するストッパーの材料は好ましくは、ポリ（イソブチレン）またはブチルゴムなどのエラストマーをベースとする、エラストマーンコンパウンドまたは多成分配合物である。便宜上、Daiko Seiko Ltd.のブチルゴムストッパーが使用できる。

【図面の簡単な説明】

【０２２９】

【図１】実施例１６で測定した、カチオン性マイクロバブルとアニオン性ミセルを有するアセンブリーにおけるミセルの荷電化合物量と結合ミセル量の関係を示すグラフである。

【図２】実施例２２で製造した懸濁液ＡとＢに関して、マイクロバブルに対する反対荷電ミセル添加によるインビボ挙動の変化を示すグラフである。

【図３】実施例２２で製造した懸濁液ＣとＤに関して、マイクロバブルに対する反対荷電ミセル添加によるインビボ挙動の変化を示すグラフである。

【実施例】

【０２３０】

各実施例で、以下に示す物質を使用する。

ＰＢＳ：リン酸塩緩衝食塩水，１０ｍＭリン酸塩ナトリウム、ＮａＣｌ０．９％Ｗ／Ｗ、ｐＨ＝７．４

Ｔｒｉｓ緩衝液：Ｔｒｉｓ緩衝食塩水，１０ｍＭトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、ＮａＣｌ０．９％、ｐＨ＝７．４

ＨＥＰＥＳ緩衝液：４－（２－ヒドロキシエチル）－１－ピペラジンエタンスルホン酸（２０ｍＭ）およびＮａＣｌ（１５０ｍＭ）、ｐＨ＝７．４

Ｔｒｉｓグリセロール緩衝液：トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン１ｇ／Ｌおよび０．３Ｍグリセロール、ｐＨ＝７．２

ＤＩＯ１８マーカー：３，３’－ジオクタデシルオキサカルボシアニン（Molecular Probes Inc.,U.S.A.）

Ｇｄ－ＤＴＰＡ－（ＳＥ）$_2$：ガドリニウム－ジエチレントリアミンペンタ酢酸複合体

のジステアロイルエステル（G.W.Kabalkaらの Magnetic Resonance in Medicine 8(1988),89-95の記載に従って製造）

【０２３１】

ＤＳＰＧ：ジステアロイルホスファチジルグリセロール・ナトリウム塩（Genzyme）ＩＵＰＡＣ１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－［ホスホ－ｒａｃ－（１－グリセロール）］

ＤＡＰＣ：ジアラキドイルホスファチジルコリン（Avanti Polar Lipids）ＩＵＰＡＣ１，２－ジアラキドイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン

ＤＳＴＡＰ：１，２－ジステアロイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパンクロリド（Avanti Polar Lipids）

ＤＳＰＣ：ジステアロイルホスファチジルコリン（Genzyme） ＩＵＰＡＣ１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン

ＤＰＰＧ：ジパルミトイルホスファチジルグリセロール・ナトリウム塩（Genzyme）ＩＵＰＡＣ１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－［ホスホ－ｒａｃ－（１－グリセロール）］

【０２３２】

ＤＰＰＡ：ジパルミトイルホスファチジン酸ナトリウム塩（Genzyme） ＩＵＰＡＣ１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスフェート

ＤＰＰＣ：ジパルミトイルホスファチジルコリン（Genzyme） ＩＵＰＡＣ１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン

ＤＳＥＰＣ：ジステアロイルエチルホスファチジルコリン（Avanti Polar Lipids）ＩＵＰＡＣ１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－エチルホスホコリン

ＮａＤＯＣ：デオキシコール酸ナトリウム（Fluka）

ＤＳＰＥ－ＰＥＧ２０００：ＰＥＧ２０００修飾ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン・ナトリウム塩（Nektar Therapeutics）

【０２３３】

エチル－ＳＰＣ３：大豆エチルホスホコリン，エチル－ＤＳＰＣとエチル－ＤＰＰＣの４：１（Ｗ／Ｗ）混合物

ＤＰＰＥ－キャップ－ビオチン：１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－（キャップビオチニル）ナトリウム塩（Avanti Polar Lipids）

ＰＥＧ４０００：ポリエチレングリコール，ＭＷ＝４０００（Fluka）

Pluronic ６８：エチレンオキシド／プロピレンオキシドブロックコポリマー（Fluka）

C_4F_{10}：パーフルオロブタン

【０２３４】

マイクロベシクルの寸法および濃度は、Coulter counter Multisizer（口径：３０μｍ）を用いて測定する。

マイクロベシクル懸濁液のζ－電位は、ＮａＣｌ（１ｍＭ）中 Malvern Zetasizer ３０００ Hsa を用いて測定する。

ミセル調製物の寸法は、Malvern Zetasizer ３０００ Hsa を用いて測定する。

【０２３５】

実施例１

正荷電マイクロバルーンの製造：

トリパルミチン（６０ｍｇ）を４０℃で、シクロヘキサン（０．６ｍＬ）に溶解する。この有機相を乳化するまで、４０℃で保持する。４０ｍｇのエチル－ＳＰＣ３（カチオン性リン脂質）を６５℃で３０ｍＬの蒸留水に１５分間分散し、次いで分散液を４０℃に冷却せしめる。

有機相を水性相にて、Polytron（登録商標）ホモジナイザーＰＴ３０００（１００００ｒｐｍ、１分）を用いて乳化する。

【０２３６】

次いでエマルジョンを、５ｍＬのＰＶＡ（２００ｍｇ、ＭＷ＝９０００、Aldrich）／蒸留水で希釈し、次いで５℃に冷却し、－４５℃で１０分間凍結させ、次いで凍結乾燥する（０．２ｍバール、２４ｈ）。

凍結乾燥物を空気の存在下、蒸留水（２０ｍＬ）に再分散し、マイクロバルーンをリン酸塩緩衝食塩水を用いて遠心分離（６００ｇ、１０分）で２回洗い、マイクロバルーンの最終懸濁液を得る。この調製物のサイズ特性決定の結果は、以下の通りである：D_{V50}＝２．５４μｍ；D_N＝１．５７μｍ。

【０２３７】

実施例１ａ

蛍光標識した正荷電マイクロバルーンの製造：

マイクロバルーンを蛍光標識するため、有機相に５重量％（トリパルミチンの総重量に対して）の親油性蛍光プローブＤＩＯ１８を加えて、実施例１を繰返す。この調製物のサイズ特性決定の結果は、以下の通りである：D_{V50}＝２．３８μｍ；D_N＝１．４５μｍ。

【０２３８】

実施例２ａ－２ｅ

ＤＳＴＡＰ－含有正荷電マイクロバブルの製造：

ＤＡＰＣとカチオン性脂質ＤＳＴＡＰの混合物（下記表１の相対比参照）１５ｍｇおよび９８５ｍｇのＰＥＧ４０００を、５０℃でｔ－ブタノール（１０ｍＬ）に溶解する。溶液を１０ｍＬバイアルにサンプリングし（１バイアル当り５０ｍｇの乾燥物）、次いでChrist Epsilon ２－１２ＤＳ冷凍乾燥機（－３０℃、０．５６ｍバール、２４ｈ）で凍結乾燥する。さらに乾燥（２５℃、０．１ｍバール、５時間）後、エラストマーストッパーでバイアルに栓をし、アルミニウムフリップで封鎖する。

【０２３９】

得られる凍結乾燥物を所望の気体（C_4F_{10}／N_2＝５０：５０Ｖ／Ｖ）にさらし、次いで５ｍＬのＰＢＳ緩衝溶液に再分散して、正荷電マイクロバブルの懸濁液を得る。懸濁マイクロバブルのサイズ特性決定を表１に示す。

表１：ＤＳＴＡＰ－含有マイクロバブル

【表１】

実施例	DAPC/DSTAP モル比	D_V	D_N
2a	99:1	8.57	3.11
2b	95:5	8.64	1.73
2c	90:10	8.80	1.77
2d	80:20	9.22	1.82
2e	50:50	8.51	1.94

【０２４０】

実施例３ａ－３ｃ

負荷電マイクロバブルの製造：

ＤＡＰＣ／ＤＳＴＡＰ混合物の代わりに、同じ合計量（１５ｍｇ）のＤＰＰＧ／ＤＳＰＣ混合物を表２に示す種々の相対量を用いて、実施例２ａ－２ｅの製法を繰返す、懸濁マイクロバブルのサイズ特性決定を表２に示す。

表２：ＤＰＰＧ－含有マイクロバブル

【表２】

実施例	DSPC/DPPG モル比	D_V	D_N
3a	75:25	6.05	1.97
3b	50:50	12.97	1.97
3c	25:75	5.89	1.88

【０２４１】

実施例４

正荷電マイクロバブルの製造：

プロピレングリコールとグリセロール（３：１０Ｗ／Ｗ）の混合物５．４％（Ｗ／Ｗ）を含有する１００ｍＬの水に、ＤＳＴＡＰ（２００ｍｇ）を８０℃で５分間分散し、次いで室温まで冷却する。

分散液をC_4F_{10}雰囲気下の反応器に移し、２００００ｒｐｍ（Polytron ＰＴ３０００）で１０分間均質化し、その間、反応器口が液面より少し上になるように、回転固定子ミキシングシャフトを保持する。

【０２４２】

得られるマイクロバブルを、水を用い遠心分離で２回洗い、次いでデキストラン７．５％溶液に再分散する。

懸濁液を１０ｍＬバイアルにサンプリングする（１バイアル当り２ｍＬ）。バイアルを－４５℃に冷却し、２４時間凍結乾燥し、次いで栓をし、封鎖し、室温保持する。蒸留水に再懸濁したマイクロバブルのサイズ特性決定は、以下の通りである：D_V＝４．０４；D_N＝１．７５。

【０２４３】

実施例５ａ－５ｄ

負荷電ミセルの製造：

５０ｍｇのＧｄ－ＤＴＰＡ－（ＳＥ）$_2$（痕跡量の放射性^{153}Ｇｄを含有）および１０ｍｇのＮａＤＯＣを、３ｍｍ音波処理プローブを取付けた Branson２５０音波発生器（出力：３０％、１０分）を用いて、５％水性グルコース（１０ｍＬ）に分散して、アニオン性ミセルの水性懸濁液を得る。下記表３で示されるように、異なる量の種々の化合物を同容量の水性グルコース溶液に分散して、同製法を繰返す。

【０２４４】

表３：負荷電ミセル

【表３】

実施例	Gd-DTPA-$(SE)_2$ (mg)	NaDOC (mg)	DPPE-Cap-ビオチン(mg)	DPPA (mg)	Pluronic F68 (mg)
5a	50	10	-	-	-
5b	50	10	3.8		
5c	-	-	-	16	16
5d			2,5	16	16

【０２４５】

実施例６ａ－６ｆ

ＤＰＰＡ－含有負荷電ミセルの製造：

異なる量のアニオン性リン脂質ＤＰＰＡおよび中性リン脂質ＤＰＰＣを（下記表４に示す）、１６ｍｇのPluronic Ｆ６８と共に、３ｍｍ音波処理プローブ（Branson ２５０音波発生器、出力３０％、１０分）を用いて、１０ｍＬのＰＢＳに分散する。少量のＤＰＰＣ－H^3（１０ｍＬの最終懸濁液に対し約２．５μＣｉ）を、放射性マーカーとしてミセル調製物に加える。

【０２４６】

音波処理後、溶液を０．２μｍフィルター（ミリポア）で濾過する。室温に冷却後、ミセルサイズを Malvern Zetasizer ３０００ＨＳＡで測定し、１０ｍＬのＬＳＣカクテルHionic Fluor (Packard Bioscience) に希釈する５０μＬの溶液を用いて、比放射能を測定し、次いで Tricarb ２２００Ａ液体シンチレーション分析器（Packard Bioscience）でカウントする。

【０２４７】

表４：ＤＰＰＡ－含有負電荷ミセル

【表４】

実施例	DPPC (mg)	DPPA (mg)	DPPA/DPPC モル比	Pluronic F68 (mg)	DPPAの量 (% w/w)
6a	17.62	0	-	16.0	-
6b	17.30	0.16	1:99	16.0	0.48
6c	17.26	0.32	2:98	16.0	0.95
6d	15.86	1.61	10:90	16.0	4.81
6e	8.80	8.00	50:50	16.0	24.39
6f	0.88	15.27	95:5	16.0	47.5

【０２４８】

実施例７ａ－７ｂ

ＤＳＰＥ－ＰＥＧ含有負荷電ミセルの製造：

２０ｍｇのＤＳＰＥ－ＰＥＧ２０００を丸底フラスコにて、６０℃で１ｍＬのクロロホルム／エタノール（１／１，Ｖ／Ｖ）に溶解し、溶剤混合物を減圧下で蒸発し、フラスコの内壁に薄膜を形成する。次にこの脂質薄膜を６０℃にて１０ｍＬの Hepes 緩衝液で３０分間水和する。次いで溶液を０．２μｍフィルターで濾過し、室温に冷却せしめてから特性決定に付す。濾過した溶液を水に希釈し（希釈比１：３）、Malvern Zetasizer ３０００ＨＳＡでサイズ分布を分析する。

【０２４９】

上記手順による２種調製物の結果を、下記表５に要約する。

表５

【表５】

実施例	Dv (nm)	Dn (nm)
7a	15	9.9
7b	10.4	4.4

【０２５０】

実施例８

エチル－ＳＰＣ３含有正荷電ミセルの製造：

１６ｍｇのエチル－ＳＰＣ３および１６ｍｇの Pluronic Ｆ６８を、３ｍｍ音波処理プローブを取付けたBranson ２５０音波発生器（出力：３０％、１０分）を用いて、５％水性グルコース（１０ｍＬ）に分散して、カチオン性ミセルの水性懸濁液を得る。

【０２５１】

実施例９ａ－９ｅ

ＤＳＴＡＰ－含有正荷電ミセルの製造：

負荷電ＤＰＰＡの代わりに正荷電ＤＳＴＡＰを用いて、実施例６ａ－６ｆの製法を繰返す。各種調製物の脂質およびリン脂質の相対量を、下記表６に示す。

【０２５２】

表６：ＤＳＴＡＰ－含有正荷電ミセル

【表６】

実施例	DPPC (mg)	DSTAP (mg)	DPPC/DSTAP モル比	Pluronic F68 (mg)
9a	17.62	0	-	16.0
9b	17.44	0.17	99:1	16.0
9c	17.26	0.34	98:2	16.0
9d	15.86	1.69	90:10	16.0
9e	8.81	8.43	50:50	16.0

【０２５３】

実施例１０ａ－１０ｂ

カチオン性マイクロバルーンとアニオン性ミセルによるアセンブリーの製造：

実施例１のマイクロバルーン懸濁液（１ｍＬ）を、それぞれ実施例５ａまたは実施例５ｂの、異なる容量（下記表７に示す）のミセル調製物と混合する。１時間後、懸濁液をＰＢＳを用い遠心分離（６００ｇ、５分間）で２回洗い、ＰＢＳ（１．２ｍＬ）に再分散する。懸濁液のGd^{153}放射能（ガンマ計数）を測定することにより（Cobra II Autogamma計器(Packard Bioscience)を使用）、結合ミセルの量（初期ミセル調製物で測定した放射能に対する、アセンブリー懸濁液で測定した放射能の％で表示）を測定する。

【０２５４】

結果を表７に示す。

表７

【表７】

	μl ミセル/ml マイクロバルーン	DV50 (μm)	DN (μm)	結合ミセルの%
実施例 1	-	2.38	1.45	-
実施例 10a （実施例5aの非ビオチン化ミセルを持つアセンブリー）	2.5	2.69	1.66	100
	10	2.83	1.70	90.9
	25	2.81	1.71	91.4
	100	2.37	1.58	31.1
実施例 10b （実施例5bのビオチン化ミセルを持つアセンブリー）	2.5	2.63	1.66	100
	10	2.84	1.70	96.8
	25	2.84	1.73	88.1
	100	2.43	1.62	30.1

【０２５５】

上記表７から推論できるように、結合ミセルの相対量（すなわち、添加ミセルの総量に対する結合ミセルの％）は、マイクロベシクル懸濁液に加えたミセルの総量（すなわち、ミセル懸濁液の容量）の増加によって減少するが、それにもかかわらず、結合ミセルの絶対量（表７の最初と最後の欄の積（product）によって示される）は増加する。

実施例１のマイクロバルーンと実施例５ｃまたは５ｄのミセル調製物によるアセンブリーを製造することにより、実質的に同じ結果が得られる。

【０２５６】

実施例１１

実施例１０ａ－１０ｂのアセンブリーの結合活性の測定：

実施例１０ａおよび１０ｂのアセンブリー（１０μＬおよび１００μＬの各ミセル懸濁液調製物）の結合活性を試験するため、中性アビジン被覆面を以下の手順で準備する。

１２ウェルプレート（Nunc，登録商標）の各ウェルに、カーボネート緩衝液（carbonate Buffer）（ｐＨ９．５、３００μＬ）および中性アビジン（Neutr Avidin，登録商標）（Pierce、１ｍｇ／ｍＬ、５０μＬ）を加える。インキューベーション（－４℃、一夜

）後、ウェルをTween２０（０．１％）含有のＰＢＳで２回およびＰＢＳで２回洗う。ウシ血清アルブミン（ＰＢＳ中２％、３５０μＬ）を加え、インキューベーション（２５℃、１ｈ）後、ウェルをTween２０（０．１％）含有のＰＢＳで２回およびＰＢＳで２回洗う。

【０２５７】

実施例１０ａおよび１０ｂに従って製造した２・１０^{8}アセンブリーの一部を、各ウェルに加え、次いでウェルをＰＢＳで満たし、密封し、プレートをひっくり返す。反転インキューベーション（２５℃、２ｈ）後、ウェルをＰＢＳで２回洗い、４０×倍率レンズの光学顕微鏡で表面を観察する。実施例１０ｂの２つのアセンブリーは共にビオチン化ミセルを有し、中性アビジン被覆面に対し親和力を示し、１００μＬ／ｍＬ調製物は１０μＬ／ｍＬ調製物に対し、より高い有効範囲（coverage）の表面を付与する。その代わりに、実施例１０ａの対応する非ビオチン化調製物は、中性アビジン被覆面への結合活性を全く示さない。

【０２５８】

実施例１のマイクロバルーンおよび実施例５ｃの非ビオチン化ミセルからなるアセンブリーの結合活性を、実施例１のマイクロバルーンおよび実施例５ｄのビオチン化ミセルからなる対応アセンブリーのそれと比較することにより、実質的に同じ結果が得られる。

【０２５９】

実施例１２ａ－１２ｂ

カチオン性マイクロバブルとアニオン性ミセルによるアセンブリーの製造：

実施例２ｄのマイクロバブル懸濁液（１ｍＬ）を、それぞれ実施例５ａまたは５ｂの異なる容量（下記表８に示す）のミセル調製物と混合する。懸濁液を緩やかに１時間攪拌し、次いでTrisグリセロール緩衝液を用い、遠心分離（１８０ｇ、５分）で２回洗う。下層液を捨て、残留物をTrisグリセロール緩衝液（１ｍＬ）に分散する。得られるアセンブリーのサイズ、濃度およびζ－電位を、表８に示す。

【０２６０】

表８

【表８】

	ミセル／マイクロバブル懸濁液(μl/ml)	DV50 (μm)	DN (μm)	ζ-電位 (mV)
実施例 2d	-	4.74	1.82	57.1
実施例 12a（実施例５ａの非ビオチン化ミセル含有）	10	6.92	2.75	37.6
	30	8.79	2.81	-19.0
	100	7.81	2.29	-38.0
	300	6.12	1.91	-50.4
実施例 12b（実施例５ｂのビオチン化ミセル含有）	10	6.43	2.53	30.1
	30	7.31	2.37	-28.2
	100	7.22	1.94	-42.4
	300	6.11	1.87	-44.4

【０２６１】

両方の場合に、ミセル懸濁液の容量増加は、得られるそれぞれのアセンブリー懸濁液のζ－電位の減少を決定する。

実施例２ｄのマイクロバブル懸濁液の代わりに実施例２ｃまたは２ｅのマイクロバブル懸濁液を使用し、または実施例５ａおよび５ｂのミセル調製物のそれぞれの代わりに実施例５ｃおよび５ｄのミセル調製物を使用することにより、実質的に同じ結果が得られる。

【０２６２】

実施例１３

実施例１２ａ－１２ｂのアセンブリーの結合活性の測定：

実施例１２ａ－１２ｂのアセンブリーの結合活性を試験するため、実施例１１の記載に準じて、中性アビジン被覆面を準備し、次いで実施例１２ａおよび１２ｂの調製物について、異なる量（３００、１００、３０および１０μＬ）で試験する。

１００μＬ／ｍＬおよび３００μＬ／ｍＬの実施例１２ｂの調製物について、光学顕微鏡で標識結合活性を観察する。３０μＬ／ｍＬの調製物の場合結合の低下が見られるが、１０μＬ／ｍＬ混合物では粗末な結合を示す。実施例１２ａの全てのアセンブリー（ビオチン化ミセルを含有せず）は、結合活性を全く示さない。

【０２６３】

実施例１４ａ－１４ｂ

カチオン性マイクロバブルとアニオン性ミセルによるアセンブリーの製造：

実施例４に従って得たバイアルの凍結乾燥内容物を、C_4F_{10}にさらし、２ｍＬの蒸留水に再分散する。懸濁液を、ＰＢＳを用い遠心分離（１８０ｇ、１０分）で２回洗い、２ｍＬのＰＢＳに再分散する。

実施例５ａまたは５ｂに従って製造した５０μＬのミセル調製物をそれぞれ加え、混合物をC_4F_{10}雰囲気下、回転攪拌器で一夜攪拌し、次いでＰＢＳを用い遠心分離（１８０ｇ、１０分）で２回洗い、最後に２ｍＬのＰＢＳに再分散する。

下記表９に、実施例１４ａおよび１４ｂのアセンブリーの特性決定を示す。

【０２６４】

表９

【表９】

		DV_{50} (μm)	D_N (μm)	Conc. (part./ml)	ミセル収率 (%)
実施例 14a	マイクロバブル	4.57	2.75	5.50E+08	-
	アセンブリー	4.81	2.72	4.04E+08	91.9
実施例 14b	マイクロバブル	4.39	2.65	3.48E+08	-
	アセンブリー	4.45	2.44	3.45E+08	83.8

上記表９から推論できるように、形成したアセンブリーにおいてミセルの実質的全体がマイクロバブルに会合し、そして該アセンブリーは初期のマイクロバブルと実質上同じ平均直径を有している。

【０２６５】

実施例１５

アニオン性マイクロバブルとカチオン性ミセルによるアセンブリーの製造：

実施例３ｂに従って製造したマイクロバブル懸濁液（１ｍＬ）を、実施例８の異なる容量（下記表１０に示す）のミセル調製物と混合する。懸濁液を緩やかに１時間攪拌し、次いでTrisグリセロール緩衝液を用い、遠心分離（１８０ｇ、５分）で２回洗う。下層液を捨て、得られるアセンブリーをTrisグリセロール緩衝液（１ｍＬ）に分散する。表１０にアセンブリーの特性決定を示す。

【０２６６】

表１０

【表１０】

マイクロバブル懸濁液 1mL 当りのミセル懸濁液（μL）	D_V (μm)	D_N (μm)	ζ- 電位 (mV)
0	7.87	1.86	-60.2
10	11.43	4.98	-44.9
100	9.16	2.48	+17.1
300	9.20	2.12	+49.4

マイクロバブル懸濁液の初期ζ－電位の符号の逆転を決定しうるミセルの量において、アセンブリーの平均寸法は、初期マイクロバブルの寸法に近づくことが観察される。

【０２６７】

実施例１６

カチオン性マイクロバブルとアニオン性ミセルを包含するアセンブリー調製物における荷電化合物量の関数として結合ミセル量の測定：

トータル３０のアセンブリー調製物を得るため、５ｍＬガラスチューブにて、実施例２ａ－２ｅに従って製造したＰＢＳ中の１ｍＬのマイクロバブル懸濁液に、実施例６ａ－６ｆに従って製造した３００μＬのミセル溶液を混合して、各種アセンブリー懸濁液を製造する。混合した懸濁液を３０分間穏やかに攪拌し、次いで遠心分離（１８０ｇ、１０分）で２回洗って、未結合物質を除去する。ミセル内に組込まれる放射性標識分子ＤＰＰＣ－^{3}Ｈを投与して、マイクロバブルに結合するミセルの脂質分子の量を求める。

【０２６８】

図１は測定結果を示し、ここで、線Ａ～Ｅはそれぞれ、実施例２ａ－２ｅに従って製造した各マイクロベシクルを有するアセンブリーの、上記ミセル中の荷電化合物の量の関数として、マイクロベシクルに結合するミセルの量を表示する。実施例６ａ（荷電界面活性剤なし）のミセルを有するアセンブリー調製物の場合、結合ミセルが実質的に見られないことに注目することができる。さらに、マイクロベシクルに結合するミセルの量は、マイクロベシクルに含まれる荷電化合物の量の増加に伴なって増加する。結局、この特定組合せのミセル／マイクロベシクルアセンブリーの場合、ミセル中の荷電化合物の相対量が総重量の約１～５％（ｗ／ｗ）であるとき、マイクロベシクルに結合するミセルの量が高くなることを認めることができる。

【０２６９】

実施例１７

アニオン性マイクロバブルとカチオン性ミセルを包含するアセンブリー調製物における荷電化合物量の関数として結合ミセル量の測定：

トータル１５のアセンブリー調製物を得るため、それぞれ５ｍＬガラスチューブにて、実施例３ａ－３ｃに従って製造したマイクロバブル懸濁液各１ｍＬに、実施例９ａ－９ｅに従って製造したミセル溶液各３００μＬを混合して、各種アセンブリー懸濁液を製造する。混合した懸濁液を３０分間穏やかに攪拌し、次いで遠心分離（１８０ｇ、１０分）で２回洗って、未結合物質を除去する。ミセル内に組込まれる放射性標識分子ＤＰＰＣ－^{3}Ｈを投与して、マイクロバブルに結合するミセルの脂質分子の量を求める。

【０２７０】

実施例１６のアセンブリー調製物の場合と同様な結果が認められ、すなわち、マイクロベシクルに含まれる荷電化合物の量を増加することにより、マイクロベシクルに結合するミセルの量を増加でき、特にマイクロベシクルが低量の荷電化合物を含有するアセンブリーの場合、ミセル中の荷電成分の相対量が約１～５％（ｗ／ｗ）のとき、マイクロベシクルに結合するミセルの量が高くなる。

【０２７１】

実施例１８

異なる量の荷電化合物を有するマイクロバブル懸濁液に加えるミセル量の関数として結合ミセル量の測定：

トータル１２のアセンブリー調製物を得るため、実施例７ａまたは７ｂに従って製造した異なる量（５０、１００、２５０および５００μＬ）のミセル調製物を、実施例２ｂ、２ｄおよび２ｅに従って製造した１ｍＬのマイクロバブル調製物とコンバインする（特に２ｂおよび２ｄは７ａとコンバインし、２ｅは７ｂとコンバインする）。混合物を３０分間穏やかに攪拌し、水中の遠心分離（１８０ｇ／１０分）で２回洗って、未結合物質を除去する。

【０２７２】

得られる懸濁液について、サイズ分布の測定にはCoulter Counterにより、およびζ－

電位測定にはMalvern Zetasizerにより特性決定する。サンプルの一部を０．２ｍバールで２４時間凍結乾燥し、凍結乾燥物をＨＰＬＣで分析して、アセンブリー中のＤＳＰＥ－ＰＥＧの量（ＰＥ－ＰＥＧμｇ／バブルｍＬ）を測定する。結果を下記表１１で要約するが、表１１において、アセンブリーを形成する混合物に含まれるＤＳＰＥ－ＰＥＧの初期量、アセンブリー中のＤＳＰＥ－ＰＥＧの最終量（結合ミセルの量に相当）、最終アセンブリーの正電荷と負電荷の比（電荷当量で表示）および最終懸濁液のそれぞれのζ－電位が示されている。

【０２７３】

表１１：カチオン性マイクロバブルとアニオン性ミセル

【表１１】

	初期混合物	最終混合物		
	DSPE-PEG (nモル)	DSPE-PEG (nモル)	EC比	ζ-電位 (mV)
実施例 2bおよび7a	35.87	1.35	0.18	35.8
	71.75	2.34	0.43	15.6
	179.37	2.28	0.46	10.9
	358.75	3.26	0.59	-13.3
実施例 2dおよび7a	35.87	3.30	0.14	26.2
	71.75	3.69	0.18	20.8
	179.37	3.36	0.21	12.4
	358.75	4.77	0.22	-10.0
実施例 2eおよび7b	35.87	3.81	0.07	39.3
	71.75	5.24	0.10	31.5
	179.37	8.04	0.15	18.3
	358.75	9.79	0.20	9.6

【０２７４】

上記表１１から、一般に、マイクロベシクル中の荷電化合物の量が高くなればなる程、最終アセンブリー中の結合ミセルの量が高くなることが認められる。加えて、同じマイクロバブル調製物に関して、結合ＤＳＰＥ－ＰＥＧの量が高くなればなる程、ＥＣ比は高くなり、かつ各ζ－電位値は低くなる。

【０２７５】

実施例１９

カチオン性マイクロベシクルとアニオン性ミセルのアセンブリーおよびアニオン性マイクロベシクルとアニオン性ミセルの比較混合物：

２０ｍｇのＤＳＰＥ－ＰＥＧ２０００を計量し、丸底フラスコ中６０℃にてクロロホルム／メタノール（１／１、ｖ／ｖ）に溶解し、該溶剤混合物を減圧蒸発させて、フラスコの内壁に薄膜を沈着させる。この膜をさらに減圧室で一夜乾燥する。

脂質薄膜を６０℃にて５％グルコース１０ｍＬで３０分間水和し、溶液を０．２μｍフィルターで濾過し、次いで室温まで冷却してから、特性決定を行なう。

【０２７６】

この製造を２回繰返す。

実施例２ｅ（正荷電）および３ｂ（負荷電）の記載に準じ、ＤＡＰＣとＤＳＴＡＰの混合物（５０／５０、ｗ／ｗ）またはＤＳＰＣとＤＰＰＧの混合物（５０／５０、ｗ／ｗ）を用いて、マイクロバブルを製造する。バイアルをC_4F_{10}／N_2（５０：５０、ｖ／ｖ）にさらしてから、再組成する。

２．５ｍＬのミセル溶液を２．５ｍＬの５％グルコースで希釈する。ミセルの希釈溶液を用いて、凍結乾燥したマイクロバブルを再組成し、２分間渦攪拌し、次いで３０分間穏やかに混合する。

得られる懸濁液を５％グルコースを用いて２回洗い（遠心分離，１８０ｇ／１０分）、上層液を２．５ｍＬの５％グルコースに再分散する。各懸濁液のζ－電位を、Malvern Zetasizer 3000 Hsaで測定する（５０μＬ／ＮａＣｌ　１０ｍＬ、１ｍＭ）。各懸濁液のＤＳＰＥ－ＰＥＧ２０００量をＨＰＬＣで測定する。結果を下記表１２に示す。

【０２７７】

表１２：アニオン性ミセルとアニオン性またはカチオン性マイクロバブルの混合物

【表１２】

アニオン性ミセル懸濁液への組合せ物	ζ- 電位 (mV)	DSPE-PEG2000 (μg/ml)
アニオン性マイクロバブル	-41.3±2.7	0.8
カチオン性マイクロバブル	-18.3±2.5	129.0

上記表１２から、アニオン性マイクロバブルでのアニオン性ミセルの結合は実質的に得られず、すなわち、最終混合物においてごくわずかな量のＤＳＰＥ－ＰＥＧが見つけられるにすぎず、一方、ζ－電位は実質的に負のままであることが認められる。

【０２７８】

実施例２０

カチオン性マイクロバルーン－コロイド金アセンブリー：

実施例１に従って製造したカチオン性マイクロバルーンの懸濁液を、クエン酸ナトリウムで安定化した金粒子のコロイド懸濁液（Polysciences、６０ｎｍ）と、各種の比（金粒子の数／マイクロバルーンの数で表示、下記表１３参照）で混合する。２時間後、浮遊する粒子を分離し、蒸留水に再分散する。表１３は、マイクロバルン１個当り約２００金粒子の比でζ－電位の中性値が得られることを示す。

【０２７９】

表１３

【表１３】

金コロイド／マイクロバルーンの数比	カチオン性マイクロバルーン
0	+35.0
50	+23.8
100	+19.3
200	-0.7
800	-2.8
2000	-19.0

【０２８０】

実施例２１

カチオン性マイクロバブル－磁鉄鉱アセンブリー：

ＵＳ特許５５４５３９５の記載に従って、ＤＰＰＡ／Pluronic Ｆ１０８（ＦＥ／ＤＰＰＡ／Pluronic Ｆ１０８比＝３：１５：１５、ｍｇ／ｍＬ）で被覆した磁鉄鉱を製造する。溶液をTris（１ｇ／Ｌ）／グリセロール（０．３Ｍ）緩衝液（ｐＨ７．０５）で１００倍に希釈する。５ｍＬの磁鉄鉱溶液を用い、SF_6雰囲気下で、カチオン性マイクロバブル（実施例２ｄに従って製造、但し、使用する気体はC_4F_{10}／N_2混合物の代わりにSF_6である）を再分散する。２分の渦攪拌後、懸濁液を１時間穏やかに混合する。次いで浮遊粒子を、Tris／グリセロール緩衝液を用い遠心分離（１８０ｇ／１０分）で２回

洗う。サイズと濃度は、Coulter counter Multisizerで測定する。ζ－電位は、Malvern Zetasizer 3000 Hsaで測定する（希釈：５０μＬ／１０ｍＬ水）。

【０２８１】

磁鉄鉱結合は、緩和時間（Ｔ２）測定法（Bruecker：Minispec ＭＱ２０）で評価し、磁鉄鉱粒子を有さないマイクロバブルの同じ製造で実施した対照と比較する。結果を下記表１４に示す。

表１４

【表１４】

	対照懸濁液 （磁鉄鉱粒子なし）	磁鉄鉱粒子をもつ 懸濁液
ζ-電位　　(mV)	+40.4 ±0.8	-30.8 ±4.1
T2 (ms)	1800 ±300	29.3 ±0.2

上記表１４に示されるように、対照懸濁液に関してζ－電位の減少に加えて、Ｔ２の実質的な減少も見られ、このことから、磁鉄鉱含有ミセルのマイクロバブルに対する実質的な結合が確認される。

【０２８２】

実施例２２

インビボ投与での荷電マイクロバブル表面に対する反対荷電ミセルの効果：

ＤＡＰＣとＤＳＴＡＰの混合物（８０／２０、ｗ／ｗ）を用い、実施例２ｄの記載に準じて正荷電マイクロバブルを製造する。ＤＳＰＣとＤＰＰＧの混合物（５０／５０、ｗ／ｗ）を用い、実施例３ｂの記載に準じて負荷電マイクロバブルを製造する。バイアルをC_4F_{10}／N_2（５０／５０、ｖ／ｖ）にさらしてから、Tris／グリセロール緩衝液（５ｍＬ）で再組成する。

【０２８３】

実施例６ｆ（負荷電）および実施例８（正荷電）に従って、各ミセルを製造する。その後、以下に示すマイクロバブルまたはアセンブリーの懸濁液を製造する。

懸濁液Ａ：６００μＬのTris／グリセロール緩衝液を２ｍＬのマイクロバブル（実施例２ｄ－正荷電）と混合し、３０分間穏やかに混合する。

懸濁液Ｂ：実施例６ｇ（負荷電）に係る６００μＬのミセルを、２ｍＬのマイクロバブル（実施例２ｄ－正荷電）と混合し、３０分間穏やかに混合する。

【０２８４】

懸濁液Ｃ：６００μＬのTris／グリセロール緩衝液を２ｍＬのマイクロバブル（実施例３ｂ－負荷電）と混合し、３０分間穏やかに混合する。

懸濁液Ｄ：実施例８（正荷電）に係る６００μＬのミセルを２ｍＬのマイクロバブル（実施例３ｂ－負荷電）と混合し、３０分間穏やかに混合する。

【０２８５】

全ての懸濁液を、Tris／グリセロール緩衝液を用い（遠心分離で、１８０ｇ／１０分）２回洗い、上層液を２ｍＬの緩衝液に再分散する。サイズおよび濃度は、Coulter カウンターで測定する。各懸濁液のζ－電位は、Malvern Zetasizer 3000 Hsaで測定し（５０μＬ／１０ｍＬ　ＮａＣｌ，１ｍＭ）、下記表１５に示す。

表１５

【表１５】

懸濁液	ζ-電位 (mV)
A	+48.6±9.3
B	-51.9±1.3
C	-61.5±7.2
D	+37.2±9.8

【０２８６】

ウサギの耳静脈に、懸濁液を体重１ｋｇ当りマイクロバブル５Ｅ＋０６の用量で注射する。Coherent Contrast Imaging（ＣＣＩ）にて、断続イメージング（２フレーム／ｓ）の４Ｃ１－Ｓトランスデューサーを備えたAcuson Sequoia ５１２および高いメカニカルインデックス（mechanical index）（ＭＩ）を用いて、二次元超音波検査を行なう。腎臓の映像を３分間ビデオレコーダーで記録し、一連の画面を分析して、皮質の選定した関心領域（ＲＯＩ）の時間の関数として、平均ピクセル強さを測定する（図２および３）。

【０２８７】

図２および３で明らかなように、マイクロバブルに対する反対電荷のミセルの添加は、マイクロバブルのインビボ挙動を劇的に変える。すなわち、正荷電バブルは腎臓の皮質ではほとんど検出できない（懸濁液Ａ）。しかし、負荷電ミセルとのインキュベーション後、同じマイクロバブルはＲＯＩで強いシグナルを示す（懸濁液Ｂ）。同様に、負荷電マイクロバブル（懸濁液Ｃ）は腎臓で強いシグナルを示す。しかし、正荷電ミセルとの混合後では、ＲＯＩで検出できるシグナルはほとんどない。

【０２８８】

実施例２３

カチオン性マイクロバブルと、薬物を有するアニオン性ミセルのアセンブリー：

２ｍＬのマイクロバブル懸濁液（実施例（Ｅｘ．）２ａに従ってＰＢＳに分散して製造）を、下記表１６に示す異なる量のFungizone（登録商標）溶液（アンフォテリシンＢのＰＢＳ中デオキシコール酸ナトリウムによるミセル懸濁液，Bristol Myers Squibb）と混合する。懸濁液を１時間穏やかに攪拌し、次いでＰＢＳ緩衝液を用い遠心分離（１８０ｇ／５分）で２回洗う。下層液を捨て、得られるアセンブリーを緩衝液（１ｍＬ）に分散する。

【０２８９】

サイズおよび濃度は、Coulter Counter Multisizer で測定する（孔：３０μｍ、５０μＬ／０．９％ＮａＣｌ（１００ｍＬ））。ζ－電位はMalvern Zetasizer 3000 Hsaで測定する（５０μＬ／蒸留水１０ｍＬ）。マイクロバブル上のアンフォテリシンＢ量を、吸光分光分析で測定し（４０９ｎｍ、$CHCl_3$／ＭｅＯＨ（１：１）２ｍＬ中５０μＬのアセンブリー）、Fungizone（登録商標）の検量線と比較する。表１６で例証される結果は、ミセルの添加量を増加することにより、アセンブリー中に薬物の増量を含ませうることを示す。

【０２９０】

表１６：薬物を持つアセンブリー

【表１６】

	マイクロバブル懸濁液1mL当りのミセル懸濁液のμL	ζ-電位 (mV)	アンフォテリシンB (μg/ml)
Ex. 2a	-	49.1±3.0	-
+Fungizone®	10	50.8 ±4.3	42.8
	30	28.9 ±6.9	122.0
	100	-24.7 ±0.3	367.9

【０２９１】

実施例２４

二重層ミセルを持つアセンブリー：

Ｅｘ．２４ａ：負荷電バブルの製造

ＵＳ特許Ｎｏ．５８３０４３５の実施例３に記載の方法に類似する方法を用い、ＤＰＰＣ／ＤＰＰＳ－含有マイクロバブルを製造する。簡単に、１ｇのプロピレングリコールを含有する１００ｍＬの蒸留水に、５９．２ｍｇのＤＰＰＣおよび４０．８ｍｇのＤＰＰＳを分散することにより、多重層リポソーム（ＭＬＶｓ）が得られる。このリポソームを攪拌下７０℃で３０分間インキュベーションする。リポソームの平均直径は、D_Nで約１．４μｍおよびD_Vで２．７μｍである。

高速機械式乳化器（Megatron ＭＴ３０００、Kinematica、スイス）を備えた気密ガラス反応容器に、上記リポソーム懸濁液を入れる。乳化器の混合室に、C_4F_{10}含有気体袋を接続する。

【０２９２】

均質化（１００００ｒｐｍ、１分）の後に、マイクロバブルの乳白色懸濁液を得る。下層液（大部分リポソーム含有、約９０ｍＬ）を、デカンテーションで除去する。上層液（マイクロバブル含有）を回収し、蒸留水に再懸濁して総容量１００ｍＬとする。デカンテーション工程を繰返し、最終のバブル懸濁液を１０％マルトースに再懸濁する。懸濁液のアリコートを１０ｍＬガラスバイアルに集め（バイアル１個当り１ｍＬの懸濁液）、該サンプルを－４５℃で冷凍し、凍結乾燥する。

凍結乾燥後、バイアルをゴム栓で閉鎖し、排気し、C_4F_{10}／空気（１：１、ｖ／ｖ）混合物を含有する気体混合物を充填する。バイアルに栓を介して２ｍＬの蒸留水を注入し、ハンドシェイク（手振動）によって、マイクロバブルが生成する。

【０２９３】

Ｅｘ．２４ｂ：カチオン性およびアニオン性ミセルの製造

Ｅｘ．２４ｂ１

３．７３ｍｇ／ｍＬのＤＳＰＥ－ＰＴＥ０２０（マルチアームＰＥＧ－リン脂質、ＮＯＦ Corporation、日本）および１．２７ｍｇのカチオン性リン脂質ＤＰＥＰＣ（ジパルミトイル・グリセロ－３－エチルホスホコリン、Avanti（登録商標）、Polar Lipids Inc. USA）を用い、カチオン性ミセルを製造する。

Ｅｘ．２４ｂ２

４．１ｍｇ／ｍＬのＤＳＰＥ－ＰＥＧ２０００および０．９ｍｇ／ｍＬのＧＰIIbIIIa結合リポペプチド（ＤＰＰＥ－ＰＥＧ２０００－Ｌｙｓ－Ｇｌｎ－Ａｌａ－Ｇｌｙ－Ａｓｐ－Ｖａｌ、ＵＳ特許６１３９８１９の実施例３に従って製造）を用い、アニオン性および官能化ミセルを製造する。

正および負荷電ミセルは共に、５％グルコース溶液中で製造する。

【０２９４】

Ｅｘ．２４ｃ：負荷電バブルと反対電荷を有するマルチ－ＭＡＣｓ層によるアセンブリーの製造

Ｅｘ．２４ａに従って製造した約１×１０^{9}負荷電マイクロバブルを含有する２つの調製物に、Ｅｘ．２４ｂ１に従って製造した５０μＬまたは５００μＬのカチオン性ミセルをそれぞれ加える。混合物を３０分間穏やかに攪拌し、次いで遠心分離（１０００ｒｐｍ、１０分）で２回洗い、５％グルコース溶液に再懸濁する。得られるアセンブリー（Assembly）の測定したサイズおよびゼータ電位を、下記表１７に示す（“Assembly １”）。結果から、負荷電マイクロバブルをカチオン性ミセルの層で被覆した後、アセンブリー懸濁液の測定ゼータ電位は正になることが示される。

【０２９５】

次に、５０μＬのカチオン性ミセルを含有するアセンブリーおよび５００μＬのカチオン性ミセルを含有するアセンブリーにそれぞれ、１００μＬおよび２５０μＬのアニオン性ミセル懸濁液（Ｅｘ．２４ｂ２に従って製造）を加える。２つの混合物を３０分間穏やかに攪拌し、遠心分離（１０００ｒｐｍ、１０分）で２回洗い、５％グルコース溶液に再懸濁する。得られる二重層アセンブリーの直径およびゼータ電位値を、表１７に示す（“Assembly ２”）。第二層の負ミセルの存在は、ゼータ電位の対応する負の値を決定する。

【０２９６】

表１７

【表１７】

	1×10^{9} マイクロバブルに加えるミセル（μL）	D_V (μm)	D_N (μm)	ζ-電位 (mV)
マイクロバブル	0	2.4	1.3	-63
Assembly 1	50	2.5	1.4	+5
Assembly 1	500	2.2	1.3	+8
Assembly 2	100	2.0	1.3	-30
Assembly 2	250	2.2	1.3	-38

また、他のタイプのＭＡＣｓ、たとえばリポソームおよびナノ粒子を用いて、複数の交番荷電層からなる同様なアセンブリーも製造することができる。たとえば、負荷電マイクロバブルを、カチオン性および薬物含有のリポソームで被覆し、次いで第二層の標的成分を有するアニオン性ミセルを被覆することができる。

【０２９７】

実施例２５

エマルジョンからアセンブリーの製造：

ＤＡＰＣ／ＤＳＴＡＰ（８０：２０、２ｍｇ／ｍＬ）を含有する５０ｍＬの蒸留水を、７０℃で３０分間加熱し、次いで室温で冷却する。この水性相において、高速ホモジナイザー（Polytron、１００００ｒｐｍ、１分）を用い４ｍＬのパーフルオロヘキサンを乳化する。得られるエマルジョンは、Malvern Mastersizerで測定して、容量平均直径（D_{V50}）５．０μｍおよび数平均直径（D_N）２．７μｍを示す。エマルジョンを遠心分離で洗い、水に再懸濁する。該カチオン性エマルジョンの３アリコートのそれぞれに、実施例２４ｂ２に従って製造した異なる量のアニオン性ミセルを加え、この場合の各濃度はエマルジョン１ｍＬ当り１３５μＬ、２７０μＬおよび５４０μＬである。インキュベーション（穏やかな攪拌下、室温で３０分）および遠心分離による過剰ミセルの除去後、ミセル－被覆エマルジョンを２０％（ｗ／ｗ）ＰＥＧ４０００水溶液に再分散する。

【０２９８】

エマルジョン－ミセルアセンブリーをバイアルに分配し（２ｍＬ／バイアル）、次いで冷凍し、バイアル中で凍結乾燥する。凍結乾燥物バイアルの空気を排出し、C_4F_{10}に取り替える。２ｍＬの５％グルコース溶液で再組成後、乳白色のマイクロバブル－ミセルアセンブリー懸濁液を得る。Coulterカウンターおよびゼータ電位（Ｚ－pot.）分析を行

ない、その結果を下記表１８に示す。

表１８

【表１８】

ミセル／バブル (μl/ml)	バブル /ml	D_N (μm)	D_V (μm)	D_{V50} (μm)	Z-pot.
	5.88E+07	1.35	4.65	4.22	46.9
135	8.27E+08	1.23	3.70	2.35	20.3
270	8.61E+08	1.39	4.12	3.35	-4.3
540	1.04E+09	1.31	3.85	3.34	-6.3

アニオン性ミセルを増量した製造は、マイクロバブルの増量をもたらす。さらに、表面電荷特性も要求に応じて調節しうる（ゼータ電位値が正から負に変化する）。

【０２９９】

実施例２６

気体エマルジョンからアセンブリーの製造：

実施例２４ａに従い、気相としてC_4F_{10}およびリン脂質としてＤＰＰＳ（２ｍｇ／ｍＬ）を用いて負荷電マイクロバブルを得、安定したマイクロバブルとする。ＤＰＰＳリポソーム懸濁液の高速機械乳化（Megatron（登録商標）ＭＴ３０００、Kinematica、スイス）によるバブル発生後、マイクロバブルを、１μｍポリカーボネート膜（Nuclepore（登録商標））を用いる３０分の濾過で洗って、バブル懸濁液中の過剰リン脂質を除去する。Ｐ－セレクチン（selectin）に反してラットの抗マウスモノクローナルＩｇＧ１に結合するＤＰＥＰＣおよびＤＳＰＥ－ＰＥＧ２０００含有のカチオン性ミセル（モル比７０：３０、５ｍｇ／ｍＬ）を、バブル懸濁液に加える（１ｍＬのマイクロバブル（約5×10^9バブル／ｍＬ）の場合、５０μＬのミセル）。

【０３００】

混合物を室温で３０分間穏やかに攪拌し、次いで遠心分離する。アセンブリー（上層液）を１０％マルトース溶液に再懸濁し、冷凍し、凍結乾燥する（２ｍＬ／バイアル）。凍結乾燥後、凍結乾燥物をC_4F_{10}で処理し、２ｍＬの蒸留水で再組成する。Coulter分析により、凍結乾燥後に、９０％以上のバブル－ミセルアセンブリーがなお無傷のままであることがわかった。これらのマイクロバブルは、D_N１．３μｍおよびD_V２．９μｍを示した。流動血球計算測定により、アセンブリー表面の生化学活性ＩｇＧ１抗体の存在を確認した。

【図１】

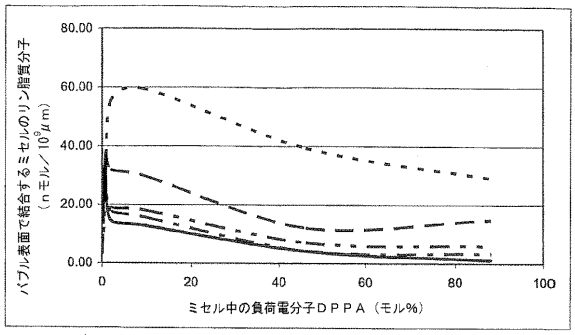


Figure 1

【図２】

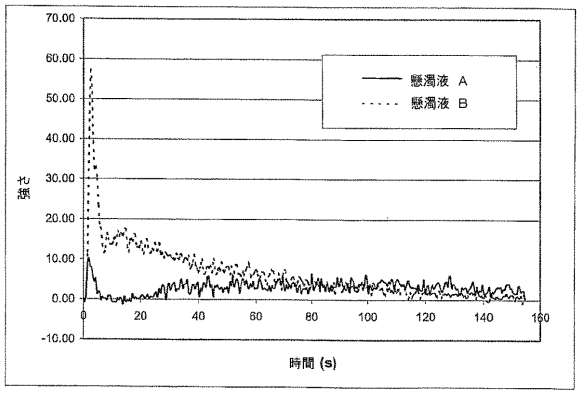
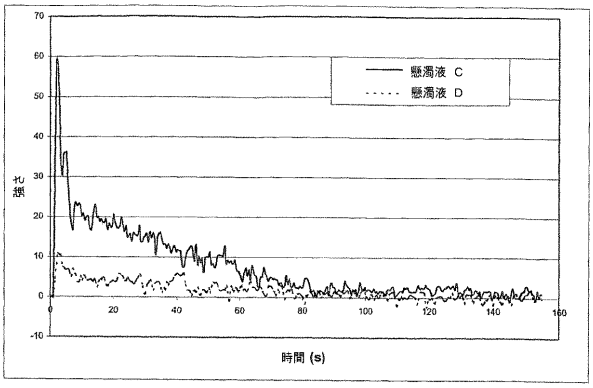


Figure 2

【図３】

Figure 3



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 47/32	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ 47/12	
Ａ６１Ｋ 47/14	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ 47/32	
Ａ６１Ｋ 47/18	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ 47/14	
Ａ６１Ｋ 47/20	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ 47/18	
Ａ６１Ｋ 47/26	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ 47/20	
Ａ６１Ｋ 47/24	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ 47/26	
		Ａ６１Ｋ 47/24	

(74)代理人 100162695
弁理士 釜平 双美
(72)発明者 ミシェル・シュナイダー
スイス、ツェーハー－１２５６トロワネ、ルート・ダンネシー３４番
(72)発明者 フィリップ・ビュサ
フランス、エフ－７４１６０フェジェール、アレ・デュ・サレヴ４６番
(72)発明者 フェン・ヤン
スイス、ツェーハー－１２１６グラン・ランシー、シュマン・デ・シャンプ・ゴットルー７番
(72)発明者 アンヌ・セナント
スイス、ツェーハー－１２２７カルージュ、リュ・デ・ムエット１５番

Ｆターム(参考) 4C076 AA16 AA17 AA19 DD01 DD41 DD44 DD49 DD63 DD67 EE02
EE41
4C085 HH07 HH09 JJ03 JJ20 KA07 KA36 KB42 KB45 KB52 KB60
KB67 KB74 KB75 KB78 KB82
4C096 AA11 AD19 FC14
4C601 DE06

【外国語明細書】
【０００１】

GAS-FILLED MICROVESICLE ASSEMBLY FOR CONTRAST IMAGING

The present invention relates to an assembly comprising as a first component a gas-filled microvesicle and as a second component a structural entity which is capable to associate to the outer surface of the microvesicle, thereby modifying the physico-chemical properties thereof. Optionally, said second component may comprise a targeting ligand, a bioactive agent, a diagnostic agent or any combination thereof. The invention further relates to formulations comprising said assembly, to the use of said formulations, to a method for preparing said assembly and formulations and to a diagnostic kit comprising said assembly. The assembly of the invention can be used as an active component in diagnostically and/or therapeutically active formulations, in particular for enhancing the imaging in the field of ultrasound contrast imaging, including targeted ultrasound imaging and/or ultrasound-mediated drug delivery and other imaging techniques such as molecular resonance imaging (MRI) or nuclear imaging.

Background of the invention

Rapid development of ultrasound contrast agents in the recent years has generated a number of different formulations, which are useful in ultrasound imaging of organs and tissue of human or animal body. These agents are designed to be used primarily as intravenous or intra-arterial injectables in conjunction with the use of medical echographic equipment which employs for example, B-mode image formation (based on the spatial distribution of backscatter tissue properties) or Doppler signal processing (based on Continuous Wave or pulsed Doppler processing of ultrasonic echoes to determine blood or liquid flow parameters).

A class of injectable formulations useful as ultrasound contrast agents includes suspensions of gas bubbles having a diameter of few microns dispersed in an aqueous medium.

Use of suspensions of gas bubbles in carrier liquid, as efficient ultrasound reflectors is well known in the art. The development of microbubble suspensions as echopharmaceuticals for enhancement of ultrasound imaging followed early observations that rapid intravenous injections of aqueous solutions can cause dissolved gases to come out of solution by forming bubbles. Due to their substantial difference in acoustic impedance relative to blood, these intravascular gas bubbles were found to be excellent reflectors of ultrasound. The injection of suspensions of gas bubbles in a carrier liquid into the blood stream of a living organism strongly reinforces ultrasonic echography imaging,

CONFIRMATION COPY

【０００２】

thus enhancing the visualisation of internal organs. Since imaging of organs and deep seated tissues can be crucial in establishing medical diagnosis, a lot of effort has been devoted to the development of stable suspensions of highly concentrated gas bubbles which at the same time would be simple to prepare and administer, would contain a minimum of inactive species and would be capable of long storage and simple administration.

The simple dispersion of free gas bubbles in the aqueous medium is however of limited practical interest, since these bubbles are in general not stable enough to be useful as ultrasound contrast agents.

Interest has accordingly been shown in methods of stabilising gas bubbles for echography and other ultrasonic studies, for example using emulsifiers, oils, thickeners or sugars, or by entrapping or encapsulating the gas or a precursor thereof in a variety of systems. These stabilized gas bubbles are generally referred to in the art as "microvesicles", and may be divided into two main categories.

A first category of stabilized bubbles or microvesicles is generally referred to in the art as "microbubbles" and includes aqueous suspensions in which the bubbles of gas are bounded at the gas/liquid interface by a very thin envelope (film) involving a stabilizing amphiphilic material disposed at the gas to liquid interface. Microbubbles suspensions are typically prepared by contacting powdered amphiphilic materials, e.g. freeze-dried preformed liposomes or freeze-dried or spray-dried phospholipid solutions, with air or other gas and then with an aqueous carrier, while agitating to generate a microbubble suspension which can then be administered, preferably shortly after its preparation.

Examples of aqueous suspension of gas microbubbles and preparation thereof are disclosed, for instance, in US 5,271,928, US 5,445,813, US 5,413,774, US 5,556,610, 5,597,549, US 5,827,504 and WO 04/069284, which are here incorporated by reference in their entirety.

A second category of microvesicles is generally referred to in the art as "microballoons" or "microcapsules" and includes suspensions in which the bubbles of gas are surrounded by a solid material envelope of a lipid or of natural or synthetic polymers. Examples of microballoons and of the preparation thereof are disclosed, for instance, in US 5,711,933 and US 6,333,021, herein incorporated by reference in their entirety.

Microvesicles bearing an overall net charges are also known (see for instance International patent application WO 97/29783, herein incorporated by

【０００３】

reference); the outer envelope of these microvesicles contains ionic compounds which are capable to confer the desired overall charge to the final microvesicle.

Further to these formulations of gas-filled microvesicles, interest has more recently been shown also towards modified formulations of gas-filled microvesicles, either for improving the diagnostic effect and/or for therapeutic purposes.

For instance, the microvesicles can be associated (e.g. by inclusion in its boundary envelope) with specific components (known as "targeting ligands") which are capable to link to a determined target within a patient's body, e.g. to a specific pathogenic site. These formulations are generally known in the art as "targeted microvesicles". Examples of targeted microvesicles, of targeting ligands and of the preparation thereof are disclosed for instance in International patent application WO 98/18051.

Another example of modified formulations are those where a therapeutic agent is associated with the microvesicle. When the formulation comprising the microvesicle reaches the pathogenic site, the drug can be advantageously released, e.g. by applying a controlled acoustic energy capable of disrupting the vesicle, thus locally releasing the therapeutic agent. This technique is generally known in the field as "ultrasound-mediated drug release". Examples of microvesicles' formulations comprising a therapeutic agent are disclosed for instance in International patent application WO 94/28873.

Further developments in the field have brought to the preparation of assemblies wherein the microvesicle is associated with a second component, bearing a desired therapeutic agent or targeting compound.

For instance, WO 99/39738, discloses an assembly comprising a gas-filled microvesicle and a liquid-filled liposome associated therewith, where the liposome comprises a therapeutically active substance therein. The liposome is associated to the microvesicle by simple admixture with microvesicles or through a link between a conjugated pair, each of the microvesicle and liposome being provided with a component bearing one of the two the respective complementary moieties of said pair (e.g. biotin and avidin or streptavidin).

WO 03/015831 discloses a formulation comprising gas-filled microvesicles ("microspheres" in the application) associated to liposomes, referred to as microsphere-liposome composites. The liposomes of the composite may include a drug and/or a targeting moiety. The microvesicles and liposomes forming the composite are made from a same starting material; the composite is obtained preparing an aqueous solution comprising a mixture of lipids, introducing said

【0004】

solution in a sealed vial comprising the desired gas and finally agitating the solution. The so obtained composite is thus a simple mixture of microvesicles and liposomes of the same chemical nature. In particular, no specific chemical or physical interaction between microvesicles and liposomes is disclosed in said document.

Furthermore, International patent application WO 99/53963 discloses a combined preparation which comprises a first composition comprising gas-filled microvesicles dispersed in an aqueous medium and stabilized by a material and a second composition which is an oil-in-water emulsion comprising a material which stabilize the emulsion. The surface materials stabilizing the microvesicles and the dispersed oil phase have affinity for each other. In one embodiment, said affinity is obtained by using surface materials with opposite charges, so that they interact and bind electrostatically to each other. Alternatively, the association of the respective surface materials may comprises compounds capable of interaction through chemical or biological binding. The oil of the emulsion is a substance which is capable of generating a gas or vapor pressure *in vivo* and is referred to as the "diffusable component". The association of droplets of said emulsified substance with the microvesicle is capable of determining a controllable growth of the dispersed gas phase in the microvesicle, through inward diffusion thereto of molecules of gas or vapour from said substance.

Summary of the invention

The Applicant has now found a novel assembly, for use inpharmaceutically active formulations, comprising a gas-filled microvesicle which is associated to a second component through a substantially electrostatic interaction, said second component optionally comprising a targeting ligand, a bioactive agent , a diagnostic agent or any combination thereof.

An aspect of the present invention relates to an assembly comprising a gas-filled microvesicle bearing a first overall net charge and a component associated to said microvesicle wherein said component bears a second overall net charge opposite in sign to said first net charge, said associated component comprising a biocompatible surface active agent and having a diameter of 100 nm or lower.

According to a preferred embodiment, said associated component comprises a targeting ligand, a bioactive agent, a diagnostic agent or any combination thereof.

【０００５】

Preferably, said surface active agent is an emulsifying agent, a dispersing agent or any combination thereof, particularly preferred being an amphiphilic material.

In the following of this specification, the second component of the assembly will be referred to as Microvesicle's Associated Component ("MAC").

According to an embodiment of the invention, said ultrasound contrast agent is in the form of a suspension of a plurality of said assemblies dispersed in a pharmaceutically acceptable aqueous carrier.

According to an alternative embodiment of the invention said ultrasound contrast agent is in the form of a freeze-dried composition.

Another aspect of the invention relates to a method for preparing an assembly as above described, which comprises admixing a preparation comprising gas-filled microvesicles or a precursor thereof with a preparation comprising said second component or a precursor thereof.

For the purposes of the present application the term "precursor of a gas-filled microvesicles" includes within its meaning any intermediate substance, composition, formulation or structure which is capable of forming a suspension of gas-filled microvesicles including, for instance, freeze-dried formulations capable of being reconstituted with an aqueous carrier to form said microvesicle suspension, or microemulsions capable to undergo a freeze-drying process to obtain a freeze-dried product which can then be reconstituted with an aqueous carrier to form said suspension.

Similarly, the term "precursor of the second component", includes any intermediate substance, composition, formulation or structure which is capable of forming said second component, including, for instance, freeze-dried compositions reconstitutable into an aqueous suspension comprising said MAC.

According to an embodiment of the present invention, the assembly of the invention can be obtained by:

1) preparing a first aqueous suspension comprising a gas-filled microvesicle;

2) preparing a second aqueous suspension comprising a component to be associated with said gas-filled microvesicle;

3) admixing said two suspensions, to obtain an aqueous suspension comprising said assembly.

Optionally a washing step can be included, after the preparation of either the first and/or the second suspension. An optional washing step of the final suspension can also be performed. The term "washing step" includes within its

【0006】

meaning any method or process directed to separate and/or at least partially remove the excess of non-associated materials, components, particles and the like from a suspension of a desired compound (e.g. microvesicle, MAC or assembly). Suitable separation methods include, for instance, decantation, centrifugation, ultrafiltration or microfiltration.

According to an alternative embodiment, the assembly of the invention can be obtained by:

1) preparing a first aqueous suspension comprising a gas-filled microvesicle;

2) freeze-drying said suspension, to obtain a first lyophilized product;

3) preparing a second suspension comprising a component to be associated with said gas-filled microvesicle;

4) freeze-drying said suspension, to obtain a second lyophilized product;

5) reconstituting said first and said second lyophilized product with a physiologically acceptable aqueous carrier in the presence of a gas, to obtain an aqueous suspension comprising the assembly.

Optionally a washing step can be included, after the preparation of either the first and/or the second suspension. An optional washing step of the final suspension can also be performed.

According to a preferred embodiment, the last step 5) of the preparation process comprises the steps of a) reconstituting the second lyophilized product with a physiologically acceptable aqueous carrier to obtain a suspension comprising the component to be associated to the gas-filled microvesicle and b) reconstituting the first lyophilized product with said suspension in the presence of a gas.

According to a further preferred embodiment, said assembly is obtained as a freeze-dried composition by:

1) preparing an aqueous emulsion comprising a water immiscible organic solvent, a phospholipid and a lyoprotecting agent;

2) preparing an aqueous suspension comprising a component to be associated with a gas-filled microvesicle;

3) admixing said aqueous suspension with said aqueous emulsion; and

4) freeze drying the mixture to remove the water and the organic solvent, to obtain a lyophilized product comprising said assembly.

The obtained lyophilized product can be reconstituted into an aqueous suspension comprising an assembly of the invention by agitating said lyophilized product in the presence of a gas and of an aqueous carrier.

【0007】

A further aspect of the invention relates to a method for ultrasound diagnostic imaging comprising administering a contrast-enhancing amount of an aqueous suspension of an assembly as above defined, optionally comprising a targeting ligand.

A further aspect of the invention relates to a therapeutic method comprising administering a therapeutically-effective amount of an aqueous suspension of an assembly as above defined comprising a bioactive agent.

A still further aspect of the invention relates to a pharmaceutical kit which contains the components of said assembly in any of the following forms: a) as two separate suspensions of microvesicles and MACs; b) as separate freeze-dried preparations of the two components, optionally together with an aqueous carrier for reconstitution; or c) as a freeze-dried preparation of the assembly, together with an aqueous carrier for reconstitution.

An advantage of an assembly according to the invention is that the electrostatic interaction between the microvesicle and the MAC can be obtained by using conventional components typically employed for forming the envelope of the microvesicles, without the need of introducing additional components or moieties in said envelope, which may otherwise impair the stability of the microvesicles.

The obtained assembly can advantageously modify or modulate the behavior of gas-filled microvesicles once administered in the body of a patient (such as, for instance, the rate of clearance from bloodstream circulation). For instance, assemblies comprising positively charged microvesicles and negatively charged MACs can be used to administer a preparation of positively charged microvesicle which will however show a behavior similar to negatively charged microvesicles once inside the body. Alternatively, assemblies comprising negatively charged microvesicles and positively charged MACs can be used to administer a preparation of negatively charged microvesicles which will however show a behavior similar to positively charged microvesicles once inside the body. In addition it is possible to associate a desired targeting compound or a pharmaceutically active agent to the microvesicle without impairing its stability (in particular the stability of the boundary layer surrounding the gas), as said targeting compound or pharmaceutically active agent are in fact associated to the second component of the assembly, which stability is substantially unaffected by the presence of said compound or agent

A further advantage of the present invention is the extreme flexibility in the preparation of different assemblies for different purposes. As a matter of fact,

【０００８】

a single basic preparation of charged microvesicles can be associated to different preparations of MACs of opposite charge, if necessary more than one at the same time, depending on the specific diagnostic/therapeutic needs. For instance, it is possible to associate to the microvesicles' preparation a first preparation of MAC bearing a targeting ligand (e.g. for binding the assembly to a specific pathogenic site) and a second preparation of MAC including a bioactive agent (which can be released at the specific pathogenic site once the assembly has been linked thereto).

In addition, the Applicant has observed that an assembly of the invention may show an increased pressure resistance with respect to the sole microvesicle.

Figures

Figure 1 is a graph showing the composition of different assemblies formed by microvesicles and MACs comprising the same materials but in different amounts. Figures 2 and 3 show the *in vivo* behaviour of charged microvesicles and of corresponding assemblies with MACs of opposite charge with respect to the microvesicle .

Detailed Description of the Invention

An assembly according to the invention typically comprises a first component (also identified as the "carrier" component) in the form of a gas-filled microvesicle bearing an overall net charge and a second component associated with said carrier component (MAC) having a diameter of less than 100 nm, which bears an overall net charge of opposite sign with respect to the first component and which comprises at least one surface active agent, in particular an emulsifying agent and/or a dispersing agent, more preferably an amphiphilic compound.

Preferably, the MAC contains a desired targeting ligand, a bioactive agent , a diagnostic agent or any combination thereof.

The microvesicle's associated component (MAC) is preferably in the form of a stable supermolecular structure formed by the association of a plurality of molecules of one or more surface active agent. Preferably, said supermolecular structure comprises at least one surface active agent bearing a net charge, more preferably a ionic surface active agent. Said stable supermolecular structure can for instance be determined by a hydrophobic interaction between the hydrophobic portions of said molecules. According to a particularly preferred embodiment, the MAC is in the form of a micelle. Alternatively, said MAC can be

formed by a single molecule of a polymeric ionic surfactant, optionally functionalized to include a suitable targeting, bioactive and/or diagnostic moiety

The assembly of the invention is useful for preparing a pharmaceutically active formulation for use in diagnostic and/or therapeutic methods.

The term "pharmaceutically active formulation" includes within its meaning any formulation, or precursor thereof, including diagnostically, bioactive and/or therapeutically active formulations, capable of exerting a pharmaceutical effect (e.g. a diagnostic, bioactive and/or therapeutic effect) when administered in an effective amount to a patient in need thereof. Similarly, the term "pharmaceutical active" when referred to a compound, an agent or kit includes within its meaning diagnostic, bioactive and/or therapeutic compounds, agents or kits.

The term "targeting ligand" includes within its meaning any compound, moiety or residue having, or being capable to promote, a targeting activity of the assembly of the invention towards any biological or pathological site within a living body. Targets to which targeting ligand may be associated include tissues such as, for instance, myocardial tissue (including myocardial cells and cardiomyocites), membranous tissues (including endothelium and epithelium), laminae, connective tissue (including interstitial tissue) or tumors; blood clots; and receptors such as, for instance, cell-surface receptors for peptide hormones, neurotransmitters, antigens, complement fragments, and immunoglobulins and cytoplasmic receptors for steroid hormones.

The term "bioactive agent" includes within its meaning any substance, composition or particle which may be used in any therapeutic application, such as in methods for the treatment of a disease in a patient, as well as any substance which is capable of exerting or responsible to exert a biological effect in vitro and/or in vivo. Examples of bioactive agents are drugs, pharmaceuticals, proteins, natural or synthetic peptides, including oligopeptides and polypeptides, vitamins, steroids and genetic material, including nucleosides, nucleotides and polynucleotides. A therapeutic method or treatment of a patient typically includes the use of a bioactive agent.

The term "diagnostic agent" includes within its meaning any compound, composition or particle which may be used in connection with diagnostic methods, including imaging of 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 magnetic resonance imaging, X-ray imaging, in particular computed tomography, optical

【００１０】

imaging, nuclear imaging or molecular imaging of a patient including, for example, magnetite nanoparticles.

"Biocompatible" or "physiologically acceptable" refers to any compound, material or formulation which can be administered, in a selected amount, to a patient without negatively affecting or substantially modifying its organism's healthy or normal functioning (e.g. without determining any status of unacceptable toxicity, causing any extreme or uncontrollable allergenic response or determining any abnormal pathological condition or disease status).

The term "surface active agent" refers to any compound which is capable of stabilizing mixtures of otherwise generally immiscible materials, such as mixtures of two immiscible liquids (e.g. water and oil), mixtures of liquids with gases (e.g. gas microbubbles in water) or mixtures of liquids with insoluble particles (e.g. metal nanoparticles in water). These compounds are also generally referred to in the art as "emulsifying agents" or "dispersing agents". Preferably said compound is an "amphiphilic compound", i.e. a compound having a molecule with a hydrophilic polar head (e.g. a polar or ionic group) and a hydrophobic organic tail (e.g. a hydrocarbon chain). Examples of surface active agent, in particular of emulsifying and/or dispersing agents, are: (C_2-C_{10}) organic acids, organic fatty acids comprising a (C_{12}-C_{24}), preferably a (C_{14}-C_{22}), aliphatic chain, the pharmaceutically acceptable (alkali) salts thereof and the respective esters with polyoxyethylene, such as palmitic acid, stearic acid, arachidonic acid, oleic acid, sodium dodecanoate, sodium oxalate or sodium tartrate or polyoxyethylene fatty acid stearate; polyionic (alkali) salts, such as sodium citrate, sodium polyacrylate, sodium phosphate; organic amines, amides, quaternary amine (halide) salts, preferably containing a (C_8-C_{22}) hydrocarbon chain, including polyoxyethylated derivative thereof, such as ethanolamine, triethanolamine, alkylamines, alkanolamides, trimethylalkylamine chloride, polyoxyethylated alkylamines, polyoxyethylated alkanolamides; aminoacids; phospholipids, such as fatty acids di-esters of phosphatidylcholine, ethylphosphatidylcholine, phosphatidylglycerol, phosphatidic acid, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine or of sphingomyelin; esters of mono- or oligo-saccharides with (C_{12}-C_{24}), preferably a (C_{14}-C_{22}), organic fatty acids, such as sorbitan laurate; polymeric surfactants, i.e. block copolymers including hydrophobic and hydrophilic portions, such as ethyleneoxide/propyleneoxide block copolymers; organic sulfonates such as alkali (e.g. sodium) (C_{12}-C_{24})alkyl, preferably (C_{14}-C_{22})alkyl, sulfonates; perfluoroorganic acids, such as perfluorooctanoic acid; and mixtures thereof.

【００１１】

Because of its nanometric dimensions, the MAC will also be referred to as the nanocomponent of the assembly, as opposed to microvesicles having micrometric dimensions. Microvesicles typically have dimensions of at least 0.5 μm, preferably of 0.8 μm and up to e.g. 20 μm, more preferably from about 1 to 8 μm; the respective mean diameter in number of microvesicles (D_N), measured e.g. by means of a Coulter Counter, is preferably of at least 0.8 μm, more preferably of at least 1 μm (up to about e.g. 8 μm) and much more preferably from about 1 μm to about 5 μm.

In general, depending on the respective method of preparation, microvesicles and MACs are obtained as a population of particles having a more or less narrowly distribution of dimensions. Thus, for comparing different populations of microvesicles or MACs, mean values of said distribution are generally used. As known by those skilled in the art, the dimensions of micro/nano particles and their respective size distribution can be characterized by a number of parameters, the most frequently used being the mean diameter in number D_N, the median diameter in number D_{N50}, the mean diameter in volume D_V and the median diameter in volume D_{V50}. While diameters in number provide an indication of the mean number dimension of the particles, the diameter in volume provides information on how the total volume of the particles is distributed among the whole population. As the presence of very few large volume particles in a population of otherwise small volume particles may cause the corresponding D_V value to be shifted towards high values, it is sometimes more convenient to use the D_{V50} value for evaluating the distribution of a particles' population. D_{V50} is a calculated value indicating that half of the total of particles' internal volume is present in particles having a diameter lower than D_{V50}; this allows to reduce the effects of accidentally formed large volume particles in the evaluation of the size distribution. Clearly, mono-sized particles show identical D_N, D_{N50}, D_V and D_{V50} values. On the other side, an increasing broadening of particles' distribution will result in a larger difference between these various values with a corresponding variation of the respective ratio thereof (e.g. increase of D_V/D_N ratio). For example, particles populations containing primarily small particles (e.g. particles with a diameter around 2 μm) with nevertheless a small percentage of large particles (for instance particles with a diameter above 8 μm) show higher D_V or D_{V50} values as compared to the D_N value, with correspondingly higher D_V/D_N or D_{V50}/D_N ratios.

The electrostatic interaction between the two components of the assembly is basically obtained by using a first molecular compound (comprised in the

【００１２】

microvesicle's envelope) bearing a first net charge and a second molecular compound (comprised in the structure of the MAC) bearing a second net charge, which is opposite in sign to the first one. The microvesicles having a first overall net charge and the MAC having a second overall net charge, opposite in sign to the first one, are then associated to each other through an electrostatic interaction to obtain an assembly according to the invention.

The gas-filled microvesicle forming the first component of an assembly according to the present invention can be any microvesicle known in the art bearing an overall net charge. Preferred examples of microvesicles are microbubbles and microballoons (or microcapsules).

Microbubbles

A first example of suitable gas-filled microvesicle will be referred to hereinafter as "gas-filled microbubble".

Gas-filled microbubbles useful for preparing an assembly according to the present invention are generally bubbles of gas dispersed in an aqueous suspension which are stabilized by a (very thin) envelope comprising an amphiphilic (film-forming) compound, disposed at the gas to liquid interface. Said stabilizing envelope, sometimes referred to as an "evanescent envelope" in the art, has in general a thickness of less than 5 nm, typically of about 2-3 nm, thus often amounting to a substantially monomolecular layer. At least a portion of the amphiphilic material comprised in the envelope is composed of charged molecules, so to confer the desired overall net charge to the microbubble's envelope.

The amphiphilic compound included in the microvesicles' envelope can be a synthetic or naturally-occurring biocompatible compound and may include, for example a film forming lipid, in particular a phospholipid. Examples of amphiphilic compounds include, for instance phospholipids; lysolipids; fatty acids, such as palmitic acid, stearic acid, arachidonic acid or oleic acid; lipids bearing polymers, such as chitin, hyaluronic acid, polyvinylpyrrolidone or polyethylene glycol (PEG), also referred as "pegylated lipids"; lipids bearing sulfonated mono- di-, oligo- or polysaccharides; cholesterol, cholesterol sulfate or cholesterol hemisuccinate; tocopherol hemisuccinate; lipids with ether or ester-linked fatty acids; polymerized lipids; diacetyl phosphate; dicetyl phosphate; stearylamine; ceramides; polyoxyethylene fatty acid esters (such as polyoxyethylene fatty acid stearates), polyoxyethylene fatty alcohols, polyoxyethylene fatty alcohol ethers, polyoxyethylated sorbitan fatty acid esters, glycerol polyethylene glycol ricinoleate, ethoxylated soybean sterols,

【００１３】

ethoxylated castor oil or ethylene oxide (EO) and propylene oxide (PO) block copolymers; sterol aliphatic acid esters including, cholesterol butyrate, cholesterol iso-butyrate, cholesterol palmitate, cholesterol stearate, lanosterol acetate, ergosterol palmitate, or phytosterol n-butyrate; sterol esters of sugar acids including cholesterol glucuronides, lanosterol glucoronides, 7-dehydrocholesterol glucoronide, ergosterol glucoronide, cholesterol gluconate, lanosterol gluconate, or ergosterol gluconate; esters of sugar acids and alcohols including lauryl glucoronide, stearoyl glucoronide, myristoyl glucoronide, lauryl gluconate, myristoyl gluconate, or stearoyl gluconate; esters of sugars with aliphatic acids including sucrose laurate, fructose laurate, sucrose palmitate, sucrose stearate, glucuronic acid, gluconic acid or polyuronic acid; saponins including sarsasapogenin, smilagenin, hederagenin, oleanolic acid, or digitoxigenin; glycerol or glycerol esters including glycerol tripalmitate, glycerol distearate, glycerol tristearate, glycerol dimyristate, glycerol trimyristate, glycerol dilaurate, glycerol trilaurate, glycerol dipalmitate,; long chain alcohols including n-decyl alcohol, lauryl alcohol, myristyl alcohol, cetyl alcohol, or n-octadecyl alcohol; 6-(5-cholesten-3β-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-deoxyl-1-thio- β -D-mannopyranoside; 12-(((7'-diethylaminocoumarin-3-yl)carbonyl)methylamino)octadecanoic acid; N-[12-(((7'-diethylaminocoumarin-3-yl)carbonyl)methylamino)octadecanoyl]-2-aminopalmitic acid; N-succinyl-dioleylphosphatidylethanolamine; 1,2-dioleyl-sn-glycerol; 1,2-dipalmitoyl-sn-3-succinylglycerol; 1,3-dipalmitoyl-2-succinylglycerol; 1-hexadecyl-2-palmitoylglycerophosphoethanolamine or palmitoylhomocysteine; alkylammonium salts comprising at least one (C_{10}-C_{20}), preferably (C_{14}-C_{18}), alkyl chain, such as, for instance, stearylammonium chloride, hexadecylammonium chloride, dimethyldioctadecylammonium bromide (DDAB), hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB); tertiary or quaternary ammonium salts comprising one or preferably two (C_{10}-C_{20}), preferably (C_{14}-C_{18}), acyl chain linked to the N-atom through a (C_3-C_6) alkylene bridge, such as, for instance, 1,2-distearoyl-3-trimethylammonium-propane (DSTAP), 1,2-dipalmitoyl-3-trimethylammonium-propane (DPTAP), 1,2-oleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP), 1,2-distearoyl-3-dimethylammonium-propane (DSDAP): and mixtures or combinations thereof.

Depending on the combination of components and on the manufacturing process of the microbubbles, the above listed exemplary compounds may be

【００１４】

employed as main compound for forming the microvesicle's envelope or as simple additives, thus being present only in minor amounts.

According to a preferred embodiment, at least one of the compounds forming the microvesicles' envelope is a phospholipid, optionally in admixture with any of the other above cited film-forming materials. According to the present description, the term phospholipid is intended to encompass any amphiphilic phospholipid compound, the molecules of which are capable of forming a stabilizing film of material (typically in the form of a mono-molecular layer) at the gas-water boundary interface in the final microbubbles suspension. Accordingly, these materials are also referred to in the art as "film–forming phospholipids".

Amphiphilic phospholipid compounds typically contain at least one phosphate group and at least one, preferably two, lipophilic long-chain hydrocarbon group.

Examples of suitable phospholipids include esters of glycerol with one or preferably two (equal or different) residues of fatty acids and with phosphoric acid, wherein the phosphoric acid residue is in turn bound to a hydrophilic group, such as choline (phosphatidylcholines - PC), serine (phosphatidylserines - PS), glycerol (phosphatidylglycerols - PG), ethanolamine (phosphatidylethanolamines - PE), inositol (phosphatidylinositol), and the like groups. Esters of phospholipids with only one residue of fatty acid are generally referred to in the art as the "lyso" forms of the phospholipid. Fatty acids residues present in the phospholipids are in general long chain aliphatic acids, typically containing from 12 to 24 carbon atoms, preferably from 14 to 22; the aliphatic chain may contain one or more unsaturations or is preferably completely saturated. Examples of suitable fatty acids included in the phospholipids are, for instance, lauric acid, myristic acid, palmitic acid, stearic acid, arachidic acid, behenic acid, oleic acid, linoleic acid, and linolenic acid. Preferably, saturated fatty acids such as myristic acid, palmitic acid, stearic acid and arachidic acid are employed.

Further examples of phospholipid are phosphatidic acids, i.e. the diesters of glycerol-phosphoric acid with fatty acids; sphingolipids such as sphingomyelins, i.e. those phosphatidylcholine analogs where the residue of glycerol diester with fatty acids is replaced by a ceramide chain; cardiolipins, i.e. the esters of 1,3-diphosphatidylglycerol with a fatty acid; glycolipids such as gangliosides GM1 (or GM2) or cerebrosides; glucolipids; sulfatides and glycosphingolipids.

【００１５】

As used herein, the term phospholipids include either naturally occurring, semisynthetic or synthetically prepared products that can be employed either singularly or as mixtures.

Examples of naturally occurring phospholipids are natural lecithins (phosphatidylcholine (PC) derivatives) such as, typically, soya bean or egg yolk lecithins.

Examples of semisynthetic phospholipids are the partially or fully hydrogenated derivatives of the naturally occurring lecithins. Preferred phospholipids are fatty acids di-esters of phosphatidylcholine, ethylphosphatidylcholine, phosphatidylglycerol, phosphatidic acid, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine or of sphingomyelin.

Examples of preferred phospholipids are, for instance, dilauroyl-phosphatidylcholine (DLPC), dimyristoyl-phosphatidylcholine (DMPC), dipalmitoyl-phosphatidylcholine (DPPC), diarachidoyl-phosphatidylcholine (DAPC), distearoyl-phosphatidylcholine (DSPC), dioleoyl-phosphatidylcholine (DOPC), 1,2 Distearoyl-sn-glycero-3-Ethylphosphocholine (Ethyl-DSPC), dipentadecanoyl-phosphatidylcholine (DPDPC), 1-myristoyl-2-palmitoyl-phosphatidylcholine (MPPC), 1-palmitoyl-2-myristoyl-phosphatidylcholine (PMPC), 1-palmitoyl-2-stearoyl-phosphatidylcholine (PSPC), 1-stearoyl-2-palmitoyl-phosphatidylcholine (SPPC),), 1-palmitoyl-2-oleylphosphatidylcholine (POPC), 1-oleyl-2-palmitoyl-phosphatidylcholine (OPPC), dilauroyl-phosphatidylglycerol (DLPG) and its alkali metal salts, diarachidoylphosphatidyl-glycerol (DAPG) and its alkali metal salts, dimyristoylphosphatidylglycerol (DMPG) and its alkali metal salts, dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG) and its alkali metal salts, distearoylphosphatidylglycerol (DSPG) and its alkali metal salts, dioleoyl-phosphatidylglycerol (DOPG) and its alkali metal salts, dimyristoyl phosphatidic acid (DMPA) and its alkali metal salts, dipalmitoyl phosphatidic acid (DPPA) and its alkali metal salts, distearoyl phosphatidic acid (DSPA), diarachidoylphosphatidic acid (DAPA) and its alkali metal salts, dimyristoyl-phosphatidylethanolamine (DMPE), dipalmitoylphosphatidylethanolamine (DPPE), distearoyl phosphatidyl-ethanolamine (DSPE), dioleylphosphatidyl-ethanolamine (DOPE), diarachidoylphosphatidylethanolamine (DAPE), dilinoleylphosphatidylethanolamine (DLPE), dimyristoyl phosphatidylserine (DMPS), diarachidoyl phosphatidylserine (DAPS), dipalmitoyl phosphatidylserine (DPPS), distearoylphosphatidylserine (DSPS), dioleoylphosphatidylserine (DOPS), dipalmitoyl sphingomyelin (DPSP), and distearoylsphingomyelin (DSSP).

【００１６】

The term phospholipid further includes modified phospholipid, e.g. phospholipids where the hydrophilic group is in turn bound to another hydrophilic group. Examples of modified phospholipids are phosphatidylethanolamines modified with polyethylenglycol (PEG), i.e. phosphatidylethanolamines where the hydrophilic ethanolamine moiety is linked to a PEG molecule of variable molecular weight e.g. from 300 to 5000 daltons), such as DPPE-PEG or DSPE-PEG, i.e. DPPE (or DSPE) having a PEG polymer attached thereto. For example, DPPE-PEG2000 refers to DPPE having attached thereto a PEG polymer having a mean average molecular weight of about 2000.

Particularly preferred phospholipids are DAPC, DSPC, DPPA, DSPA, DMPS, DPPS, DSPS and Ethyl-DSPC. Most preferred are DAPC or DSPC.

Mixtures of phospholipids can also be used, such as, for instance, mixtures of DPPC, DSPC and/or DAPC with DSPS, DPPS, DSPA, DPPA, DSPG, DPPG, Ethyl-DSPC and/or Ethyl-DPPC,

In some embodiments the phospholipid is the main component of the stabilizing envelope of microbubbles, amounting to at least 50% (w/w) of the total amount of components forming the envelope of the gas filled microbubbles. In some preferred embodiments, substantially the totality of the envelope (i.e. at least 90% and up to 100% by weight) can be formed of phospholipids.

The phospholipids can conveniently be used in admixture with any of the above listed amphiphilic compounds. Thus, for instance, lipids such as cholesterol, ergosterol, phytosterol, sitosterol, lanosterol, tocopherol, propyl gallate or ascorbyl palmitate, fatty acids such as myristic acid, palmitic acid, stearic acid, arachidic acid and derivatives thereof or butylated hydroxytoluene and/or other non-phospholipid compounds can optionally be added to one or more of the foregoing phospholipids in proportions ranging from zero to 50% by weight, preferably up to 25%. Particularly preferred is palmitic acid.

In order to confer the desired overall net charge to the microbubble, the envelope shall comprise at least one component bearing an overall net charge, in particular a charged amphiphilic material, preferably a lipid or a phospholipid.

Examples of phospholipids bearing an overall negative charge are derivatives, in particular fatty acid di-esters, of phosphatidylserine, such as DMPS, DPPS, DSPS; of phosphatidic acid, such as DMPA, DPPA, DSPA; of phosphatidylglycerol such as DMPG, DPPG and DSPG. Also modified phospholipids, in particular PEG-modified phosphatidylethanolamines, such as DMPE-PEG2000, DMPE-PEG3000, DMPE-PEG4000, DPPE-PEG5000, DPPE-

【００１７】

PEG2000, DPPE-PEG3000, DPPE-PEG4000, DPPE-PEG5000, DSPE-PEG2000, DSPE-PEG3000, DSPE-PEG4000, DSPE-PEG5000, DAPE-PEG2000, DAPE-PEG3000, DAPE-PEG4000 or DAPE-PEG5000 can be used as negatively charged molecules. Also the lyso- form of the above cited phospholipids, such as lysophosphatidylserine derivatives (e.g. lyso-DMPS, -DPPS or –DSPS), lysophosphatidic acid derivatives (e.g. lyso-DMPA, -DPPA or –DSPA) and lysophosphatidylglycerol derivatives (e.g. lyso-DMPG, -DPPG or –DSPG), can advantageously be used as negatively charged compound. Examples of negatively charged lipids are bile acid salts such as cholic acid salts, deoxycholic acid salts or glycocholic acid salts; and (C_{12}-C_{24}), preferably (C_{14}-C_{22}) fatty acid salts such as, for instance, palmitic acid salt, stearic acid salt, 1,2-dipalmitoyl-sn-3-succinylglycerol salt or 1,3-dipalmitoyl-2-succinylglycerol salt.

Preferably, the negatively charged compound is selected among DPPA, DPPS, DSPG, DSPE-PEG2000, DSPE-PEG5000 or mixtures thereof.

The negatively charged component is typically associated with a corresponding positive counter-ion, which can be mono- (e.g. an alkali metal or ammonium), di- (e.g. an earth-alkali metal) or tri-valent (e.g. aluminium). Preferably the counter-ion is selected among alkali metal cations, such as Li^+, Na^+, or K^+, more preferably Na^+.

Examples of phospholipids bearing an overall positive charge are derivatives of ethylphosphatidylcholine, in particular esters of ethylphosphatidylcholine with fatty acids, such as 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-Ethylphosphocholine (Ethyl-DSPC or DSEPC), 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-Ethylphosphocholine (Ethyl-DPPC or DPEPC). The negative counterion is preferably an halogen ion, in particular chlorine or bromine. Examples of positively charged lipids are alkylammonium salts with a halogen counter ion (e.g. chlorine or bromine) comprising at least one (C_{10}-C_{20}), preferably (C_{14}-C_{18}), alkyl chain, such as, for instance stearylammonium chloride, hexadecylammonium chloride, dimethyldioctadecylammonium bromide (DDAB), hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB). Further examples of positively charged lipids are tertiary or quaternary ammonium salts with a halogen counter ion (e.g. chlorine or bromine) comprising one or preferably two (C_{10}-C_{20}), preferably (C_{14}-C_{18}), acyl chain linked to the N-atom through a (C_3-C_6) alkylene bridge, such as, for instance, 1,2-distearoyl-3-trimethylammonium-propane (DSTAP), 1,2-dipalmitoyl-3-trimethylammonium-propane (DPTAP), 1,2-oleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP), 1,2-distearoyl-3-dimethylammonium-propane (DSDAP).

【００１８】

DSEPC, DPEPC and/or DSTAP are preferably employed as positively charged compounds in the microvesicle's envelope.

The positively charged component is typically associated with a corresponding negative counter-ion, which can be mono- (e.g. halogen), di- (e.g. sulphate) or tri-valent (e.g. phosphate). Preferably the counter-ion is selected among halogen ions, such as F^- (fluorine), Cl^- (chlorine) or Br^- (bromine).

In order to allow an effective electrostatic interaction with the MAC, the total amount of charged compounds in the microvesicle's envelope should be of at least 1% by mole with respect to the total amount of material forming said envelope, preferably of at least 5% and much more preferably of at least 10%. In some preferred combinations of microvesicles and MACs, it has been observed that an amount of at least 20%, preferably of at least 40%, of charged compounds in the microvesicles' envelope allows binding relatively higher amounts of MACs to said microvesicles. Although in some embodiments the totality of the envelope of the microvesicle can be formed by charged compounds, it has been observed that it may be advantageous to add at least minimum amounts of neutral compounds to the formulation forming said envelope. Preferably, the total amount of charged component can thus be equal to or lower than about 95% by mole with respect to the total amount of components forming the envelope of the microvesicle, more preferably equal to or lower than 90%, down to particularly preferred amounts equal to or lower than 80%.

Mixtures of neutral and charged phospholipids and/or charged lipids can be satisfactorily employed to form the microvesicles of an assembly of the present invention. Preferably, mixtures of two or more lipids or phospholipids, at least one with a neutral charge and at least one with an overall net charge, are employed. More preferably, mixtures of two or more lipids or phospholipids, at least one with neutral and at least one with positive charge are employed, to obtain microvesicles with an overall positive charge. The amount of charged lipid or phospholipid may vary from about 95% to about 1% by mole, with respect to the total amount of lipid and phospholipid, preferably from 80% to 20% by mole.

Preferred mixtures of neutral phospholipids and charged lipids or phospholipids are, for instance, DPPG/DSPC , DSTAP/DAPC, DPPS/DSPC, DPPS/DAPC, DSPA/DAPC, DSPA/DSPC and DSPG/DSPC.

【００１９】

Other excipients or additives may be present either in the dry formulation or may be added together with the aqueous carrier used for the reconstitution, without necessarily being involved (or only partially involved) in the formation of the stabilizing envelope of the microvesicle. These include pH regulators, osmolality adjusters, viscosity enhancers, emulsifiers, bulking agents, etc. and may be used in conventional amounts. For instance compounds like polyoxypropylene glycol and polyoxyethylene glycol as well as copolymers thereof can be used. Examples of viscosity enhancers or stabilizers are compounds selected from linear and cross-linked poly- and oligo-saccharides, sugars, hydrophilic polymers like polyethylene glycol.

As the preparation of gas-filled microvesicles may involve a freeze drying or spray drying step, it may be advantageous to include in the formulation one or more agents with cryoprotective and/or lyoprotective effect and/or one or more bulking agents, for example an amino-acid such as glycine; a carbohydrate, e.g. a sugar such as sucrose, mannitol, maltose, trehalose, glucose, lactose or a cyclodextrin, or a polysaccharide such as dextran; or a polyglycol such as polyethylene glycol.

The microbubbles usable in an assembly according to the invention can be produced according to any known method in the art. Typically, the manufacturing method involves the preparation of a dried powdered material comprising an amphiphilic material as above indicated, preferably by lyophilization (freeze drying) of an aqueous or organic suspension comprising said material.

For instance, as described in WO 91/15244 film-forming amphiphilic compounds can be first converted into a lamellar form by any liposome forming method. For instance, an aqueous solution comprising the film forming lipids and optionally other additives (e.g. viscosity enhancers, non-film forming surfactants, electrolytes etc.) can be submitted to high-speed mechanical homogenisation or to sonication under acoustical or ultrasonic frequencies, and then freeze dried to form a free flowable powder which is then stored in the presence of a gas. Optional washing steps, as disclosed for instance in US 5,597,549, can be performed before freeze drying.

According to an alternative embodiment (described for instance in the above cited US 5,597,549) a film forming compound and a hydrophilic stabiliser (e.g. polyethylene glycol, polyvinyl pyrrolidone, polyvinyl alcohol, glycolic acid, malic acid or maltol) can be dissolved in an organic solvent (e.g. tertiary

【００２０】

butanol, 2-methyl-2-butanol or $C_2Cl_4F_2$) and the solution can be freeze-dried to form a dry powder.

Alternatively, as disclosed in the above cited WO 04/069284, a phospholipid (selected among those cited above and including at least one of the above-identified charged phospholipids) and a lyoprotecting agent (such as those previously listed, in particular carbohydrates, sugar alcohols, polyglycols and mixtures thereof) can be dispersed in an emulsion of water with a water immiscible organic solvent (e.g. branched or linear alkanes, alkenes, cyclo-alkanes, aromatic hydrocarbons, alkyl ethers, ketones, halogenated hydrocarbons, perfluorinated hydrocarbons or mixtures thereof). The so obtained emulsion, which contains microdroplets of solvent surrounded and stabilized by the phospholipid material (and optionally by other amphiphilic film-forming compounds), is then lyophilized according to conventional techniques to obtain a lyophilized material, which is stored (e.g. in a vial in the presence of a suitable gas) and which can be reconstituted with an aqueous carrier to finally give a gas-filled microbubbles suspension.

A further process for preparing gas-filled microbubbles comprises generating a gas microbubble dispersion by submitting an aqueous medium comprising a phospholipid (and optionally other amphiphilic film-forming compounds and/or additives) to a controlled high agitation energy (e.g. by means of a rotor stator mixer) in the presence of a desired gas and subjecting the obtained dispersion to lyophilisation to yield a dried reconstitutable product. An example of this process is given, for instance, in WO 97/29782, here enclosed by reference.

Spray drying techniques (as disclosed for instance in US 5,605,673) can also be used to obtain the dried powder containing the microvesicles of the assembly of the invention.

The dried or lyophilised product obtained with any of the above techniques will generally be in the form of a powder or a cake, and can be stored (e.g. in a vial) in contact with the desired gas. The product is readily reconstitutable in a suitable aqueous liquid carrier, which is physiologically acceptable, sterile and injectable, to form the gas-filled microvesicles. Suitable liquid carriers are water, aqueous solutions such as saline (which may advantageously be balanced so that the final product for injection is not hypotonic), or solutions of one or more tonicity adjusting substances such as salts or sugars, sugar alcohols, glycols or other non-ionic polyol materials (eg. glucose, sucrose, sorbitol, mannitol, glycerol, polyethylene glycols, propylene glycols and the like).

【００２１】

Microballoons

Other gas-filled microvesicles suitable for an assembly according to the invention are referred to in the art as "microballoons". In general, these gas-filled microvesicles have a material envelope, the thickness of which is greater than the thickness of microbubbles' stabilizing film-envelope. Depending from the material forming said envelope (which can be e.g. polymeric, proteinaceous, of a water insoluble lipid or of any combination thereof), said thickness is in general of at least 50 nm, typically of at least 100 nm, up to few hundred nanometers (e.g. 300 nm).

Microballoons also generally differ from microbubbles in terms of acoustic response to ultrasonication. While the ultrasonic behavior of microbubbles is in fact closer to the behavior of "free" gas bubbles, microballoons (probably because of a higher stiffness of the envelope) are in general less responsive (in terms of intensity of the reflected echo signal) when irradiated at low levels of acoustic pressure energy (e.g. at a mechanical index of about 0.1).

Examples of microballoons which are useful for preparing an assembly according to the invention are preferably microballoons having a polymeric envelope, preferably comprising a biodegradable polymer, or an envelope based on biodegradable water-insoluble lipids, such as, for instance those described in US 5,711,933 and US 6,333,021, herein incorporated by reference in their entirety. Microballoons having a proteinaceous envelope, i.e. made of natural proteins (albumin, haemoglobin) such as those described in US-A-4,276,885 or EP-A-0 324 938, can also be employed

Polymers forming the envelope of the injectable microballoons are preferably hydrophilic, biodegradable physiologically compatible polymers. Examples of such polymers, which may be natural or synthetic, are substantially insoluble polysaccharides (e.g. chitosan or chitin), polycyanoacrylates, polylactides and polyglycolides and their copolymers, copolymers of lactides and lactones such as γ-caprolactone or δ-valerolactone, copolymers of ethyleneoxide and lactides, polyethyleneimines, polypeptides, and proteins such as gelatin, collagen, globulins or albumins. Other suitable polymers mentioned in the above cited US 5,711,933 include poly-(ortho)esters, polylactic and polyglycolic acid and their copolymers (e.g. DEXON®, Davis & Geck, Montreal, Canada); poly(DL-lactide-co-γ-caprolactone), poly(DL-lactide-co-δ-valerolactone), poly(DL-lactide-co-γ-butyrolactone), polyalkylcyanoacrylates; polyamides, polyhydroxybutyrate; polydioxanone; poly-ß-aminoketones; polyphosphazenes; and polyanhydrides. Polyamino-acids such as polyglutamic and polyaspartic acids can also be used,

【００２２】

as well as their derivatives, such as partial esters with lower alcohols or glycols. Copolymers with other amino acids such as methionine, leucine, valine, proline, glycine, alanine, etc. can also be used. Derivatives of polyglutamic and polyaspartic acid with controlled biodegradability (such as those described in WO87/03891, US 4,888,398 or EP 130935, all herein incorporated by reference) can also be used. These polymers (and copolymers with other amino-acids) have formulae of the following type: -(NH-CHA-CO)$_w$ -(NH-CHX-CO)$_y$- where X designates the side chain of an amino acid residue (e.g. methyl, isopropyl, isobutyl, or benzyl); A is a group of formula -(CH$_2$)$_n$ COOR^1 R^2 -OCOR, -(CH$_2$)$_n$ COO-CHR^{1}COOR, -(CH$_2$)$_n$ CO(NH-CHX-CO)$_m$ NH-CH(COOH)-(CH$_2$)$_p$ COOH, or the respective anhydrides thereof, wherein R^1 and R^2 represent H or lower alkyls, and R represents alkyl or aryl; or R and R^1 are connected together by a substituted or unsubstituted linking member to provide 5- or 6- membered rings; n, m and p are lower integers, not exceeding 5; and w and y are integers selected for having molecular weights not below 5000.

Non-biodegradable polymers (e.g. for making microballoons to be used in the digestive tract) can be selected from most water-insoluble, physiologically acceptable, bioresistant polymers including polyolefins (polystyrene), acrylic resins (polyacrylates, polyacrylonitrile), polyesters (polycarbonate), polyurethanes, polyurea and their copolymers. ABS (acryl-butadiene-styrene) is a preferred copolymer.

Biodegradable water-insoluble lipids useful for forming a microballoon for an assembly according to the invention comprise, for instance, solid water insoluble mono-, di- or tri-glycerides, fatty acids, fatty acid esters, sterols such as cholesterol, waxes and mixtures thereof. Mono-, di- and tri- glycerides include mainly the mono-, di- and tri-laurin compounds as well as the corresponding -myristin, -palmitin, -stearin, -arachidin and -behenin derivatives. Mono-, di- and tri- myristin, -palmitin -stearin and mixed triglycerides such as dipalmitoylmonooleyl glyceride are particularly useful; tripalmitin and tristearin are preferred. Fatty acids include solid (at room temperature, about 18-25°C) fatty acids (preferably saturated) having 12 carbon atoms or more, including, for instance, lauric, arachidic, behenic, palmitic, stearic, sebacic, myristic, cerotinic, melissic and erucic acids and the fatty acid esters thereof. Preferably, the fatty acids and their esters are used in admixture with other glycerides.

The sterols are preferably used in admixture with the other glycerides and or fatty acids and are selected from cholesterol, phytosterol, lanosterol,

【００２３】

ergosterol, etc. and esters of the sterols with the above mentioned fatty acids; however, cholesterol is preferred.

Preferred biodegradable lipids are triglycerides such as tripalmitin, tristearin or mixtures of the above mentioned triglycerides.

Optionally, up to 75% by weight of a biodegradable polymer, such as those listed previously, can be admixed together with the biodegradable water insoluble lipid forming the envelope of the microballoon.
Advantageously, ionic polymers (i.e. polymers bearing ionic moieties in their structure), preferably biodegradable ionic polymers, can also be used to form the stabilizing envelope of the microballoons, thus conferring the desired overall net charge thereto. Ionic polymers can be used as main components of the stabilizing envelope or they can be admixed in various amounts (e.g. from 2 to 80% by weight) with non ionic polymers. Suitable ionic polymers are, for instance, polymers comprising a quaternized nitrogen atom, such as quaternized amines or polymers comprising an carboxylic, sulfate, sulfonate or phosphonate moieities. Examples of suitable ionic polymers include, without limitation, Polyethylenimine, poly(diallyldimethylammonium chloride), poly{bis(2-chloroethyl)ether-alt-1,3-bis[3-(dimethylamino)propyl]urea} quaternized (Polyquaternium®-2), poly(4-vinylpyridinium tribromide), hydroxyethylcellulose ethoxylate quaternized (Polyquaternium®-4, poly(*p*-xylene tetrahydrothiophenium chloride), poly(L-lysine), chitin, diethyleneaminoethyl dextran, poly(acrylic acid), poly(methacrylic acid), poly(styrene-*alt*-maleic acid), poly(amino acids), alginic acid, poly(uridylic acid) , hyaluronic acid, i.e. poly(ß-glucuronic acid-*alt*-ß-N-acetylclucosamide), poly(galacturonic acid), poly(vinyl acetate-*co*-crotonic acid), DNA, poly(3,3',4,4'-benzophenonetetracarboxylic dianhydride-*co*-4,4'-oxydianiline), poly(isoprene-*graft*- maleic acid monomethyl ether), copolymer of glutammic acid with alkyl glutammate, heparin, poly(styrene sulfonate), sulfonated poly(isophthalic acid), poly(vinyl sulfonate, potassium salt), poly(vinyl sulfate, potassium salt), chondroitin sulfate A, dextran sulfate, fucoidan, polyphosphoric acid, sodium polyphosphate, sodium polyvinylphosphonate, poly-L-lisine hydrobromide, chitosan, chitosan sulfate, sodium alginate, alginic acid and ligninsulfonate.

Conventional additives can also be incorporated into the envelope of the microballoons, to modify physical properties thereof, such as dispersibility, elasticity and water permeability. In particular, effective amounts of amphiphilic materials can be added to the emulsion prepared for the manufacturing of said microballoons, in order to increase the stability thereof. Said materials can

【００２４】

advantageously be selected among those amphiphilic compounds, such as lipids, phospholipids and modified phospholipids, listed in the foregoing of this specification.

The added amphiphilic material can advantageously be a compound bearing an overall net charge. Preferred charged lipids, phospholipids and modified phospholipids are those previously listed.

In order to allow an effective electrostatic interaction with the MAC, the total amount of charged additive in the envelope of the microballoon should be of at least 1% by mole with respect to the total amount of material forming said envelope. The total amount of charged component is however preferably lower than about 70% by mole with respect to the total amount of the material forming the envelope of the microballoon. Preferably the amount of charged compound is from about 2% to 40%.

Other excipients or additives, in particular used for the preparation of microballoons, can be incorporated into the envelope such as redispersing agents or viscosity enhancers.

Biodegradable polymer containing microballoons can be prepared, for instance, according to the process disclosed in US 5,711,933, herein incorporated by reference, which comprises (a) emulsifying a hydrophobic organic phase into a water phase so as to obtain droplets of said hydrophobic phase as an oil-in-water emulsion in said water phase; (b) adding to said emulsion a solution of at least one polymer in a volatile solvent insoluble in the water phase, so that said polymer forms a layer around said droplets; (c) evaporating said volatile solvent so that the polymer deposits by interfacial precipitation around the droplets which then form beads with a core of said hydrophobic phase encapsulated by a membrane of said polymer, said beads being in suspension in said water phase; (d) removing said encapsulated hydrophobic phase by evaporation by subjecting said suspension to reduced pressure; and (e) replacing said evaporated hydrophobic phase with a suitable gas.

Biodegradable lipid containing microballoons can be prepared, for instance, according to the process disclosed in US 6,333,021 (herein incorporated by reference), by dispersing a mixture of one or more of the solid constituents of the microcapsule envelope dissolved in an organic solvent in a water carrier phase, so as to produce an oil-in-water emulsion. The emulsion water phase may contain an effective amount of amphiphilic materials which are used to stabilise the emulsion.

【００２５】

A certain amount of redispersing agent and/or of a cryoprotecting or lyoprotecting agent, such as those previously indicated, is then added to the emulsion of tiny droplets of the organic solution in the water phase, prior to freezing at a temperature below -30°C. Any convenient redispersing agent may be used; redispersing agents selected from sugars, albumin, gelatine, polyvinyl pyrolidone (PVP), polyvinyl alcohol (PVA), polyethylene glycol (PEG) and ethyleneoxide-propyleneoxide block copolymer (e.g. Pluronic®, or Synperonic®) or mixtures thereof are preferred. The redispersing agents which are added to prevent particle agglomeration are particularly useful when the microcapsules are in the form of non-coalescent, dry and instantly dispersible powders. The frozen emulsion is then subjected to reduced pressure to effect lyophilisation, i.e. the removal by sublimation of the organic solvent from the droplets and of the water of the carrier phase, and the freeze-dried product is then contacted with the desired gas.

Biocompatible Gas

Any biocompatible gas, gas precursor or mixture thereof may be employed to fill the above microvesicles, the gas being selected depending on the chosen modality.

The gas may comprise, for example, air; nitrogen; oxygen; carbon dioxide; hydrogen; nitrous oxide; a noble or inert gas such as helium, argon, xenon or krypton; a radioactive gas such as Xe^{133} or Kr^{81}; a hyperpolarized noble gas such as hyperpolarized helium, hyperpolarized xenon or hyperpolarized neon; a low molecular weight hydrocarbon (e.g. containing up to 7 carbon atoms), for example an alkane such as methane, ethane, propane, butane, isobutane, pentane or isopentane, a cycloalkane such as cyclobutane or cyclopentane, an alkene such as propene, butene or isobutene, or an alkyne such as acetylene; an ether; a ketone; an ester; halogenated gases, preferably fluorinated gases, such as or halogenated, fluorinated or prefluorinated low molecular weight hydrocarbons (e.g. containing up to 7 carbon atoms); or a mixture of any of the foregoing. Where a halogenated hydrocarbon is used, preferably at least some, more preferably all, of the halogen atoms in said compound are fluorine atoms.

Fluorinated gases are preferred, in particular perfluorinated gases, especially in the field of ultrasound imaging. Fluorinated gases include materials which contain at least one fluorine atom such as, for instance fluorinated hydrocarbons (organic compounds containing one or more carbon atoms and fluorine); sulfur hexafluoride; fluorinated, preferably perfluorinated, ketones such as perfluoroacetone; and fluorinated, preferably perfluorinated, ethers

【００２６】

such as perfluorodiethyl ether. Preferred compounds are perfluorinated gases, such as SF_6 or perfluorocarbons (perfluorinated hydrocarbons), i.e. hydrocarbons where all the hydrogen atoms are replaced by fluorine atoms, which are known to form particularly stable microbubble suspensions, as disclosed, for instance, in EP 0554 213, which is herein incorporated by reference.

The term perfluorocarbon includes saturated, unsaturated, and cyclic perfluorocarbons. Examples of biocompatible, physiologically acceptable perfluorocarbons are: perfluoroalkanes, such as perfluoromethane, perfluoroethane, perfluoropropanes, perfluorobutanes (e.g. perfluoro-n-butane, optionally in admixture with other isomers such as perfluoro-isobutane), perfluoropentanes, perfluorohexanes or perfluoroheptanes; perfluoroalkenes, such as perfluoropropene, perfluorobutenes (e.g. perfluorobut-2ene) or perfluorobutadiene; perfluoroalkynes (e.g. perfluorobut-2-yne); and perfluorocycloalkanes (e.g. perfluorocyclobutane, perfluoromethylcyclobutane, perfluorodimethylcyclobutanes, perfluorotrimethylcyclobutanes, perfluorocyclopentane, perfluoromethylcyclopentane, perfluorodimethylcyclopentanes, perfluorocyclohexane, perfluoromethylcyclohexane and perfluorocycloheptane). Preferred saturated perfluorocarbons have the formula C_nF_{n+2}, where n is from 1 to 12, preferably from 2 to 10, most preferably from 3 to 8 and even more preferably from 3 to 6. Suitable perfluorocarbons include, for example, CF_4, C_2F_6, C_3F_8, C_4F_8, C_4F_{10}, C_5F_{12}, C_6F_{12}, C_6F_{14}, C_7F_{14}, C_7F_{16}, C_8F_{18}, and C_9F_{20}.

Particularly preferred gases are SF_6 or perfluorocarbons selected from CF_4, C_2F_6, C_3F_8, C_4F_8, C_4F_{10} or mixtures thereof; SF_6, C_3F_8 or C_4F_{10} are particularly preferred.

It may also be advantageous to use a mixture of any of the above gases in any ratio. For instance, the mixture may comprise a conventional gas, such as nitrogen, air or carbon dioxide and a gas forming a stable microbubble suspension, such as sulfur hexafluoride or a perfluorocarbon as indicated above. Examples of suitable gas mixtures can be found, for instance, in WO 94/09829, which is herein incorporated by reference. The following combinations are particularly preferred: a mixture of gases (A) and (B) in which the gas (B) is a fluorinated gas, preferably selected from SF_6, CF_4, C_2F_6, C_3F_6, C_3F_8, C_4F_6, C_4F_8, C_4F_{10}, C_5F_{10}, C_5F_{12} or mixtures thereof, and (A) is selected from air, oxygen, nitrogen, carbon dioxide or mixtures thereof. The amount of gas (B) can

【００２７】

represent from about 0.5% to about 95% v/v of the total mixture, preferably from about 5% to 80%.

In certain circumstances it may be desirable to include a precursor to a gaseous substance (i.e. a material that is capable of being converted to a gas in vivo). Preferably the gaseous precursor and the gas derived therefrom are physiologically acceptable. The gaseous precursor may be pH-activated, photo-activated, temperature activated, etc. For example, certain perfluorocarbons may be used as temperature activated gaseous precursors. These perfluorocarbons, such as perfluoropentane or perfluorohexane, have a liquid/gas phase transition temperature above room temperature (or the temperature at which the agents are produced and/or stored) but below body temperature; thus, they undergo a liquid/gas phase transition and are converted to a gas within the human body.

For ultrasonic echography, the biocompatible gas or gas mixture is preferably selected from air, nitrogen, carbon dioxide, helium, krypton, xenon, argon, methane, halogenated hydrocarbons (including fluorinated gases such as perfluorocarbons and sulfur hexafluoride) or mixtures thereof. Advantageously, perfluorocarbons (in particular C_4F_{10} or C_3F_8) or SF_6 can be used, optionally in admixture with air or nitrogen.

For the use of the assembly in MRI the microvesicles will preferably contain a hyperpolarized noble gas such as hyperpolarized neon, hyperpolarized helium, hyperpolarized xenon, or mixtures thereof, optionally in admixture with air, CO_2, oxygen, nitrogen, helium, xenon, or any of the halogenated hydrocarbons as defined above.

For use in scintigraphy, the microvesicle of an assembly according to the invention will preferably contain radioactive gases such as Xe^{133} or Kr^{81} or mixtures thereof, optionally in admixture with air, CO_2, oxygen, nitrogen, helium, kripton or any of the halogenated hydrocarbons as defined above.

Microvesicle's associated component (MAC)

The second component of the assembly associated to the microvesicle (MAC) can be any structural entity comprising a biocompatible surface active agent bearing an overall net charge. In particular, said structural entity is preferably a supermolecular structure formed by the association of a plurality of, preferably amphiphilic, molecules. In some embodiments, said charged compound is admixed with other surface active agents and/or additives which are neutral. The MAC may further comprise a desired targeting ligand, bioactive

【００２８】

agent and/or diagnostic agent, depending on the specific application of the assembly. Biocompatible surface active materials suitable for preparing a MAC for an assembly according to the invention can be selected among those compound previously listed, such as (C_2-C_{10}) organic acids, organic fatty acids comprising a (C_{12}-C_{24}), preferably a (C_{14}-C_{22}), aliphatic chain, the pharmaceutically acceptable (alkali) salts thereof and the respective esters with polyoxyethylene, such as palmitic acid, stearic acid, arachidonic acid, oleic acid, sodium dodecanoate, sodium oxalate or sodium tartrate or polyoxyethylene fatty acid stearate; polyionic (alkali) salts, such as sodium citrate, sodium polyacrylate, sodium phosphate; organic amines, amides, quaternary amine (halide) salts, preferably containing a (C_8-C_{22}) hydrocarbon chain, including polyoxyethylated derivative thereof, such as ethanolamine, triethanolamine, alkylamines, alkanolamides, trimethylalkylamine chloride, polyoxyethylated alkylamines, polyoxyethylated alkanolamides; aminoacids; phospholipids, such as fatty acids di-esters of phosphatidylcholine, ethylphosphatidylcholine, phosphatidylglycerol, phosphatidic acid, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine or of sphingomyelin; esters of mono- or oligo-saccharides with (C_{12}-C_{24}), preferably a (C_{14}-C_{22}), organic fatty acids, such as sorbitan laurate; polymeric surfactants, i.e. block copolymers including hydrophobic and hydrophilic portions, such as ethyleneoxide/propyleneoxide block copolymers; organic sulfonates such as alkali (e.g. sodium) (C_{12}-C_{24}) alkyl, preferably (C_{14}-C_{22})alkyl, sulfonate; perfluoroorganic acids, such as perfluorooctanoic acid; and mixtures thereof. Preferred compounds are those neutral or charged amphiphilic materials previously listed among the suitable components of microbubbles, including lipids, phospholipids and modified phospholipids. A preferred MAC is in the form of a micelle.

The preparation of the MAC can be obtained according to conventional techniques, e.g. by dispersing the relevant components forming the MAC in an aqueous carrier and optionally washing the obtained suspension in order to remove the excess material.

Said second component is a nanocomponent, i.e. its relative dimension is of about 100 nm or lower, preferably of about 80 nm or lower and more preferably of about 50 nm or lower. The dimensions of the MAC, in particular its mean diameter in number, can be determined according to conventional techniques, such as, for instance, photon correlation spectroscopy. For instance, a ZetaSizer 3000 Has (Malvern Instruments Gmbh) can be used. Particularly when the MAC incorporates a desired targeting ligand, bioactive agent and/or diagnostic agent

【００２９】

within its structure, its dimensions are preferably of at least 0.1 nm, more preferably of at least 1 nm.

Preferably, the MAC has a mean dimension which is at least 10 times less or smaller than the mean dimension of the microvesicles to which the MAC is associated, more preferably at least 50 times less or smaller. Said mean dimension is in general not lower than 1000 times, preferably not lower than 500 times.

As it can be appreciated, because of the relatively smaller dimensions of the MAC with respect to the gas-filled microvesicle, it is possible to associate a relatively large amount of MACs to the microvesicles, thus increasing the effectiveness of the assembly in terms of a higher number of binding targeting moieties and/or of the amount of releasable therapeutic or diagnostic agent incorporated therein. In addition, said relatively small dimensions of the MAC allow to obtain assemblies with dimensions comparable to the dimensions of the microvesicles. It is in fact preferred that the mean diameter in number of an assembly according to the invention is not higher than about 30% the mean diameter of the microvesicle measured before the assembling, more preferably not higher than 20% and much more preferably not higher than 10%.

In some embodiments of the invention, the charged material may form the substantial totality of the MAC, i.e. 90% by mole or more. In some other embodiments, it is preferable that the charged molecules forming the structure of said MAC do not represent the totality of the compounds forming said structure, thus being admixed with a certain amount of neutral compounds. Said charged molecules may thus represent less than about 90% by mole of the total amount of the material forming said MAC. On the other hand, the Applicant has observed that the amount of charged molecules in the MAC should preferably be of at least 0.5% by mole with respect to the total amount of material forming said envelope, in order to allow an effective interaction with the charged microvesicle. Preferably, said amount is of at least 1%, more preferably of at least 2% by mole. In some preferred embodiments of the invention, the amount of charged molecules forming the structure of the MAC is preferably of about 50% or lower, more preferably of about 20% or lower.

Micelles

As previously mentioned, a preferred component to be associated with a microvesicle in an assembly of the invention is a micelle. The term "micelle" as used herein includes both micelles and mixed micelles, where the term mixed micelles refers to a micellar structure formed by a mixture of two or more

【００３０】

different compounds, at least one of which is an amphiphilic compound capable of forming a micellar structure. The term mixed micelles thus includes within its meaning also micelles formed by at least one compound, preferably an amphiphilic compound, which is in general unable to form a micellar structure when dispersed as such in an aqueous carrier, but which is capable of forming said structure when used in combination with suitable amounts of a micelle-forming amphiphilic compound. Examples of mixed micelles are micelles formed by unmodified phospholipids (which are in general not capable of forming micelles when dispersed as the sole material in an aqueous carrier) and by a micelle-forming compound (e.g. PEG-modified phospholipid or a fatty acid salt). As know in the art, micelles are formed by amphiphilic molecules dispersed in water when the concentration of these molecules exceeds a predetermined value known as CMC (critical micellar concentration). At concentrations below the CMC, the molecules are in general dispersed in the aqueous solution as single molecules. Above the CMC, the amphiphilic molecules tend to organize in supermolecular structures, in equilibrium with the free molecules in the solution, said structures being characterized by the fact that the hydrophobic (lipid) tail of the molecule is disposed towards the inner portion of the structure while the hydrophilic (polar or ionic) headgroup of the molecule is disposed on the outer portion of the structure. The CMC of an amphiphilic molecule can be determined experimentally using techniques standard in the art. For example, the CMC of a surfactant can be determined by plotting a property as a function of the concentration of the surfactant. The property usually varies linearly with the increase of surfactant concentration up to the CMC, and after this concentration, the curve (or the property) becomes non-linear. Suitable properties which can be used for the determination of the CMC include refractive index, light scattering, surface tension, electric conductivity, osmotic pressure and the like. For the purpose of the invention, preferred micelle-forming materials are those having a relatively low CMC, e.g. of about 10 mM or lower.

Micelles have typically a dimension comprised from about 0.1 nm to about 100 nm, preferably from about 1 nm to about 50 nm. The mean diameter in number (D_N) is of about 50 nm or less, preferably of about 20 nm or less and much more preferably of 10 nm or less, down to e.g. 1 nm, preferably about 2 nm.

A review of micelles, micellar systems and methods of preparation thereof can be found, for instance, in the reference book: "Surfactants and Polymers in

【００３１】

Drug Delivery", by M. Malmsten, Ch. 2, pp. 19-50, Marcel Dekker Inc. Ed., 2002).

Suitable materials useful for forming micelles to be associated with microvesicles in an assembly of the invention can be selected among the lipids and phospholipids material previously listed.

Examples of micelle-forming compounds are PEG-modified phospholipids, including in particular PEG-modified phosphatidylethanolamines such as DMPE-PEG2000, DMPE-PEG3000, DMPE-PEG4000, DPPE-PEG5000, DPPE-PEG2000, DPPE-PEG3000, DPPE-PEG4000, DPPE-PEG5000, DSPE-PEG2000, DSPE-PEG3000, DSPE-PEG4000, DSPE-PEG5000, DAPE-PEG2000, DAPE-PEG3000, DAPE-PEG4000 or DAPE-PEG5000; alkylammonium salts comprising at least one (C_{10}-C_{20}), preferably (C_{14}-C_{18}), alkyl chain, such as, for instance stearylammonium chloride, hexadecylammonium chloride, dimethyldioctadecylammonium bromide (DDAB), hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB); tertiary or quaternary ammonium salts comprising one or preferably two (C_{10}-C_{20}), preferably (C_{14}-C_{18}), acyl chain linked to the N-atom through a (C_3-C_6) alkylene bridge, such as 1,2-distearoyl-3-trimethylammonium-propane (DSTAP), 1,2-dipalmitoyl-3-trimethylammonium-propane (DPTAP), 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP), 1,2-distearoyl-3-dimethylammonium-propane (DSDAP); fatty acid salts, preferably alkali, in particular sodium salts, such as sodium palmitate, sodium stearate, sodium oleate, sodium linoleate, sodium dodecanoate, 1,2-dipalmitoyl-sn-3-succinylglycerate sodium salt or 1,3-dipalmitoyl-2-succinylglycerol sodium salt.

Polymers including hydrophobic and hydrophilic portions therein (also known as "polymeric surfactants") can also be used to prepare micellar suspensions. Examples of suitable polymeric surfactants include, without limitation, polyethyleneoxides (PEO), such as (C_8-C_{16})n-alkyl PEO monoether, (C_8-C_{10})n-alkyl phenyl PEO, tetramethylbutylphenyl PEO, PEO polysorbates, these PEO being sold under commercial names of Brij®, Lubrol®, Triton®, Nonidet® or Tween®; block copolymers such as ethyleneoxide/propyleneoxide block copolymers (e.g. Pluronic® or Synperonic®), having preferably a MW of from about 3000 to 20000 daltons, preferably of from 5000 to 15000 daltons; sugar derivatives such as (C_6-C_{10})alkyl-β-D-glucopyranoside, (C_8-C_{12})alkyl-β-D-maltoside; (C_8-C_{16})alkyldimethylammoniumpropane-sulfonate; and bile acids and derivatives therof, such as sodium cholate or sodium deoxycholate.

Additional lipids which can be used for preparing a micelle to be included in an assembly of the invention include, for instance, unmodified phospholipids,

【００３２】

such as the previously mentioned fatty acids di-esters of phosphatidylcholine, ethylphosphatidylcholine, phosphatidylglycerol, phosphatidic acid, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine or sphingomyelin. As these unmodified phospholipids are in general unable to form micellar structures when dispersed in an aqueous carrier (as these compounds tends rather to associate as liposomes when dispersed in an aqueous solution), said unmodified phospholipids are preferably used in admixture with any of the previously mentioned micelle-forming compounds. In particular, their amount shall preferably be less than about 80%, more preferably of about 70% or less of the total weight of the mixture of compounds forming the micellar structure. According to a preferred embodiment the micellar component is formed from a mixture comprising from about 30% to 70%, preferably form about 40% to 60% by weight of unmodified phospholipids. The remainder of the mixture can be any of the above listed micelle-forming surfactants.

The desired overall net charge is conferred to the micelle by any of the previously listed negatively or positively charged compounds, in particular lipids or phospholipids, including modified phospholipids.

Thus, examples of phospholipids suitable for conferring an overall negative charge to the micelle are phosphatidylserine derivatives, such as DMPS, DPPS, DSPS; phosphatidic acid derivatives, such as DMPA, DPPA, DSPA; phosphatidylglycerol derivatives such as DMPG, DPPG and DSPG. Also modified phospholipids, in particular PEG-modified phosphatidylethanolamines, can advantageously be employed, such as, for instance DMPE-PEG750, -PEG1000, -PEG2000, -PEG3000 or -PEG5000; DPPE-PEG750, -PEG1000, -PEG2000, PEG3000 or PEG5000; DSPE-PEG750, -PEG1000, -PEG2000, PEG3000 or PEG5000; DAPE-PEG750, -PEG1000, -PEG2000, PEG3000 or PEG5000; and the respective lyso- form of the above cited phospholipids, such as lysophosphatidylserine derivatives, lysophosphatidic acid derivatives (e.g. lyso-DMPA, -DPPA or –DSPA) and lysophosphatidylglycerol derivatives (e.g. lyso-DMPG, -DPPG or –DSPG). Examples of negatively charged lipids are bile acid salts such as cholic acid salts, deoxycholic acid salts or glycocholic acid salts; and fatty acid salts such as palmitic acid salt, stearic acid salt, 1,2-dipalmitoyl-sn-3-succinylglycerol salt or 1,3-dipalmitoyl-2-succinylglycerol salt.

Preferably, the negatively charged compound is selected among DPPA, DPPS, DSPG, DSPE-PEG2000, DSPE-PEG5000 or mixtures thereof.

The negatively charged component is typically associated with a corresponding positive counter-ion, which can be mono- (e.g. an alkali metal),

【００３３】

di- (e.g. an earth-alkali metal) or tri-valent (e.g. aluminium). Preferably the counter-ion is selected among alkali metal cations, such as Li^+, Na^+, or K^+, more preferably Na^+.

Examples of phospholipids suitable for conferring an overall positive charge to the micelle are esters of phosphatidylcholines, such as 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-Ethylphosphocholine (Ethyl-DSPC), 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-Ethylphosphocholine (Ethyl-DPPC). The negative counterion is preferably an halogen ion, in particular chlorine or bromine. Examples of positively charged lipids are alkylammonium salts, comprising at least one (C_{10}-C_{20}), preferably (C_{14}-C_{18}), alkyl chain, or tertiary or quaternary ammonium comprising one or preferably two (C_{10}-C_{20}), preferably (C_{14}-C_{18}), acyl chain linked to the N-atom through a (C_3-C_6) alkylene bridge, such as those previously listed.

Ethyl-DPPC, Ethyl-DSPC, DSTAP or mixtures thereof are preferably employed as positively charged compounds.

The positively charged component is typically associated with a corresponding positive counter-ion, which can be mono- (e.g. halogen), di- (e.g. sulphate) or tri-valent (e.g. phosphate). Preferably the counter-ion is selected among halogen ions, such as F^- (fluorine), Cl^- (chlorine) or Br^- (bromine).

Furthermore, ionic polymers such as those previously listed among the microballoons-forming materials can advantageously be used to form a micelle having an overall (negative or positive) net charge.

As above, the charged molecules can, in some embodiments, advantageously be admixed with a neutral amphiphilic compound, such as those previously listed (including neutral phospholipids), to form the desired micellar structure. Preferred neutral compounds to be admixed with the above listed charged compounds are polymeric surfactants, such as ethyleneoxide-propylenoxide block copolymers, e.g. Pluronic F68, Pluronic F108, Pluronic F-127 (Sigma Aldrich, Missouri, USA); Polyoxyethylated alkyl ether such as Brij® 78 (Sigma Aldrich, Missouri, USA); Polyoxyethylene fatty acid ester such as Myrj® 53 or Myrj® 59 (Sigma Aldrich, Missouri, USA); Polyoxyethylenesorbitan fatty acid ester such as Tween® 60 (Sigma Aldrich, Missouri, USA); Polyethylene glycol tert-octylphenyl ether such as Triton®X-100 (Sigma Aldrich, Missouri, USA); sodium dodecyl sulfate (SDS). According to one embodiment of the invention, the micelles are formed by mixtures of a charged amphiphilic compound with a neutral phospholipid and one or more of the above listed neutral compounds.

【００３４】

In some preferred embodiments of the invention, the amount of charged surfactant can form the substantial totality of the micelle (i.e. at least 80%, preferably at least 90% and more preferably about 100% of the total weight of micelle forming material). In some other preferred embodiments, in particular when at least one compound forming the micelle is an unmodified phospholipid, the total amount of charged surfactant forming the micelle is preferably from about 1% to 80%, more preferably from about 2% to about 50%.

Micelles can be prepared as known in the art by dispersing the above compounds in an aqueous liquid carrier and optionally agitating the mixture. Examples of suitable liquid carriers are water, saline solution (sodium chloride 0.9%), Phosphate buffered saline (10 mM, pH 7.4) , HEPES buffer (20 mM, pH 7.4), Glucose 5% w/w in water. For instance, the above compounds can be dispersed in a concentration of from about 1 to 100 mg/ml in an aqueous liquid and dissolved by means of agitation or sonication.

The micelles can then be stored as an aqueous dispersion (e.g. in the aqueous carrier used for their preparation) before being admixed with a suspension containing microvesicles or (as explained in detail in the following of the specification) to an aqueous-organic emulsion from which microvesicles are prepared. Alternatively, the micelle suspension can be freeze-dried according to conventional techniques, to eliminate the liquid and store the final dry product for the subsequent uses.

Liposomes

Another supermolecular structure which can be associated as a MAC to a microvesicle in an assembly according to the invention is a liposome, in particular small unilamellar vesicle (SUV) liposomes.

The term liposome includes substantially spherical aggregations of amphiphilic compounds, including lipid compounds, typically in the form of one or more concentric layers. Typically they are formed in aqueous suspensions and contain at least one bilayer of an amphiphilic compound. The hydrophilic heads of the amphiphilic compounds forming the external layer of the bilayer are directed towards the exterior of the spherical structure, while the hydrophilic heads of the amphiphilic compounds forming the internal layer of the bilayer are directed towards the interior of said spherical structure. The interior of the spherical structure of the liposomes is in general filled with the same liquid of the aqueous suspension, optionally containing additional compounds which are not present (or are present to a lesser extent) in the outer aqueous suspension.

【００３５】

Preferred materials for preparing liposomes are phospholipids, such as those previously listed, optionally in admixture with any of the other previously listed amphiphilic compounds.

SUV liposomes can be formed according to conventional techniques, e.g. by suitably processing MLV (Multilamellar large vesicles) suspensions, for instance by ultrasonication, extrusion or microfluidisation. MLV can be obtained, for instance, by dissolving phospholipids in an organic solvent, evaporating the organic solvent under vacuum to obtain a phospholipid film and finally hydrating the film at a temperature above phospholipid transition temperature. The obtained MLV may thus be exposed to ultrasonic radiations to obtain the desired SUV liposomes. Alternatively, the MLV can be extruded through a plurality of membranes (e.g. of polycarbonate) with decreasing pore size (e.g. 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, and 0.2 μm) and then through an extruder with smaller pore dimensions (for example LIPEX Biomembranes®, Canada,) to obtain the final SUV. As a further alternative preparation process of SUV, MLV can be homogenised under high pressure in a microfluidizer (e.g. from Microfluidics Corporation), to reduce the liposome size to approximately 100 nm or less, depending on the amount of recirculation of the liposomes in the microfluidizer. These and other preparation methods of SUV are disclosed, for instance, in the reference book "Liposomes, a practical approach", edited by Roger R.C. New, Oxford University Press, 1989.

Dimensions of SUV liposomes are typically from about 25 nm to about 100 nm, preferably from about 30 nm to about 100 nm. The mean diameter in number can vary from about 30 nm to about 60 nm, preferably from about 30 to about 50 nm.

A review of liposomes and their preparation methods is also given in the above cited reference book "Surfactants and Polymers in Drug Delivery", by M. Malmsten, Ch. 4, pp. 87-131, Marcel Dekker Inc. Ed., 2002).

Other structures which can be associated as a MAC to a microvesicle in an assembly of the invention include colloidal nanoparticles, e.g. colloidal gold nanoparticles. These nanoparticles are typically obtained by adding a suitable dispersing agent to an aqueous solution comprising substantially insoluble solid nanoparticles, thus forming an aqueous suspension of colloidal nanoparticles (i.e. solid nanoparticles coated with the dispersing agent). For instance, colloidal gold nanoparticles can be obtained by dispersing gold nanoparticles (with a diameter of from about 2 to 50 nm) with sodium citrate in an aqueous solution (see e.g. Grabar, "Preparation and Characterization of Au colloid monolayers", Analytical Chemistry, vol. 67, p. 735,1995). Colloidal gold nano-particles

【００３６】

associated with gas-filled microvesicles can be used to increase penetration depth in a selected tissue when said microvesicles are caused to disintegrate (e.g. induced by controlled high energy ultrasound irradiation). Thus, an assembly comprising colloidal gold nanoparticles can be for instance associated with a further MAC comprising a bioactive agent, in order to increase the penetration depth of said bioactive agent into the selected tissue, thus enhancing the effectiveness of the therapeutic treatment.

Further MACs can be formed by solid polymeric nanoparticles. These solid polymeric nanoparticles can be formed by any of the polymeric materials previously listed in connection with the preparation of gas-filled microballoons, thus including biodegradable physiologically acceptable polymers, such as substantially water insoluble polysaccharides (e.g. chitosan or chitin), polycyanoacrylates, polylactides and polyglycolides and their copolymers, copolymers of lactides and lactones such as γ-caprolactone or δ-valerolactone, copolymers of ethyleneoxide and lactides, polyethyleneimines, polypeptides, and proteins such as gelatin, collagen, globulins or albumins. Other suitable polymers are those mentioned in the above cited US 5,711,933 and previously listed. Non-biodegradable polymers in particular water-insoluble, physiologically acceptable and bioresistant polymers, can also be used, preferably in admixture with any of the above biodegradable polymer. Said polymer can be, for instance, a polyolefin, such as polystyrene, an acrylic resin such as polyacrylates of polyacrylonitrile, a polyester, such as polycarbonate, polyurethane, polyurea and their copolymers. ABS (acryl-butadiene-styrene) is a preferred copolymer.

Targeting Ligands and Bioactive/Diagnostic agents

The MAC, in particular in the form of micelles, of an assembly according to the invention, may advantageously include within its structure compounds having a targeting, diagnostic and/or biological activity.

The targeting ligand included in the MAC may be synthetic, semi-synthetic, or naturally-occurring. Materials or substances which may serve as targeting ligands include, for example, but are not limited to proteins, including antibodies, antibody fragments, receptor molecules, receptor binding molecules, glycoproteins and lectins; peptides, including oligopeptides and polypeptides; peptidomimetics; saccharides, including mono and polysaccharides; vitamins; steroids, steroid analogs, hormones, cofactors, bioactive agents and genetic material, including nucleosides, nucleotides and polynucleotides.

Examples of suitable targets and targeting ligands are disclosed, for instance, in US patent no. 6,139,819, which is herein incorporated by reference.

【００３７】

The targeting ligand can be a compound *per se* which is admixed with the other components of the MAC composition to be included in the final structure of the MAC or can be a compound which is bound to an amphiphilic molecule employed for the formation of the MAC.

In one preferred embodiment, the targeting ligand can be bound to an amphiphilic molecule of the MAC through a covalent bond. In such a case, the specific reactive moiety that needs to be present on the amphiphilic molecule will depend on the particular targeting ligand to be coupled thereto. As an example, if the targeting ligand can be linked to the amphiphilic molecule through an amino group, suitable reactive moieties for the amphiphilic molecule may be isothiocyanate groups (that will form a thiourea bond), reactive esters (to form an amide bond), aldehyde groups (for the formation of an imine bond to be reduced to an alkylamine bond), etc.; if the targeting ligand can be linked to the amphiphilic molecule through a thiol group, suitable complementary reactive moieties for the amphiphilic molecule include haloacetyl derivatives or maleimides (to form a thioether bond); and if the targeting ligand can be linked to the amphiphilic molecule through a carboxylic group, suitable reactive moieties for the amphiphilic molecule might be amines and hydrazides (to form amide or alkylamide bonds). In order to covalently bind a desired targeting ligand, at least part of the amphiphilic compound forming the MAC shall thus contain a suitable reactive moiety and the targeting ligand containing the complementary functionality will be linked thereto according to known techniques, e.g. by adding it to an aqueous dispersion comprising the amphiphilic components of the MAC. The amphiphilic compound can be combined with the desired targeting ligand before preparing the MAC, and the so obtained combination can be used in the preparation process of the MAC. Alternatively, the targeting ligand can be linked to the respective amphiphilic compound during the preparation process of the MAC or can be directly linked to the amphiphilic compound already in a micellar structure.

According to an alternative embodiment, the targeting ligand may also be suitably associated to the MAC via physical and/or electrostatic interaction. As an example, a functional moiety having a high affinity and selectivity for a complementary moiety can be introduced into the amphiphilic molecule, while the complementary moiety will be linked to the targeting ligand. For instance, an avidin (or streptavidin) moiety (having high affinity for biotin) can be covalently linked to a phospholipid while the complementary biotin moiety can be incorporated into a suitable targeting ligand, e.g. a peptide or an antibody.

【００３８】

The biotin-labelled targeting ligand will thus be associated to the avidin-labelled phospholipid of the MAC by means of the avidin-biotin coupling system. Alternatively, both the phospholipid and the targeting ligand can be provided with a biotin moiety and subsequently coupled to each other by means of avidin (which is a bifunctional component capable of bridging the two biotin moieties). Examples of biotin/avidin coupling of phospholipids and peptides are also disclosed in the above cited US 6,139,819. Alternatively, van der Waal's interactions, electrostatic interactions and other association processes may associate or bind the targeting ligand to the amphiphilic molecules.

According to an alternative embodiment, the targeting ligand can be a compound which is admixed with the components forming the MAC, to be eventually incorporated the MAC structure, such as, for instance, a lipopeptide as disclosed e.g. in International patent Applications WO 98/18501 or 99/55383, both herein incorporated by reference.

Alternatively, a MAC can first be manufactured, which comprises a compound having a suitable moiety capable of interacting with a corresponding complementary moiety of a targeting ligand; thereafter, the desired targeting ligand is added to the MAC suspension, to bind to the corresponding complementary moiety on the MAC. As an additional alternative, an assembly can be prepared, which comprises a MAC including a compound having a suitable moiety capable of interacting with a corresponding complementary moiety of a targeting ligand; thereafter, the desired targeting ligand is added to the assembly suspension, to bind to the corresponding moiety on the MAC.

Examples of suitable specific targets to which the assembly can be directed are, for instance, fibrin and the GPIIbIIIa binding receptor on activated platelets. Fibrin and platelets are in fact generally present in "thrombi", i.e. coagula which may form in the blood stream and cause a vascular obstruction. Suitable binding peptides are disclosed, for instance, in the above cited US 6,139,819. Further binding peptides specific for fibrin-targeting are disclosed, for instance, in International patent application WO 02/055544, which is herein incorporated by reference.

Other examples of important targets include receptors in vulnerable plaques and tumor specific receptors, such as kinase domain region (KDR) and VEGF (vascular endothelial growth factor)/KDR complex. Binding peptides suitable for KDR or VEGF/KDR complex are disclosed, for instance, in International Patent application WO 03/74005 and WO 03/084574, both herein incorporated by reference.

【００３９】

Bioactive agents include any compound or material capable of being used in the treatment (including diagnosis, prevention, alleviation, pain relief or cure) of any pathological status in a patient (including malady, affliction, disease lesion or injury). Examples of bioactive agents are those previously listed. Among these, drugs or pharmaceuticals are preferred, in particular those drugs consisting of an organic molecule (typically a synthetic molecule) which is substantially hydrophobic or which contain a relevant portion thereof which is substantially hydrophobic. These molecules may in fact be incorporated relatively easily in the structure of a MAC, in particular of a micelle, because of their affinity with the lipophilic (or hydrophobic) portion of the amphiphilic material forming the MAC. For instance, the organic molecule can be dispersed in the aqueous carrier containing the amphiphilic material forming the MAC, in particular the micelle, where it will be incorporated by affinity into the hydrophobic portion of the MAC. Alternatively, also hydrophilic drugs or organic molecules can be incorporated into the MAC, in particular when this latter is in the form of a liposome. In this case, said hydrophilic compound will preferably be contained in the internal aqueous portion of the liposome.

Examples of drugs which can be incorporated into or associated to the MAC's structure are, for instance those mentioned in the above cited WO 99/53963, thus including antineoplastic agents such as vincristine, vinblastine, vindesine, busulfan, chlorambucil, spiroplatin, cisplatin, carboplatin, methotrexate, adriamycin, mitomycin, bleomycin, cytosine arabinoside, arabinosyl adenine, mercaptopurine, mitotane, procarbazine, dactinomycin (antinomycin D), daunorubicin, doxorubicin hydrochloride, taxol, plicamycin, aminoglutethimide, estramustine, flutamide, leuprolide, megestrol acetate, tamoxifen, testolactone, trilostane, amsacrine (m-AMSA), asparaginase (Lasparaginase), etoposide, interferon a-2a and 2b, blood products such as hematoporphyrins or derivatives of the foregoing; biological response modifiers such as muramylpeptides; antifungal agents such as ketoconazole, nystatin, griseofulvin, flucytosine, miconazole or amphotericin B; hormones or hormone analogues such as growth hormone, melanocyte stimulating hormone, estradiol, beclomethasone dipropionate, betamethasone, cortisone acetate, dexamethasone, flunisolide, hydrocortisone, methylprednisolone, paramethasone acetate, prednisolone, prednisone, triamcinolone or fludrocortisone acetate; vitamins such as cyanocobalamin or retinoids; enzymes such as alkaline phosphatase or manganese superoxide dismutase; antiallergic agents such as amelexanox; anticoagulation agents such as warfarin,

【００４０】

phenprocoumon or heparin; antithrombotic agents; circulatory drugs such as propranolol; metabolic potentiators such as glutathione; antituberculars such as p-aminosalicylic acid, isoniazid, capreomycin sulfate, cyclosexine, ethambutol, ethionamide, pyrazinamide, rifampin or streptomycin sulphate; antivirals such as acyclovir, amantadine, azidothymidine, ribavirin or vidarabine; blood vessel dilating agents such as diltiazem, nifedipine, verapamil, erythritol tetranitrate, isosorbide dinitrate, nitroglycerin or pentaerythritol tetranitrate; antibiotics such as dapsone, chloramphenicol, neomycin, cefaclor, cefadroxil, cephalexin, cephradine, erythromycin, clindamycin, lincomycin, amoxicillin, ampicillin, bacampicillin, carbenicillin, dicloxacillin, cyclacillin, picloxacillin, hetacillin, methicillin, nafcillin, penicillin or tetracycline; antiinflammatories such as diflunisal, ibuprofen, indomethacin, meclefenamate, mefenamic acid, naproxen, phenylbutazone, piroxicam, tolmetin, aspirin or salicylates; antiprotozoans such as chloroquine, metronidazole, quinine or meglumine antimonate; antirheumatics such as penicillamine; narcotics such as paregoric; opiates such as codeine, morphine or opium; cardiac glycosides such as deslaneside, digitoxin, digoxin, digitalin or digitalis; neuromuscular blockers such as atracurium mesylate, gallamine triethiodide, hexafluorenium bromide, metocurine iodide, pancuronium bromide, succinylcholine chloride, tubocurarine chloride or vecuronium bromide; sedatives such as amobarbital, amobarbital sodium, apropbarbital, butabarbital sodium, chloral hydrate, ethchlorvynol, ethinamate, flurazepam hydrochloride, glutethimide, methotrimeprazine hydrochloride, methyprylon, midazolam hydrochloride, paraldehyde, pentobarbital, secobarbital sodium, talbutal, temazepam or triazolam; local anaesthetics such as bupivacaine, chloroprocaine, etidocaine, lidocaine, mepivacaine, procaine or tetracaine; general anaesthetics such as droperidol, etomidate, fentanyl citrate with droperidol, ketamine hydrochloride, methohexital sodium or thiopental and pharmaceutically acceptable salts (e.g. acid addition salts such as the hydrochloride or hydrobromide or base salts such as sodium, calcium or magnesium salts) or derivatives (e.g. acetates) thereof; and radiochemicals, e.g. comprising alpha-, beta-, or gamma-emitters such as, for instance ^{177}Lu, ^{90}Y or ^{131}I. Of particular importance are antithrombotic agents such as heparin and agents with heparin-like activity such as antithrombin III, dalteparin and enoxaparin; blood platelet aggregation inhibitors such as ticlopidine, aspirin, dipyridamole, iloprost and abciximab; and thrombolytic enzymes such as streptokinase and plasminogen activator. Other examples of bioactive agent include genetic material such as nucleic acids, RNA, and DNA of

【００４１】

natural or synthetic origin, including recombinant RNA and DNA. As mentioned in the above patent, DNA encoding certain proteins may be used in the treatment of many different types of diseases. For example, tumour necrosis factor or interleukin-2 may be provided to treat advanced cancers; thymidine kinase may be provided to treat ovarian cancer or brain tumors; interleukin-2 may be provided to treat neuroblastoma, malignant melanoma or kidney cancer; and interleukin-4 may be provided to treat cancer.

Diagnostic agents which may be incorporated into or associated to the MAC in an assembly of the invention are any compound, composition or particle which may allow imaging enhancement in connection with diagnostic techniques, including, magnetic resonance imaging, X-ray, in particular computed tomography, optical imaging, nuclear imaging or molecular imaging. Examples of suitable diagnostic agents are, for instance, magnetite nanoparticles, iodinated compounds, such as Iomeprol®, or paramagnetic ion complexes, such as hydrophobic gadolinium complexes. For instance, magnetite nanoparticles can be admixed with a negatively charged amphiphilic material(and optionally a neutral one), such as those previously mentioned, in order to stabilize said particles and keep them dispersed in an aqueous solution. US 5,545,395, herein incorporated by reference, gives some examples of preparation of said stabilized magnetite particles, e.g. by using a mixture of DPPA and Pluronic® for stabilizing said particles. Alternatively, gadolinium complexes can be admixed with suitable micelle-forming compounds, for instance as disclosed in European Patent EP 804 251 (herein incorporated by reference), to form a gadolinium containing MAC.

The assembly

In order to evaluate the relative compositions of the assemblies of the invention, the Applicant has found it useful to refer to the amounts of charged compounds in the microvesicles and in the MAC (expressed as "equivalents of charge") and to the ζ-potential of the suspensions of microvesicles and assemblies.

The term "equivalent of charge" (EC), indicates the number of charges per mole of said compound. Thus, one mole of a mono-ionic compound contains one EC, one mole of a di-ionic compound contains two EC and so on.

The ζ-potential (zeta-potential), also called electrokinetic potential, is the electric potential at the surface of a colloidal particle relative to the potential in the bulk medium at a long distance. It can be measured according to conventional micro-electrophoresis analytical methods, e.g. via the

determination of the velocity of the particles in a driving electric field by Laser-Doppler-Anemometry. For example, the ZetaSizer 3000 Has (Malvern Instrument GmbH) can be advantageously used. In the practice, the ζ-potential of the initial suspension of microvesicles is first determined, which can have a positive or negative value, depending whether the microvesicles contain positively or negatively charged compounds, respectively. Then, the ζ-potential is measured on the final suspension containing the assembly (i.e. after the necessary washing steps for removing possibly unbound MACs). In general, the addition of MACs of opposite sign with respect to the microvesicles determines a more or less pronounced decrease in absolute value of the ζ-potential of the suspension. In particular, suspensions comprising positively charged microvesicles will show a decrease of the ζ-potential upon addition of a suspension of negatively charged MACs, while suspensions comprising negatively charged microvesicles will show a relative increase of the ζ-potential (i.e. a decrease in absolute value) upon addition of a suspension of positively charged MACs. As observed by the Applicant, preferred assemblies are those suspensions showing a substantial decrease in absolute value with respect to the ζ-potential of the initial microvesicles suspension, i.e. a decrease of at least 50%, preferably of at least 75% and more preferably of at least 90% of said initial value. Particularly preferred assemblies' suspensions are those showing a substantially neutral ζ-potential (i.e. 0 ± 10 mV, corresponding to an absolute decrease of about 100% with respect to the initial potential of the microvesicles suspension) or a ζ-potential opposite in sign with respect to the ζ-potential of the initial microvesicles' suspension. As observed by the Applicant, when the ζ-potential of the assembly suspension remains equal in sign with an absolute decrease of less than 50% with respect to the ζ-potential of the initial microvesicles suspensions, this may be an indication that an insufficient number of MACs are associated to the microvesicles.

According to a preferred embodiment, the amount of charged MACs in the assembly is such as to confer a substantially neutral ζ-potential to said assembly or a ζ-potential which is opposite in sign with respect to the ζ-potential of the microvesicle. As observed by the Applicant, to obtain said neutral or opposite in sign ζ-potential of the assembly it is however not necessary that the assembly contains an excess of equivalents of charge from the MAC. As a matter of fact, it has been observed that assemblies composed of positive microvesicles and negative MACs and having a ratio between EC in the MAC and equivalents of opposite charge in the microvesicle of about 1:5 (i.e. an excess of about 5 times

【００４３】

of positive charges on the microvesicles) may nevertheless show a substantially neutral or negative ζ-potential. Although not wishing to be bound to any particular theory, it may be supposed that the (negative) charges comprised in the MACs are disposed on the outer surface of the assembly; if the number of MACs associated to the microvesicle is sufficiently high, the excess of (positive) opposite charges on the microvesicle may result, at least partially, screened by said MACs. Thus, as the ζ-potential measured on a particle is strongly influenced by the charges present on the outer boundary of said particle, even an assembly having an excess of (positive) equivalents of charge deriving from a microvesicle may show a negative ζ-potential, if the amount of (negatively) charged MACs is sufficient to partially screen the (positive) charges of the microvesicle. All the above is of course also applicable to assemblies formed by negatively charged microvesicles and positively charged MACs.

In general, the ratio between the EC on the microvesicles and the EC of charge on the MAC in the final suspension of the assembly can vary from about 10:1 to about 1:10. According to a preferred embodiment, the microvesicle/MAC EC ratio in the formed assembly is preferably of about 3:1 or less, more preferably of about 2:1 or less and much more preferably of about 3:2 or less. Depending from the amount of charged compounds forming the microvesicles and the MACs, said ratio can of course be lower, for instance of about 1:1 and down to e.g. about 1:4 or less.

In view of the relatively small dimensions of the MAC, the dimensions (mean diameter in number) of the assembly are typically of about 10 μm or lower and in general of about 1 μm or more. Preferred dimension of an assembly according to the invention are from about 1 μm to about 8 μm, more preferably from about 2 μm to about 5 μm.

According to a further embodiment of the invention, multi-layer assemblies can be formed by associating a gas-filled microvesicle to a plurality of layers of components, having an alternate charge. Thus, for instance, it is possible to associate to a negatively charged microvesicle a first layer of components (e.g. micelles) having a positive charge; then a second layer of components (e.g. again micelles or liposomes) having a negative charge can be associated to this assembly, and so on. Whilst the association of the first layer of components to the microvesicles will cause a reduction in absolute value of the ζ-potential (with respect to the one measured on a suspension of the sole microvesicles), the further association of a second layer of components (having an opposite

【００４４】

charge with respect to the first component) will cause the ζ-potential to change again towards values closer to those of the suspension of sole microvesicles.

According to a first method of preparation, the assembly can be obtained by admixing an aqueous suspension comprising the microvesicles (obtained according to any of the above cited manufacturing methods) with an aqueous suspension comprising the second component of the assembly (obtained according to any of the above cited manufacturing methods).

Optionally, the so obtained mixture can be subjected to one or more washing steps, in order to remove the excess of non-associated components. The washing can be performed with any conventional washing technique, by using suitable washing solutions, such as distilled water, phosphate buffered saline, Tris/glycerol buffer, saline or 5% glucose solution. The phase of the washed mixture comprising the assembly of the invention (in general the supernatant phase) is thus separated and collected; optionally, the recovered assembly-containing suspension is finally diluted before use, e.g. with any of the above cited physiologically acceptable carrier.

Upon formation, the suspension comprising the assembly of the invention can be stored for a subsequent administration or can be directly administered. If desired, the liquid carrier of the suspension can be eliminated (e.g. by freeze-drying) to obtain a dry powder of the assembly which can be stored (preferably in the presence of a gas suitable for forming the gas-filled microvesicles upon reconstitution) for relatively long periods of time before reconstitution.

Alternatively, the two components of the assembly can be stored as separate compositions in dried form (e.g. freeze dried) and reconstituted as a suspension before administration. For the storage, the dried components are preferably kept in an atmosphere of the gas which will form the microvesicles upon reconstitution with water. The reconstitution with an aqueous liquid carrier may take place separately on the two dried compositions comprising the respective components of the assembly, thus obtaining two separate suspensions which are subsequently admixed to obtain the desired assembly suspension. Alternatively, the two dried compositions may be admixed together and then reconstituted as a single suspension with an aqueous liquid carrier. In this latter case, the mixed components of the assembly are stored in the presence of the gas which will form the microvesicles upon reconstitution with the aqueous liquid carrier. According to a preferred embodiment, the dried MAC composition is first reconstituted with a physiologically acceptable aqueous

【００４５】

carrier and the obtained suspension is then used for reconstituting the dried microvesicle composition, to finally obtain a suspension of the assembly.

Any of the above preparation methods can also be used for preparing a multi-layer assembly as described above, by first admixing the charged gas filled microvesicles with a first component having an opposite charge and then by admixing the formed assembly with a second component having the same charge as the microvesicles.

For the preparation of the assembly from two separate preparations of microvesicles and MACs, it may be advantageous to add an excess amount of MACs with respect to the relative amount of MACs which is desired in the final assembly, in particular because a certain amount of said MACs can be removed during the optional washing steps of the assemblies' suspension. In general, it is preferred that the amount of EC in the composition employed for the preparation of the MAC is at least substantially equal to the EC in the composition employed for the preparation of the microvesicles (i.e. EC ratio of about 1:1). Preferably said EC ratio is of about 2:1 or higher, more preferably of at least about 3:1 or higher, up to e.g. 30:1.

According to a preferred embodiment, an aqueous suspension of a MAC (in particular of micelles as above defined) is added to an aqueous/organic emulsion comprising a phospholipid and a lyoprotecting agent, prepared according to the method disclosed in the above cited WO 04/069284. In this case, the charged MACs will associate with the opposite charged layer of amphiphilic material surrounding the microdroplets of the emulsion. The MAC is generally added in an amount such that ratio between the equivalents of charge in the MAC and the EC in the microvesicles of the suspension is of at least about 1:2 or higher, preferably 2:3 or higher and much more preferably of at least 1:1 or higher, up to e.g. 10:1. Similarly, an aqueous suspension of MAC can be added to a gas microbubble dispersion which has been obtained by submitting an aqueous medium comprising a phospholipid (and optionally other amphiphilic film-forming compounds and/or additives) to a controlled high agitation energy in the presence of a desired gas, as previously mentioned.

Freeze drying of the mixture provides the desired assembly as a lyophilized powder, which can be stored in contact with the desired gas and subsequently reconstituted as a physiological suspension by addition of an aqueous carrier.

The gas in contact with the stored freeze-dried products (assembly, microvesicles and/or MACs) can be present in the storage container at a substantial atmospheric pressure (i.e. about 1020 mbar +/- 5%) or at a

【００４６】

pressure lower than the atmospheric one (e.g. 900 mbar or lower) as disclosed in European patent application EP 1228770.

Injectable compositions after reconstitution of the lyophilised contrast agent should be, as far as possible, isotonic with blood. Hence, before injection, small amounts of isotonic agents may also be added to the suspensions comprising the assembly of the invention. The isotonic agents are physiological solutions commonly used in medicine such as, for example, aqueous saline solution (0.9% NaCl), 2.6% glycerol solution or 5% dextrose solution. The reconstitution of the aqueous suspensions is generally obtained by simple dissolution of the gas-stored dried film forming surfactant and gentle agitation.

The volume and concentrations of the reconstitution liquid may desirably be balanced to make the resulting ready-to-use formulations substantially isotonic. Hence the volume and concentration of reconstitution fluid chosen will be dependent on the type and amount of stabilizer (and other bulking agents) present in the freeze-dried product.

As it will be appreciated by those skilled in the art, the assembly according to the invention allows an extreme flexibility in the preparation of different assemblies for different purposes. As a matter of fact, the structure of the basic carrier component employed for the ultrasound diagnostic/therapeutic methods (i.e. the microvesicle) does not need to be subjected to any particular modifications, thus avoiding possible drawbacks in terms of stability of said component. Such component only needs to have an overall net charge on its envelope, which result can be easily obtained by using conventional materials normally used for forming said envelope. As a matter of fact, the electrostatic interaction between the microvesicle and the MAC allows an effective association between the two components, without the need of modifying the structure of the microvesicle. On the other side, the second component of the assembly, the stability of which is much less sensitive to possible modifications of its composition, can be easily adapted to the specific purpose requested to the assembly, by associating the desired targeting ligand and/or bioactive compound to it. Furthermore, due to the relatively small dimensions of the MAC with respect to the microvesicle, it is possible to associate a relatively large number of MACs to each microvesicle, thus increasing the efficiency of the system.

In addition, the microvesicles of the assembly can be easily associated with more than one type of different nano-components, thus resulting in a "multipurpose" assembly. In particular, one single preparation of charged

【００４７】

microvesicles (e.g. positively charged) can be used as a carrier to be associated with any desired type of MAC bearing an opposite charge (e.g. negative). Alternatively, a multipurpose assembly can also be obtained by preparing a multilayer assembly as previously described, where the different components of opposite charge are disposed as alternate layers around the microvesicle. The different MAC's associated to the microvesicle can differ in their chemical composition or supermolecular structure (e.g. micelles vs. liposomes), as well as in the targeting ligand, diagnostic agent and/or bioactive agent contained therein; advantageously, a multipurpose assembly will contain a combination of any of these. For instance, the microvesicle component can be combined with a first nano-component (e.g. in micellar form), comprising in its structure at least one targeting ligand (capable to link to a specific receptor associated to a pathologic status or disease), and with a second nano-component (e.g. either in micellar form or as a liposome), comprising either a second targeting ligand or a bioactive compound (e.g. a therapeutic compound for treating said pathologic status or disease). When an assembly comprising a combination of a "targeting ligand bearing component" and of a "bioactive compound bearing component" are employed, particularly when a "multilayer" assembly is prepared, the component bearing the targeting ligand is preferably separately associated as last component to the gas-filled microvesicle, in order to allow an effective targeting activity of the assembly. An example of a multipurpose assembly is, for instance, an assembly comprising a gas filled microvesicle, a first component in micellar form, which comprises a targeting ligand binding to a tumor specific receptor, and a second component comprising a radiochemical (bound to a micelle-forming compound or incorporated into a liposome) for the therapeutic treatment of the tumor.

An assembly of the invention can thus be used for a variety of diagnostic and/or therapeutic methods.

For instance, an assembly comprising a MAC with a suitable targeting ligand can be used to target a specific organ or tissue, which can then be selectively imaged according to conventional ultrasound imaging techniques, because of the enhanced imaging determined by the gas-filled microvesicles bound to said organ or tissue. If a diagnostic agent (e.g. for MRI) is further included in the assembly, use of combined diagnostic techniques is possible. Furthermore, if a bioactive agent is included in the assembly (e.g. included in a liposome), it is possible to provoke an ultrasound-mediated release of said bioactive agent at a selected target (e.g. where a targeting ligand binds) by applying a controlled

【００４８】

acoustic power capable of destroying the gas-filled microvesicles, as disclosed for instance in WO 99/39738, herein incorporated by reference.

Of course, an assembly of the invention may also contain, together with components bearing a targeting ligand or a pharmaceutical active agent, also components which are free of said compounds, which are employed, for instance, for balancing the overall charge of the assembly.

As previously mentioned, it has also been observed that the association of a component, in particular of a plurality of micelles, to a gas-filled microvesicle to form an assembly according to the invention, results in an increased resistance of said microvesicles towards pressure. For instance, it has been observed that microvesicles showing a P_{C50} (i.e. a critical pressure at which more than 50% of the microvesicle population is destroyed) of about 500 mm Hg, may increase said value of P_{C50} to at least 600 mm Hg and up to about 800 mm Hg, when associated to different types of micelles to form an assembly of the invention.

Kit

Another aspect of the invention relates to diagnostic kits comprising the assembly of the invention or its respective separate components, optionally further comprising the aqueous liquid carrier.

According to a first embodiment, said kit is a two component kit comprising the assembly of the invention together with an aqueous liquid carrier. Said two component kit can include two separate containers or a dual-chamber container.

In the former case the first container is preferably a conventional septum-sealed vial, wherein the vial containing the assembly as a lyophilized residue (obtained according to any of the above illustrated methods) in contact with the desired gas is sealed with a septum through which the carrier liquid may be injected for reconstituting the suspension of the gas-filled microvesicles/MACs assemblies. The carrier liquid is contained into a second container which preferably takes the form of a syringe. The syringe is preferably re-filled with the reconstituted suspension and used subsequently to administer the contrast agent by injection. Instead of the formed assembly, the first container can alternatively contain mixture of separately freeze-dried MAC and microvesicles compositions, which will form the desired assembly upon reconstitution with the aqueous carrier. Although in general hand shaking of the container provides the desired energy for reconstituting the suspension, means for directing or permitting application of sufficient energy towards the container can be provided (e.g. a Vortex mixer), in order to assure suitable reconstitution of the

assemblies' suspension. The dual-chamber container is preferably a dual-chamber syringe, where the components are kept separated e.g. by means of a removable septum, and once the lyophilisate has been reconstituted by gentle shaking, the container can be used directly for injecting the contrast agent. As before, means for directing or permitting application of sufficient energy towards of the container can be provided.

It can be appreciated by one ordinary skilled in the art that other two-chamber reconstitution systems capable of combining the dried powder with the aqueous solution in a sterile manner are also within the scope of the present invention. In such systems, it is particularly advantageous if the aqueous phase can be interposed between the water-insoluble gas and the environment, to increase shelf life of the product.

According to another embodiment, a kit according to the invention is an at least two component kit comprising a MAC composition, a microvesicle composition and, optionally, an aqueous carrier.

These are preferably presented as at least two separate containers, the first one containing the lyophilized microvesicle composition (e.g. in contact with a desired gas) and the second one containing the desired lyophilized MAC composition (optionally in contact with a desired gas or under vacuum). A third optional container, containing the aqueous carrier for reconstitution can advantageously be included in the kit. If desired, additional containers containing further lyophilized MAC compositions can be included in the kit. For administration, the MAC suspension is first reconstituted in the aqueous carrier and the obtained suspension is then used for reconstituting the microvesicle composition, thus forming the desired assembly suspension.

No specific containers vial or connection systems are required; the present invention may use conventional containers, vials and adapters. The only requirement is a good seal between the stopper and the container. The quality of the seal, therefore, becomes a matter of primary concern; any degradation of seal integrity could allow undesirables substances to enter the vial. In addition to assuring sterility, vacuum retention is essential for products stoppered at ambient or reduced pressures to assure safe and proper reconstitution. The material of the stopper forming the gas-seal of the container is preferably an elastomeric compound or multicomponent formulation based on an elastomer, such as poly(isobutylene) or butyl rubber. Conveniently a butyl rubber stopper from Daiko Seiko ltd. can be used.

【００５０】

EXAMPLES

The following materials are employed in the examples:

PBS	Phosphate buffered saline: 10 mM sodium phosphate, NaCl 0.9% w/w, pH = 7.4
Tris buffer	Tris buffered saline:10 mM Tris (hydroxy methyl)aminomethane, NaCl 0.9%, pH = 7.4
HEPES buffer	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (20 mM) and NaCl (150 mM), pH = 7.4
Tris glycerol buffer	Tris (hydroxymethyl) aminomethan 1g/l and 0.3 M glycerol, pH = 7.2
DIO18 marker	3,3'-dioctadecyloxacarbocyanine (Molecular Probes Inc., U.S.A.)
Gd-DTPA-$(SE)_2$	Distearoyl ester of gadolinium-diethylenetriaminepentacetic acid complex (prepared according to G. W. Kabalka et al., Magnetic Resonance in Medicine 8 (1988), 89-95)
DSPG	Distearoylphosphatidylglycerol sodium salt (Genzyme) IUPAC: 1,2 -Distearoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)]
DAPC	Diarachidoylphosphatidylcholine (Avanti polar Lipids) IUPAC: 1,2-Diarachidoyl-sn-glycero-3- phosphocholine
DSTAP	1,2 -Distearoyl-3-trimethylammonium-propane chloride (Avanti Polar Lipids)
DSPC	Distearoylphosphatidylcholine (Genzyme) *IUPAC: 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3- phosphocholine*
DPPG	Dipalmitoylphosphatidylglycerol sodium salt (Genzyme) *IUPAC: 1,2 -Dipalmitoyl-sn-glycero-3- [phospho-rac-(1-glycerol)]*
DPPA	Dipalmitoyl phosphatidic acid sodium salt (Genzyme) *IUPAC: 1,2 -Dipalmitoyl-sn-glycero-3- phosphate*
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine (Genzyme) *IUPAC: 1,2 -Dipalmitoyl-sn-glycero-3- phosphocholine*
DSEPC	Distearoylethylphosphatidylcholine (Avanti Polar Lipids) *IUPAC: 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-Ethylphosphocholine*
NaDOC	sodium deoxycholate (Fluka)
DSPE-PEG2000	Distearoylphosphatidylethanolamine modified with PEG2000, sodium salt (Nektar Therapeutics)
Ethyl-SPC3	Soy ethyl phosphocholine: 4:1 (w/w) mixture of Ethyl-DSPC and Ethyl-DPPC
DPPE-cap-biotin	1,2 dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(cap biotinyl) sodium salt (Avanti Polar Lipids)
PEG4000	Polyethyleneglycol, MW = 4000 (Fluka)
Pluronic 68	Ethyleneoxide/propyleneoxide block copolymer (Fluka)

【００５１】

C_4F_{10} Perfluorobutane

Dimensions and concentration of microvesicles are determined by using Coulter counter Multisizer (aperture: 30μm).

ζ-potentials of microvesicles suspensions are determined by using a Malvern Zetasizer 3000Hsa in NaCl 1mM.

Dimensions of micelle preparations are determined using a Malvern Zetasizer 3000Hsa.

Example 1

Preparation of positively charged microballoons

Tripalmitin (60mg) is dissolved in cyclohexane (0.6 ml) at 40°C. This organic phase is kept at 40°C until emulsification. 40 mg of Ethyl-SPC3 (cationic phospholipid) are dispersed in 30 ml of distilled water at 65°C for 15 min and then the dispersion is allowed to cool to 40°C.

The organic phase is emulsified in the aqueous phase using a Polytron® homogeniser PT3000 (10000 rpm, 1 min). The emulsion is then diluted with 5ml of PVA (200 mg, Mw: 9000 from Aldrich) in distilled water, then cooled to 5°C, frozen at -45°C for 10 min and then lyophilized (0.2 mbar, 24 h).

The lyophilisate is redispersed in distilled water (20 ml) in the presence of air, microballoons are washed twice by centrifugation (600 g for 10 min) with phosphate buffered saline and the final suspension of microballoons (20 ml). The size characterization for this preparation gave the following results: D_{V50} = 2.54 μm; D_N = 1.57 μm.

Example 1a

Preparation of fluorescent marked positively charged microballoons

Example 1 is repeated by adding 5% by weight (with respect to the total weight of tripalmitin) of lipophilic fluorescent probe DIO18 in the organic phase for fluorescently marking the microballoon. The size characterization for this preparation gave the following results: D_{V50} = 2.38 μm; D_N = 1.45 μm.

Examples 2a-2e

Preparation of DSTAP-containing positively charged microbubbles

15 mg of a mixture of DAPC and cationic lipid DSTAP (see relative ratio in table 1) and 985 mg PEG4000 are dissolved in tert-butanol (10 ml) at 50°C. The solution is sampled in 10 ml vials (50 mg of dry matter per vial) then freeze dried in a Christ Epsilon 2-12DS freeze dryer (-30°C, 0.56 mbar for 24h). After

【0052】

additional drying (25°C, 0.1 mbar for 5 hours), the vials are stoppered with an elastomeric stopper and sealed with an aluminium flip off.

The obtained lyophilisates are exposed to the desired gas (50:50 v/v of C_4F_{10}/N_2) and then redispersed in 5 ml of the PBS buffer solution thus obtaining a suspension of positively charged microbubbles. Size characterization of suspended microbubbles is reported in table 1.

Table 1: DSTAP-containing microbubbles

Example	DAPC/DSTAP molar ratio	D_V	D_N
2a	99:1	8.57	3.11
2b	95:5	8.64	1.73
2c	90:10	8.80	1.77
2d	80:20	9.22	1.82
2e	50:50	8.51	1.94

Examples 3a-3c

Preparation of negatively charged microbubbles

The preparation of examples 2a-2e is repeated by replacing the DAPC/DSTAP mixture with the same total amount (15 mg) of a DPPG/DSPC mixture in different relative amounts, as indicated in Table 2. Size characterization of suspended microbubbles is reported in table 2.

Table 2: DPPG-containing microbubbles

Example	DSPC/DPPG molar ratio	D_V	D_N
3a	75:25	6.05	1.97
3b	50:50	12.97	1.97
3c	25:75	5.89	1.88

Example 4

Preparation of positively charged microbubbles

DSTAP (200 mg) is dispersed in 100 ml of water containing 5.4% (w/w) of a mixture of propylen glycol and glycerol (3:10 w/w) at 80°C for 5 minutes and then cooled to room temperature.

The dispersion is transferred in a reactor under C_4F_{10} atmosphere and homogeneised at 20000 rpm (Polytron PT3000) for 10 min, keeping the rotor stator mixing shaft such that the openings are slightly above the surface of the

【００５３】

liquid. The obtained microbubbles are washed twice by centrifugation with water, then redispersed in a dextran 7.5% solution.

The suspension is sampled in 10ml vial (2ml per vial). The vials are cooled to -45°C and lyophilized for 24 hours, then stoppered, sealed and kept at room temperature. Size characterization of microbubbles re-suspended in distilled water was as follows: D_V= 4.04 ; D_N= 1.75.

Example 5a-5d

Preparation of negatively charged micelles

50 mg of Gd-DTPA-$(SE)_2$ (containing traces of radioactive ^{153}Gd) and 10 mg of NaDOC are dispersed in 5% aqueous glucose (10 ml) using a 3mm sonication probe attached to a Branson 250 sonifier (output: 30% for 10 min), to obtain an aqueous suspension of anionic micelles. The same preparation is repeated by dispersing different amounts of different compounds in the same volume of aqueous glucose solution, as indicated in the following table 3.

Table 3: Negatively charged micelles

Example	Gd-DTPA-$(SE)_2$ (mg)	NaDOC (mg)	DPPE-Cap-Biotin (mg)	DPPA (mg)	Pluronic F68 (mg)
5a	50	10	-	-	-
5b	50	10	3.8		
5c	-	-	-	16	16
5d			2,5	16	16

Example 6a-6f

Preparation of DPPA-containing negatively charged micelles

Various amounts of anionic phospholipid DPPA and neutral phospholipid DPPC (as indicated in table 4) together with 16mg Pluronic F68 are dispersed in 10 ml of PBS, using a 3mm sonication probe (Branson 250 sonifier, output 30% for 10 min). A small amount of DPPC-H^3 (approximately 2.5 µCi for 10ml of final suspension) is added to the micelle preparation as radioactive marker.

After sonication, the solution is filtered through 0.2 µm filters (Millipore). After cooling to room temperature, micelle size is measured using Malvern Zetasizer 3000HSA and specific radioactivity is determined using 50 µl of solution diluted in 10ml of LSC cocktail Hionic Fluor (Packard Bioscience) and counted in Tricarb 2200A liquid scintillation analyzer (Packard Bioscience).

【００５４】

Table 4: DPPA containing negative micelles

Example	DPPC (mg)	DPPA (mg)	DPPA/DPPC molar ratio	Pluronic F68 (mg)	Amount of DPPA (% w/w)
6a	17.62	0	-	16.0	-
6b	17.30	0.16	1:99	16.0	0.48
6c	17.26	0.32	2:98	16.0	0.95
6d	15.86	1.61	10:90	16.0	4.81
6e	8.80	8.00	50:50	16.0	24.39
6f	0.88	15.27	95:5	16.0	47.5

Example 7a-7b

Preparation of negatively charged micelles containing DSPE-PEG

20 mg of DSPE-PEG 2000 are dissolved in 1 ml of chloroform/ethanol (1/1, v/v) at 60°C in a round bottom flask and the solvent mixture is evaporated under vacuum, leaving a thin film on the inner wall of the flask. This film is further dried overnight in a vacuum chamber. The lipid film is then hydrated with 10ml Hepes buffer at 60°C for 30 min. The solution is then filtered on 0.2 µm filters and allowed to cool to room temperature prior to characterization. The filtered solution is diluted in water (dilution ratio 1:3) and analyzed by Malvern Zetasizer 3000HSA for size distribution. The results of two different preparations according to the above procedure are summarized in Table 5.

Table 5

Example	Dv (nm)	Dn (nm)
7a	15	9.9
7b	10.4	4.4

Example 8

Preparation of positively charged micelles containing Ethyl-SPC3

16 mg of Ethyl-SPC3 and 16 mg of Pluronic F68 are dispersed in 5% aqueous glucose (10 ml) using a 3mm sonication probe attached to a Branson 250 sonifier (output: 30% for 10 min), to obtain an aqueous suspension of cationic micelles.

【００５５】

Examples 9a-9e

Preparation of DSTAP-containing positively charged micelles

The preparation of examples 6a-6f is repeated by replacing negatively charged DPPA with positively charged DSTAP. Relative amounts of lipids and phospholipids of the different preparations are reported in table 6.

Table 6: DSTAP-containing positively charged micelles

Example	DPPC (mg)	DSTAP (mg)	DPPC/DSTAP Molar ratio	Pluronic F68 (mg)
9a	17.62	0	-	16.0
9b	17.44	0.17	99:1	16.0
9c	17.26	0.34	98:2	16.0
9d	15.86	1.69	90:10	16.0
9e	8.81	8.43	50:50	16.0

Examples 10a-10b

Preparation of assemblies with cationic microballoons and anionic micelles

The microballoons suspension of example 1 (1 ml) is admixed with different volume amounts (indicated in table 7) of the micelle preparation of Example 5a or of Example 5b, respectively. After 1 hour, the suspension is washed twice with PBS by centrifugation (600g for 5min) and redispersed in PBS (1.2 ml). The amount of bound micelles (expressed as the percentage of the radioactivity measured on the assembly suspension with respect to the radioactivity measured on the initial micelle preparation) is determined by measuring the Gd^{153} radioactivity (gamma count) of the suspension, by using a Cobra II Autogamma instrument (Packard Bioscience). The results are given in table 7.

Table 7

	µl micelle /ml microballoons	DV50 (µm)	DN (µm)	% of bound micelles
Example 1	-	2.38	1.45	-
Example 10a (assembly with non-biotinated micelles of ex. 5a)	2.5	2.69	1.66	100
	10	2.83	1.70	90.9
	25	2.81	1.71	91.4
	100	2.37	1.58	31.1
Example 10b (assembly with biotinated micelles from ex. 5b)	2.5	2.63	1.66	100
	10	2.84	1.70	96.8
	25	2.84	1.73	88.1
	100	2.43	1.62	30.1

【００５６】

As inferable from the above table, while the relative amount of bound micelles (i.e. the percentage of bound micelles with respect to the total amount of added micelles) decreases by increasing the total amount of micelles (i.e. the volume of micelle suspension) added to the microvesicle suspension, the absolute amount of bound micelles (given by the product of the first and last column in table 7) is nevertheless increasing.

Substantially similar results are obtained by preparing an assembly with the microballoons of example 1 and the micelle preparations of examples 5c or 5d, respectively.

Example 11

Determination of binding activity of the assemblies of example 10a-10b

To test the binding activity of the assemblies of examples 10a and 10b (10 µl and 100 µl of each micelle suspension preparations), a neutravidin coated surface is prepared as follows:

Carbonate Buffer (pH 9.5 – 300µl) and NeutrAvidin™ (Pierce – 1 mg/ml - 50µl) are added to each well of a twelve wells plate (Nunc™). After incubation (overnight – 4°C), the well is washed twice with PBS containing Tween 20 0.1% and twice with PBS. Bovine serum albumin (2% in PBS – 350µl) is added and after incubation (25°C – 1h), the well is washed twice with PBS containing Tween 20 0.1% and twice with PBS.

An amount of $2 \cdot 10^8$ assemblies prepared according to examples 10a and 10b are added to each well, then the well is filled with PBS, sealed and the plate is turned. After inverse incubation (2h ~ 25°C), the well is washed twice with PBS and the surface is observed through an optical microscope with a 40x magnification lens. Both the assemblies from example 10b, containing biotinated micelles, show affinity for the neutravidin coated surface, the 100 µl/ml preparation providing a higher coverage of the surface with respect to the 10 µl/ml preparation. Corresponding non-biotinated preparations of example 10a show instead no binding activity on the neutravidin coated surface.

Substantially similar results are obtained by comparing the binding activity of assemblies comprising microballoons of example 1 and non-biotinated micelles of example 5c with corresponding assemblies comprising microballoons of example 1 and biotinated micelles of example 5d.

【0057】

Example 12a-12b

Preparation of assemblies with cationic microbubbles and anionic micelles

The microbubbles suspension of example 2d (1 ml) is admixed with different volume amounts (indicated in the following table 8) of the micelle preparation of Examples 5a or 5b, respectively. Suspensions are gently stirred for 1 hour then washed twice by centrifugation (180g for 5min) with Tris glycerol buffer. Infranatant is discarded and the residue is dispersed in Tris glycerol buffer (1 ml). Size, concentration and ζ-potential of the obtained assemblies are reported in table 8.

Table 8

	micelle/microbubble susp. (µl/ml)	DV50 (µm)	DN (µm)	ζ-potential (mV)
Example 2d	-	4.74	1.82	57.1
Example 12a (with non-biotinated micelles from example 5a)	10	6.92	2.75	37.6
	30	8.79	2.81	-19.0
	100	7.81	2.29	-38.0
	300	6.12	1.91	-50.4
Example 12b (with biotinated micelles from example 5b)	10	6.43	2.53	30.1
	30	7.31	2.37	-28.2
	100	7.22	1.94	-42.4
	300	6.11	1.87	-44.4

In both cases, increasing volumes of micelle suspension determine a reduction of the ζ-potential of the obtained respective assembly suspension.

Substantially similar results are obtained by using the microbubbles suspensions of examples 2c or 2e, in place of the microbubble suspension of example 2d, or by replacing the micelle preparations of examples 5a and 5b with those of examples 5c and 5d, respectively.

Example 13

Determination of binding activity of the assemblies of examples 12a-12b

To test the binding activity of the assembly of example 12a-12b, a neutravidin coated surface is prepared as described in example 11 and tested with different amounts (300, 100, 30 and 10 µl) of the preparations of examples 12a and 12b.

A marked binding activity is observed at the optical microscope for the 100 µl/ml and 300 µl/ml preparations of example 12b. A lower binding is observed for the 30 µl/ml preparation while the 10 µl/ml mixture shows poor binding. All

【００５８】

the assemblies of example 12a (not containing biotinated micelles) show no binding activity.

Example 14a-14b

Preparation of assemblies with cationic microbubbles and anionic micelles

The lyophilized content of a vial obtained according to example 4 is exposed to C_4F_{10} and redispersed in 2 ml of distilled water. The suspension is washed twice by centrifugation (180g for 10min) with PBS and redispersed in 2ml of PBS.

50 µl of a micelles preparation prepared according to example 5a or 5b, respectively, are added, the mixture is stirred overnight with a rotating stirrer under C_4F_{10} atmosphere, then washed twice with PBS by centrifugation (180g for 10 min) and finally redispersed in 2ml of PBS.

Table 9 provides the characterization of the assemblies of examples 14a and 14b.

Table 9

		DV_{50} (µm)	D_N (µm)	Conc. (part./ml)	Micelles Yield (%)
Example 14a	Microbubbles	4.57	2.75	5.50E+08	-
	Assemblies	4.81	2.72	4.04E+08	91.9
Example 14b	Microbubbles	4.39	2.65	3.48E+08	-
	Assemblies	4.45	2.44	3.45E+08	83.8

As inferable from the above table, the substantial totality of the micelles is associated to microbubbles in the formed assemblies, said assemblies having substantially the same mean diameter as the initial microbubbles.

Example 15

Preparation of assemblies with anionic microbubbles and cationic micelles

A microbubbles suspension prepared according to example 3b (1 ml) is admixed with different volume amounts (indicated in the following table 10) of the micelles preparation of Example 8. The suspension is gently stirred for 1 hour, then washed twice by centrifugation (180g for 5min) with Tris glycerol buffer. Infranatant is discarded and the resulting assemblies are dispersed in Tris glycerol Buffer (1 ml). Table 10 shows some characteristics of the assemblies.

【００５９】

Table 10

µl micelles suspension per ml of microbubbles suspension	D_V (µm)	D_N (µm)	ζ-potential (mV)
0	7.87	1.86	-60.2
10	11.43	4.98	-44.9
100	9.16	2.48	+17.1
300	9.20	2.12	+49.4

It can be observed that with an amount of micelles capable of determining a reversal in sign of the initial ζ-potential of the microbubbles suspension, the mean dimensions of the assembly become closer to the dimensions of the initial microbubbles.

Example 16

Determination of the amount of bound micelles as a function of the amount of charged compounds in assembly preparations comprising cationic microbubbles and anionic micelles

Different assembly suspensions are prepared by admixing 300 µl of a micelle solution prepared according to examples 6a-6f to 1 ml of a microbubble suspension in PBS prepared according to examples 2a-2e in a 5 ml glass tube, for a total of 30 assembly preparations. The mixed suspensions are gently stirred for 30 min and then washed twice by centrifugation (180g for 10mn) to remove unbound material. The amount of the lipid molecules in micelles bound to the microbubbles is evaluated by dosing radioactively labelled molecule DPPC-^{3}H incorporated within the micelles.

Figure 1 shows the results of the measurements, where lines A to E represent the amounts of micelles bound to the microvesicles as a function of the amount of charged compounds in said micelles, for assemblies comprising the respective microvesicles prepared according to examples 2a to 2e.

From said figure, it can be noticed that substantially no bound micelles are observed for assembly preparations including micelles of example 6a (no charged surfactant). Furthermore, the amount of micelles bound to the microvesicles increases with the increase of the amount of charged compounds included in the microvesicle. Finally, for this particular combination of micelles/microvesicles assemblies, it can be observed that higher amounts of micelles bind to the microvesicles when the relative amount of charged compound in the micelle is from about 1% to 5% (w/w) of the total weight.

【００６０】

Example 17

Determination of the amount of bound micelles as a function of the amount of charged compounds in assembly preparations comprising anionic microbubbles and cationic micelles

Different assembly suspensions are prepared by admixing 300 µl of each of the micelle solutions prepared according to examples 9a-9e to 1 ml of each of the microbubble suspensions prepared according to examples 3a-3c in a 5 ml glass, respectively, for a total of 15 assembly preparations. The mixed suspensions are gently stirred for 30 min and then washed twice by centrifugation (180g for 10mn) to remove unbound material. The amount of the lipid molecules in micelles bound to the microbubbles is evaluated by dosing radioactively labeled molecule DPPC-^{3}H incorporated within the micelles.

Similar results are observed as for the assembly preparations of example 16, i.e. that by increasing the amount of charged compounds included in the microvesicle it is possible to increase the amount of micelles bound to the microvesicles and that, in particular for assemblies where the microvesicles contain a lower amount of charged compounds, a higher amount of micelles is bound to the microvesicles when the relative amount of charged component in the micelle is from about 1% to 5% (w/w).

Example 18

Determination of the amount of bound micelles as a function of the amount of micelles added to microbubbles suspensions including different amounts of charged compounds

Different amounts (50, 100, 250 and 500 µl) of micelle preparations prepared according to example 7a or 7b are combined with 1 ml of the microbubble preparations prepared according to examples 2b, 2d and 2e for a total of 12 assembly preparations (in particular 2b and 2d are combined with 7a, while 2d is combined with 7b). The mixtures are gently stirred for 30 min, and washed twice by centrifugation (180g/10min) in water to remove the unbound material.

The resulting suspensions are characterized by Coulter Counter for the measurement of size distribution and by Malvern Zetasizer for ζ-potential. A portion of the samples is freeze-dried at 0.2 mbar for 24 hours and the lyophilisate analyzed by HPLC to determine the amount of DSPE-PEG in the assemblies (µg PE-PEG/ml bubbles). The results are summarized in the following table 11, illustrating the initial amount of DSPE-PEG included in the mixture for

【００６１】

forming the assembly, the final amount of DSPE-PEG in the assembly (corresponding to the amount of bound micelles), the ratio (expressed as equivalent of charges) between positive and negative charges in the final assembly and the respective ζ-potential of the final suspension.

Table 11: Cationic microbubbles and anionic micelles

	Initial mixture	Final mixture		
	DSPE-PEG (nmoles)	DSPE-PEG (nmoles)	EC ratio	ζ-potential (mV)
Examples 2d and 7a	35.87	1.35	0.18	35.8
	71.75	2.34	0.43	15.6
	179.37	2.28	0.46	10.9
	358.75	3.26	0.59	-13.3
Examples 2d and 7a	35.87	3.30	0.14	26.2
	71.75	3.69	0.18	20.8
	179.37	3.36	0.21	12.4
	358.75	4.77	0.22	-10.0
Examples 2e and 7b	35.87	3.81	0.07	39.3
	71.75	5.24	0.10	31.5
	179.37	8.04	0.15	18.3
	358.75	9.79	0.20	9.6

From the above table, it can be observed that, in general, the higher the amount of charged compounds in the microvesicle, the higher the amount of bound micelles in the final assembly. In addition, with respect to a same microbubble preparation, the higher the amount of bound DSPE-PEG, the higher the EC ratio and the lower the respective ζ-potential value.

Example 19

Assembly of cationic microvesicles with anionic micelles and comparative mixture of anionic microvesicles and anionic micelles

20mg of DSPE-PEG 2000 are weighted and dissolved in chloroform/Methanol (1/1, v/v) at 60°C in a round bottom flask and the solvent mixture is evaporated under vacuum, deposing a thin film on the inner wall of flask. This film is further dried overnight in a vacuum chamber.

The lipid film is hydrated with 10 ml 5% glucose at 60°C during 30 min, the solution is filtered on 0.2μm filters and then cooled down to room temperature prior to the characterization.

【0062】

The preparation is repeated twice.

Microbubbles are prepared as described in example 2e (positively charged) and 3b (negatively charged), by using a 50/50 (w/w) mixture of DAPC and DSTAP or a 50/50 (w/w) mixture of DSPC and DPPG. Vials are exposed to C_4F_{10}/N_2 50/50 (v/v) prior to reconstitution.

2.5 ml of micelles solution are diluted with 2.5 ml of 5% glucose. The lyophilized microbubbles are reconstituted using the diluted solution of micelles, vortexed for 2 minutes then mixed gently for 30 minutes.

The obtained suspension is washed twice with glucose 5% (by centrifugation, 180g/10 min) and the supernatant is redispersed in 2.5 ml of 5% glucose. ζ-potential of each suspension is measured by using a Malvern Zetasizer 3000Hsa (50µl/10ml NaCl 1mM). The amount DSPE-PEG2000 in each suspension is determined using HPLC. Results are given in the following table 12.

Table 12: Mixture of anionic micelles with anionic or cationic microbubbles

Anionic micelle suspension with:	ζ-potential (mV)	DSPE-PEG2000 (µg/ml)
Anionic microbubbles	-41.3±2.7	0.8
Cationic microbubbles	-18.3±2.5	129.0

From the above table, it can be observed that substantially no binding of anionic micelles on anionic microbubbles is obtained, i.e. only negligible amounts of DSPE-PEG are found in the final mixture, while the ζ–potential remains substantially negative.

Example 20

Cationic microballoons – colloidal Gold Assembly

A suspension of cationic microballoons prepared according to example 1 is admixed with a colloidal suspension of gold particles stabilized with sodium citrate (Polysciences – 60 nm) in various ratios (expressed as number of gold particles/number of microballoons, see table 13). After 2 hours, the floating particles are separated and redispersed in distilled water. Table 13 shows that a neutral value of ζ–potential is achieved at a ratio of about 200 gold particles per microballoon.

【0063】

Table 13

Gold colloid/Microballoons Number ratio	Cationic microballoons
0	+35.0
50	+23.8
100	+19.3
200	-0.7
800	-2.8
2000	-19.0

Example 21 - Cationic microbubbles-magnetites assembly

Magnetites coated with DPPA/Pluronic F108 (FE/DPPA/Pluronic F108 ratio 3/15/15 in mg/ml) were prepared according to US patent 5,545,395. The solution was diluted 100 times with Tris(1g/l)/Glycerol(0.3M) buffer (pH:7.05). Cationic microbubbles (prepared according to example 2d, except that the employed gas is SF_6 instead of the C_4F_{10}/N_2 mixture) are redispersed under SF_6 atmosphere with 5ml of magnetites solution. After 2min of vortexing, the suspension is mixed gently for 1 hour. Then the floating particles are washed twice with Tris/Glycerol buffer by centrifugation (180g/10min). Size and concentration are measured by Coulter counter Multisizer. ζ-potential is determined with Malvern Zetasizer 3000Hsa (dilution: 50µl/10ml water). Magnetites binding was measured using relaxation time (T2) determination (Bruecker: Minispec MQ20) and compared with a control carried out on a same preparation of microbubbles without magnetite particles. The results are given in table 14.

Table 14

	Control suspension (without magnetite particles)	Suspension with magnetite particles
ζ-potential (mV)	+40.4 ±0.8	-30.8 ±4.1
T2 (ms)	1800 ±300	29.3 ±0.2

As shown in the above table, further to the reduction of the ζ-potential with respect to the control suspension a substantial reduction of the T2 is observed, confirming a substantial binding of magnetite-containing micelles to the microbubbles.

【0064】

Example 22 – Effect of opposite charged micelles on the surface of charged microbubbles in *in vivo* administration

Positively charged microbubbles are prepared as described in example 2d using a 80/20 (w/w) mixture of DAPC and DSTAP. Negatively charged microbubbles are prepared as described in example 3b using a 50/50 (w/w) mixture of DSPC and DPPG. Vials are exposed to C_4F_{10}/N_2 50/50 (v/v) prior to reconstitution with Tris/glycerol buffer (5ml).

Micelles are prepared according to example 6f (negatively charged) and example 8 (positively charged). Thereafter the following suspensions of microbubbles or of assemblies are prepared:

Suspension A : 600µl of Tris/Glycerol buffer are admixed with 2ml of microbubbles (example 2d – positively charged) and mixed gently for 30 min.

Suspension B : 600µl of micelles according example 6g (negatively charged) are admixed with 2ml of microbubbles (example 2d – positively charged) and mixed gently for 30 min.

Suspension C : 600µl of Tris/Glycerol buffer are admixed with 2ml of microbubbles (example 3b – negatively charged) and mixed gently for 30 min.

Suspension D : 600µl of micelles according example 8 (positively charged) are admixed with 2ml of microbubbles (example 3b – negatively charged) and mixed gently for 30 min.

All suspensions are washed twice with Tris/glycerol buffer (by centrifugation 180g/10 min) and the supernatants are redispersed in 2ml of buffer. Sizes and concentrations are determined using a Coulter counter. ζ-potential of each suspension is measured with a Malvern Zetasizer 3000Hsa (50µl/10ml NaCl 1mM) and are illustrated in the following table 15.

Table 15

Suspension	ζ-potential (mV)
A	+48.6±9.3
B	-51.9±1.3
C	-61.5±7.2
D	+37.2±9.8

The suspensions were injected in a rabbit ear vein at a dose of 5E+06 microbubbles per kg body weight. Two-dimensional echography was performed in Coherent Contrast Imaging (CCI) using an Acuson Sequoia 512 equipped with a 4C1-S transducer in intermittent imaging (two frames/s) and a high

【0065】

mechanical index (MI). Images of the kidney were recorded on a video recorder during 3 minutes and the sequence was analyzed to determine the mean pixel intensity as a function of time in a region of interest (ROI) selected in the cortex (Figures 2 and 3).

As seen on the figures, the addition of micelles of opposite charge on microbubbles changes dramatically the in vivo behaviour of microbubbles. Thus positively charged bubbles are hardly detectable in the cortex of the kidney (suspension A). However after incubation with negatively charged micelles, the same microbubbles show a strong signal in the ROI (suspension B). Similarly negatively charge microbubbles (suspension C) show a strong signal in the kidney. However after admixture with positively charged micelles, almost no signal is detectable in the ROI.

Exemple 23 – Assembly of Cationic microbubbles with anionic micelles comprising a drug

2 ml of microbubble suspension (prepared according to example 2a dispersed in PBS) are mixed with different amounts of Fungizone® solutions (micellar suspension of Amphotericin B with sodium deoxycholate in PBS - Bristol Myers Squibb) as illustrated in the following table 16. Suspensions are gently stirred for 1 hour, then washed twice by centrifugation (180g/5min) with PBS buffer. Infranatant is discarded and the obtained assemblies are dispersed in Buffer (1ml). Size and concentration are measured by Coulter Counter Multisizer (aperture : 30µm – 50µl/100ml NaCl 0.9%). ζ-potential is determined with a Malvern Zetasizer 3000Hsa (50µl/10ml distilled water). The amount Amphotericin B on microbubbles was measured by spectrophotometry (409 nm – 50µl of assemblies in 2ml of $CHCl_3$/MeOH 1/1) and compared to a calibration curve of Fungizone®. The results illustrated in the following table 16 show that by increasing the amount of added micelles, it is possible to include increasing amounts of drug in the assemblies.

Table 16 – Assemblies with drug

	µl of micelles suspension per ml of microbubbles suspension	ζ-potential (mV)	Amphotericin B (µg/ml)
Ex. 2a	-	49.1±3.0	-
+Fungizone®	10	50.8 ±4.3	42.8
	30	28.9 ±6.9	122.0
	100	-24.7 ±0.3	367.9

Example 24: Assembly with double layer of micelles

Ex. 24a: Preparation of negatively charged bubbles

DPPC/DPPS-containing microbubbles are prepared using the method similar to the one described in Example 3 of US patent no. 5,830,435. Briefly, multilamellar liposomes (MLVs) are obtained by dispersing 59.2 mg of DPPC and 40.8 mg of DPPS in 100ml of distilled water containing 1g of propylene glycol. The liposomes are incubated at 70°C for 30 min under agitation. The mean diameter of the liposomes is of about 1.4µm for D_N and 2.7µm for D_V.

The liposome suspension is introduced in a gas tight glass reactor equipped a high speed mechanical emulsifier (Megatron MT3000, Kinematica, Switzerland). A gas bag containing C_4F_{10} is connected to the mixing chamber of the emulsifier. After homogenisation (10,000 rpm, 1 min), a milky suspension of microbubbles is obtained. The infranatant (about 90 ml containing mostly liposomes) is removed by decantation. The supernatant (containing the microbubbles) is recovered and resuspended in distilled water to a total volume of 100 ml. The decantation step is repeated and the final bubble suspension is resuspended in 10% maltose. Aliquots of the suspension are collected in 10 ml glass vials (1 ml of suspension per vial) and the samples are frozen at -45°C and lyophilized.

After lyophilisation, the vials are closed with rubber stoppers, evacuated and filled with a gas mixture containing a 1:1 (v/v) mixture of C_4F_{10} and air. Microbubbles are generated by injecting 2 ml distilled water intothe vials through the stopper and hand shaking.

Ex. 24b: Preparation of cationic and anionic micelles

Ex. 24b1

Cationic micelles are prepared with 3.73mg/ml of DSPE-PTE020 (a multi-arm PEG-phospholipid, NOF Corporation, Japan) and 1.27mg of cationic

phospholipid DPEPC (Dipalmitoyl Glycero-3-Ethylphosphocholine, Avanti® Polar Lipids, Inc. USA).

Ex. *24b2*

Anionic and functionalized micelles are prepared with 4.1 mg/ml of DSPE-PEG2000 and 0.9 mg/ml of a GPIIbIIIa binding lipopeptide (DPPE-PEG2000-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val, prepared according to example 3 of US 6,139,819).

Both positively and negatively charged micelles are prepared in 5% glucose solution.

Ex. 24c: Preparation of assembly with negatively charged bubbles and multi-MACs layers having opposite electrically charges

50µl and 500µl of cationic micelles prepared according to Ex. 24b1 are respectively added to two preparations containing about $1x10^9$ negatively charged microbubbles prepared according to Ex. 24a. The mixture is gently stirred for 30 min and then washed twice by centrifugation (10'/1000 rpm), with resuspensions in a solution of glucose 5%. Size and zeta potential of the obtained assembly as determined are reported in table 17 below (rows "Assembly 1"). The results show that after coating the negatively charged microbubbles with a layer of cationic micelles, the measured zeta potential of the assembly suspension becomes positive.

100 µl and 250 µl of anionic micelles suspension (prepared according to Ex. 24b2) are then respectively added to the assembly containing 50µl of cationic micelles and to the assembly containing 500µl of cationic micelles. The two mixtures are gently stirred for 30 min and washed twice by centrifugation (10'/1000rpm) with resuspensions in a solution of glucose 5%. The diameters and zeta potential values of the obtained double layer assembly are given in the table 17 below (rows "Assembly 2"); the presence of the second layer of negative micelles determines corresponding negative values of zeta potential.

Table 17

	µl micelles added to $1x10^9$ microbubbles	D_V (µm)	D_N (µm)	ζ-potential (mV)
Microbubbles	0	2.4	1.3	-63
Assembly 1	50	2.5	1.4	+5
Assembly 1	500	2.2	1.3	+8
Assembly 2	100	2.0	1.3	-30
Assembly 2	250	2.2	1.3	-38

【0068】

Similar assemblies comprising a plurality of alternately charged layers can also be manufactured with others types of MACs, such as liposomes and nanoparticles. For instance, negatively charged microbubbles can be coated with cationic and drug containing liposomes and then with a second layer of anionic micelles bearing targeting moieties.

Example 25: *preparation of assemblies from emulsion*

50 ml of distilled water containing DAPC and DSTAP (80:20, 2mg/ml) are heated at 70°C for 30 minutes then cooled at room temperature. 4 ml of perfluorohexane is emulsified in this aqueous phase using a high speed homogenizer (Polytron, 10,000 rpm, 1 minute). The resulting emulsion shows a median diameter in volume (D_{v50}) of 5.0 µm and a mean diameter in number (D_N) of 2.7 µm as determined with a Malvern Mastersizer. The emulsion was washed by centrifugation and re-suspended in water. Different amounts of anionic micelles prepared according to example 24b2 are respectively added to three aliquots of the above cationic emulsion, with respective concentrations of 135 µl, 270 µl and 540µl per ml of emulsion. After incubation (30 min at room temperature under gentle stirring) and removal of the excess of micelles by centrifugation, the micelle-coated emulsion was redispersed in a 20% (w/w) aqueous PEG4000 solution. The emulsion-micelles assembly was distributed in vials (2 ml/vial) then frozen and lyophilized in vials. Air in the vials of lyophilisates was evacuated and replaced by C_4F_{10}. After reconstitution with 2 ml of a 5% glucose solution, a milky microbubble-micelles assembly suspension is obtained. were performed. Results of Coulter counter and zeta potential analyses are gathered in table 18 below.

Table 18

Micelles/bubbles (*µl/ml*)	Bubbles/ml	D_N (*µm*)	D_V (*µm*)	D_{V50} (*µm*)	Z-pot.
-	5.88E+07	1.35	4.65	4.22	46.9
135	8.27E+08	1.23	3.70	2.35	20.3
270	8.61E+08	1.39	4.12	3.35	-4.3
540	1.04E+09	1.31	3.85	3.34	-6.3

Preparations with increasing amounts of anionic micelles, result in increasing amounts of microbubble. Furthermore, surface charge properties can

be also modulated (zeta potential values varying from positive to negative) as desired.

Example 26: *preparation of assemblies from gas emulsion*

Negatively charged microbubbles are obtained according to Example 24a using C_4F_{10} as gas phase and DPPS as phospholipid (2 mg/ml) to stabilized microbubbles. After bubble generation by high speed mechanical emulsification (Megatron® MT3000, Kinematica, Switzerland) of the DPPS liposome suspension, the microbubbles are washed by diafiltration for 30 minutes using a 1 µm polycarbonate membrane (Nuclepore®), to remove the excess of phosphospholipids in the bubble suspension. Cationic micelles containing DPEPC and DSPE-PEG2000 conjugated to rat anti-mouse monoclonal IgG1 against P-selectin (70:30 in molar ratio, 5 mg/ml) are added to the bubble suspension (50 µl of micelles for 1 ml of microbubbles about 5×10^9 bubbles/ml). The mixture is gently stirred for 30 min at room temperature and centrifuged. The assemblies (supernatant) are resuspended in a 10% maltose solution, frozen and lyophilised (2ml/vial). After freeze-drying, lyophilisates are gassed with C_4F_{10} and reconstituted with 2 ml distilled water. The Coulter analysis showed that more than 90% of bubble-micelles assemblies were still intact after lyophilisation. These microbubbles showed a D_N of 1.3 µm and D_V of 2.9 µm. Flow cytometry measurements confirmed the presence of the biochemically active IgG1 antibody at the surface of the assemblies.

CLAIMS

1. An assembly comprising a gas-filled microvesicle bearing a first overall net charge and a component associated to said microvesicle wherein said component bears a second overall net charge opposite in sign to said first net charge, comprises a biocompatible surface active agent and has a diameter of 100 nm or lower.

2. An assembly according to claim 1 wherein said associated component has a diameter of 80 nm or lower.

3. An assembly according to claim 1 wherein said associated component has a diameter of 50 nm or lower.

4. An assembly according to claim 1 wherein said associated component comprises a targeting ligand, a bioactive agent, a diagnostic agent or any combination thereof.

5. An assembly according to claim 4 further comprising a second component bearing an overall net charge, optionally comprising a different targeting ligand, bioactive agent, diagnostic agent or any combination thereof.

6. An assembly according to claim 5, wherein said second component bears an overall net charge equal in sign with respect to the charge of the microvesicle.

7. An assembly according to claim 1 wherein said biocompatible surface active agent is an amphiphilic material.

8. An assembly according to claim 1 wherein said biocompatible surface active agent is selected among (C_2-C_{10}) organic acids, organic fatty acids comprising a (C_{12}-C_{24}) aliphatic chain, pharmaceutically acceptable salts thereof, esters thereof with polyoxyethylene; polyionic (alkali) salts; organic amines; amides; quaternary amine salts; aminoacids; phospholipids; ; esters of mono- or oligo-saccharides with (C_{12}-C_{24}), organic fatty acids; organic sulfonates; perfluoroorganic acids; polymeric surfactants; and mixtures thereof.

9. An assembly according to claim 1 wherein the ratio between the number of charges per mole of microvesicles and the number of charges per mole of the second component is from about 10:1 to about 1:10.

10. An assembly according to claim 9 wherein said ratio is of about 3:1 or less.

11. An assembly according to claim 9 wherein said ratio is of about 2:1 or less.

12. An assembly according to claim 1 wherein said microvesicle is a microbubble stabilized by an envelope comprising an amphiphilic film-forming compound or a microballoon having a material envelope.

13. An assembly according to claim 12 wherein said amphiphilic film-forming compound comprised in the envelope stabilizing the microbubble is a phospholipid.

14. An assembly according to claim 13 wherein said envelope comprises a phospholipid or a lipid bearing a positive or negative net charge.

15. An assembly according to claim 14 wherein said phospholipid or lipid is selected from phosphatidylserine derivatives, phosphatidic acid derivatives, phosphatidylglycerol derivatives, polyethyleneglycol modified phosphatidylethanolamines, ethylphosphatidylcholine derivatives and the respective lyso-forms; cholic acid salts; deoxycholic acid salts; glycocholic acid salts; (C_{12}-C_{24}) fatty acid salts thereof; alkylammonium salts comprising at least one (C_{10}-C_{20}) alkyl chain; tertiary or quaternary ammonium salts comprising at least one (C_{10}-C_{20}) acyl chain linked to the nitrogen atom through a (C_3-C_6) alkylene bridge; and mixtures thereof.

16. An assembly according to claim 12 wherein the material envelope of said microballoon comprises a polymeric material, a proteinaceus material, a water insoluble lipid or any combination thereof.

17. An assembly according to claim 12 or 13 wherein the material envelope of said microballoon comprises a ionic biodegradable polymers.

18. An assembly according to claim 13 wherein the material envelope of said microballoon further comprises a phospholipid or a lipid bearing a positive or negative net charge.

19. An assembly according to claim 18 wherein said phospholipid or lipid is selected from phosphatidylserine derivatives, phosphatidic acid derivatives, phosphatidylglycerol derivatives, polyethyleneglycol modified phosphatidylethanolamines, ethylphosphatidylcholine derivatives and the respective lyso-forms; cholic acid salts; deoxycholic acid salts; glycocholic acid salts; (C_{12}-C_{24}) fatty acid salts thereof; alkylammonium salts comprising at least one (C_{10}-C_{20}) alkyl chain; tertiary or quaternary ammonium salts comprising at least one (C_{10}-C_{20}) acyl chain linked to the nitrogen atom through a (C_3-C_6) alkylene bridge; and mixtures thereof.

20. An assembly according to anyone of claims 1 to 6 wherein said component associated to said microvesicle is a micelle.

21. An assembly according to claim 20 wherein said micelle comprises a polyethyleneglycol modified phospholipid; an alkylammonium salt comprising at least one (C_{10}-C_{20}) alkyl chain; a tertiary or quaternary ammonium salt comprising at least one (C_{10}-C_{20}) acyl chain linked to the nitrogen atom through a (C_3-C_6) alkylene bridge; a (C_{12}-C_{24}) fatty acid salt; a polymeric surfactant; or mixtures thereof.

22. An assembly according to claim 20 wherein said micelle comprises a (C_{12}-C_{24}) fatty acid di-esters of phosphatidylcholine, ethylphosphatidylcholine, phosphatidylglycerol, phosphatidic acid, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine or sphingomyelin.

23. An assembly according to claim 20 wherein said micelle comprises a phospholipid or a lipid bearing a positive or negative net charge, or a polymeric ionic surfactant.

24. An assembly according to claim 23 wherein said phospholipid or lipid is selected from phosphatidylserine derivatives, phosphatidic acid derivatives, phosphatidylglycerol derivatives, polyethyleneglycol modified phosphatidylethanolamines, ethylphosphatidylcholine derivatives and the

respective lyso-forms; cholic acid salts; deoxycholic acid salts; glycocholic acid salts; (C_{12}-C_{24}) fatty acid salts thereof; alkylammonium salts comprising at least one (C_{10}-C_{20}) alkyl chain; tertiary or quaternary ammonium salts comprising at least one (C_{10}-C_{20}) acyl chain linked to the nitrogen atom through a (C_3-C_6) alkylene bridge; and mixtures thereof.

25. An assembly according to claim 1 wherein said component associated to said microvesicle is a colloidal nanoparticle.

26. An assembly according to claim 1 wherein said component associated to said microvesicle is a solid polymeric nanoparticle.

27. An aqueous suspension of a physiologically acceptable liquid comprising an assembly according to any of the claims 1 to 26.

28. An assembly according to any of the claims 1 to 26, wherein an aqueous suspension of said assembly in a pharmaceutically acceptable carrier shows a ζ-potential which is decreased of at least 50% in absolute value with respect to the ζ-potential of an aqueous suspension in the same carrier of the gas-filled microvesicles forming said assembly.

29. An assembly according to claim 28 wherein said ζ-potential is decreased of at least 75% in absolute value.

30. An assembly according to claim 28 wherein said ζ-potential is decreased of about 100% or more in absolute value.

31. A pharmaceutical kit which separately comprises:
a) a gas-filled microvesicle, or a precursor thereof, bearing a first overall net charge as a first component;
b) a second component, or a precursor thereof, associable with said microvesicle bearing a second overall net charge opposite in sign to said first net charge, said associated component having a diameter of 100 nm or lower.

32. A pharmaceutical kit according to claim 31 further comprising a pharmaceutically acceptable liquid carrier.

33. A pharmaceutical kit according to claim 32 wherein said first and second components are in the form of separate freeze-dried preparations.

34. A pharmaceutical kit which comprises:
a) a gas-filled microvesicle, or a precursor thereof, bearing a first overall net charge as a first component;
b) a second component, or a precursor thereof, associated with said microvesicle bearing a second overall net charge opposite in sign to said first net charge, said associated component comprising a biocompatible surface active agent and having a diameter of 100 nm or lower.

35. Method for preparing an assembly according to any of the previous claims 1 to 26, which comprises admixing a preparation comprising gas-filled microvesicles or a precursor thereof with a preparation comprising a component or a precursor thereof to be associated to said microvesicles.

36. Method according to claim 35 which comprises:
1) preparing a first aqueous suspension comprising a gas-filled microvesicle;
2) preparing a second aqueous suspension comprising a component to be associated with said gas-filled microvesicle;
3) admixing said two suspensions, to obtain an aqueous suspension comprising said assembly.

37. Method according to claim 35 which comprises:
1) preparing a first aqueous suspension comprising a gas-filled microvesicle;
2) freeze-drying said suspension, to obtain a first lyophilized product;
3) preparing a second suspension comprising a component to be associated with said gas-filled microvesicle;
4) freeze-drying said suspension, to obtain a second lyophilized product;
5) reconstituting said first and said second lyophilized product with a physiologically acceptable aqueous carrier in the presence of a gas, to obtain an aqueous suspension comprising the assembly.

38. Method according to claim 37, wherein step 5) comprises the steps of:

a) reconstituting the second lyophilized product with a physiologically acceptable aqueous carrier to obtain a suspension comprising the component to be associated to the gas-filled microvesicle; and

b) reconstituting the first lyophilized product with said suspension in the presence of a gas.

39. Method according to claim 35 which comprises:

1) preparing an aqueous emulsion comprising an organic solvent, a phospholipid and a lyoprotecting agent;

2) preparing an aqueous suspension comprising a component to be associated with a gas-filled microvesicle;

3) admixing said aqueous suspension with said aqueous emulsion; and

4) freeze drying the mixture to remove the water and the organic solvent, to obtain a lyophilized product comprising said assembly.

40. Method for preparing an assembly of claims 6 which comprises admixing a second component, bearing an overall net charge equal in sign with respect to the charge of the gas-filled microvesicles, to the assembly obtained according to any of the claims 35 to 39.

41. Use of an assembly according to any of the claims 1 to 29 for preparing a pharmaceutically active formulation.

42. A method for ultrasound diagnostic imaging which comprises administering a contrast-enhancing amount of an aqueous suspension of an assembly according to any of the claims 1 to 26.

43. A method of therapeutic treatment which comprises administering a therapeutically-effective amount of an aqueous suspension of an assembly as defined in any of the claims 1 to 26 further comprising a bioactive agent.

Abstract: Assembly comprising a gas-filled microvesicle and a structural entity which is capable to associate through an electrostatic interaction to the outer surface of said microvesicle (microvesicle associated component - MAC), thereby modifying the physico-chemical properties thereof. Said MAC may optionally comprise a targeting ligand, a bioactive agent, a diagnostic agent or any combination thereof. The assembly of the invention can be formed from gasfilled microbubbles or microballoons and a MAC having a diameter of less than 100 pm, in particular a micelle and is used as an active component in diagnostically and/or therapeutically active formulations, in particular for enhancing the imaging in the field of ultrasound contrast imaging, including targeted ultrasound imaging, ultrasound-mediated drug delivery and and other imaging techniques such as molecular resonance imaging (MRI) or nuclear imaging.

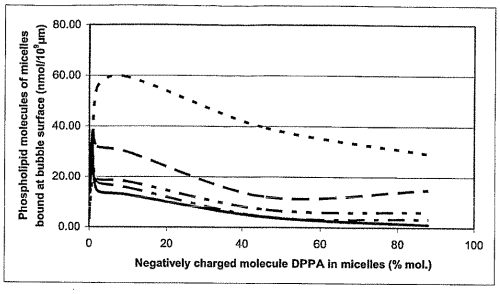


Figure 1

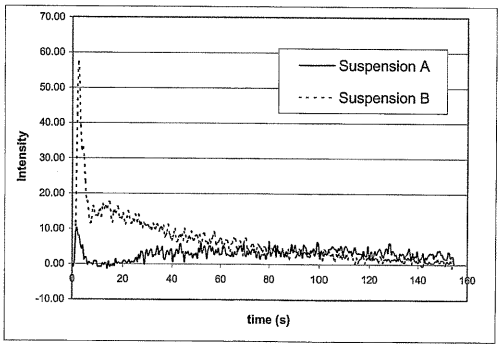
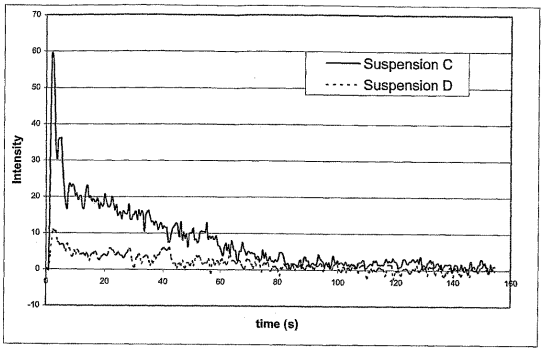


Figure 2

Figure 3



专利名称(译)	用于对比成像的气体封装的微囊泡组件		
公开(公告)号	JP2012051932A	公开(公告)日	2012-03-15
申请号	JP2011237685	申请日	2011-10-28
[标]申请(专利权)人(译)	博莱科瑞士股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	布拉科，Shuisu，兴业ANONYME		
[标]发明人	ミシェルシュナイダー フィリップビュサ フェンヤン アンヌセナント		
发明人	ミシェル·シュナイダー フィリップ·ビュサ フェン·ヤン アンヌ·セナント		
IPC分类号	A61K9/10 A61B8/00 A61B5/055 A61K49/00 A61K47/12 A61K47/32 A61K47/14 A61K47/18 A61K47/20 A61K47/26 A61K47/24 A61K41/00 A61K47/48 A61K49/22 A61K51/12		
CPC分类号	A61K47/6925 A61K41/0028 A61K49/225		
FI分类号	A61K9/10 A61B8/00 A61B5/05.383 A61K49/00.C A61K49/00.A A61K47/12 A61K47/32 A61K47/14 A61K47/18 A61K47/20 A61K47/26 A61K47/24 A61B5/055.383 A61K49/00 A61K49/06 A61K49/08 A61K49/12 A61K49/14 A61K49/18 A61K49/22 A61K50/00.200		
F-TERM分类号	4C076/AA16 4C076/AA17 4C076/AA19 4C076/DD01 4C076/DD41 4C076/DD44 4C076/DD49 4C076/DD63 4C076/DD67 4C076/EE02 4C076/EE41 4C085/HH07 4C085/HH09 4C085/JJ03 4C085/JJ20 4C085/KA07 4C085/KA36 4C085/KB42 4C085/KB45 4C085/KB52 4C085/KB60 4C085/KB67 4C085/KB74 4C085/KB75 4C085/KB78 4C085/KB82 4C096/AA11 4C096/AD19 4C096/FC14 4C601/DE06		
代理人(译)	品川EiSatoshi		
优先权	2003029534 2003-12-22 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种组件，其包括气体包封的微囊泡和结构实体（微囊泡的缔合组分，MCA），该结构实体能够通过静电相互作用与微囊泡的外表面缔合，从而改变微囊泡的理化性质。 要做。 MCA可任选地包含靶向配体，生物活性剂，诊断剂或其组合。 该组件可以由充气的微气泡或微气球和直径为100 nm或更小的MCA（尤其是胶束）形成，并用作诊断和/或治疗活性制剂的活性成分，尤其是靶向超声成像。 它用于增强超声造影成像领域的成像，包括超声介导的药物输送和其他成像技术，例如分子共振成像（MRI）或核成像。 [选型图]图1

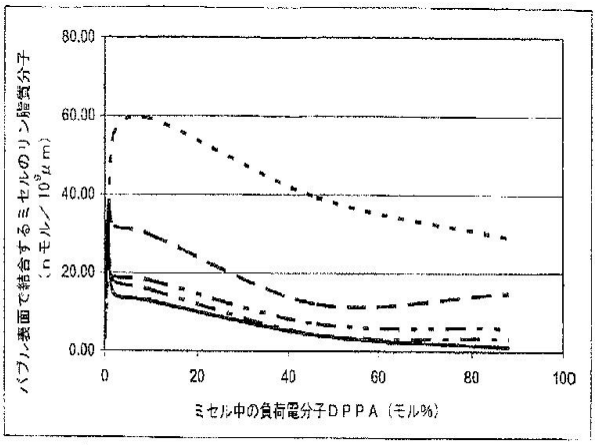


Figure 1