

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

**特表2006-510579****(P2006-510579A)**

(43) 公表日 平成18年3月30日(2006.3.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 49/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 49/00 C	4 C 0 7 6
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 K 9/50 (2006.01)</b>	A 6 1 K 9/50	4 C 0 8 5
<b>A 6 1 K 47/06 (2006.01)</b>	A 6 1 K 47/06	4 C 6 0 1
<b>A 6 1 B 8/00 (2006.01)</b>	A 6 1 B 8/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 32 頁)		

(21) 出願番号	特願2004-521673 (P2004-521673)	(71) 出願人	505012922 ターゲソン・エルエルシー
(86) (22) 出願日	平成15年7月11日 (2003. 7. 11)		アメリカ合衆国ヴァージニア州22903
(85) 翻訳文提出日	平成17年3月10日 (2005. 3. 10)		, シャーロットヴィル, カーリンズ・ウェ
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/021712		イ 850
(87) 国際公開番号	W02004/006964	(74) 代理人	100089705
(87) 国際公開日	平成16年1月22日 (2004. 1. 22)		弁理士 社本 一夫
(31) 優先権主張番号	60/395, 179	(74) 代理人	100076691
(32) 優先日	平成14年7月11日 (2002. 7. 11)		弁理士 増井 忠武
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100075270
			弁理士 小林 泰
		(74) 代理人	100080137
			弁理士 千葉 昭男
		(74) 代理人	100096013
			弁理士 富田 博行
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 マイクロバブル組成物およびその製法ならびに使用法

## (57) 【要約】

例えば、標的表面や基質への結合を容易にするために用いることができる、変形させた表面形態を導入した膜を有するマイクロバブルを含有した、マイクロバブル組成物が記載される。表面形態は非球形によるものであり、例えば鈍鋸歯状、折り畳み、突出状、あるいはしわ状等が挙げられ、マイクロバブル膜の変形性を増加することができる。かかるマイクロバブル組成物を標的化超音波コントラスト剤及びその方法論に導入することができる。変形マイクロバブル組成物の製造法は、球形膜を有するマイクロバブルを用意し、球形膜を上述したような非球形膜に変化させることを含む。球形から非球形への変化の前あるいは後に、標的化物質を膜に導入することができる。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

液体キャリアー中に、気体充填マイクロバブルを含む、標的に結合するマイクロバブル組成物であって；該マイクロバブルが実質的に鈍鋸歯状のマイクロバブル膜を有し；そして該マイクロバブル膜が標的に結合する標的結合分子を含む、前記マイクロバブル組成物。

## 【請求項 2】

該マイクロバブル膜が、脂質、タンパク質、ポリマーまたは他の界面活性剤あるいはこれらの組合せを含む、請求項 1 に記載のマイクロバブル組成物。

## 【請求項 3】

気体の実質的に血液に不溶である、請求項 1 に記載のマイクロバブル組成物。

## 【請求項 4】

気体がフッ素含有気体である、請求項 3 に記載のマイクロバブル組成物。

## 【請求項 5】

マイクロバブルが約 1 ～ 約 10 マイクロメートルの平均直径を有する、請求項 1 に記載のマイクロバブル組成物。

## 【請求項 6】

標的がレセプターであり、標的結合分子がレセプターに結合する、請求項 1 に記載のマイクロバブル組成物。

## 【請求項 7】

レセプターが細胞外マトリクスタンパク質、接着分子、レセプターに結合する G - プロテイン、細胞表面タンパク質、サイトカイン、糖タンパク、ペプチド、脂質、糖脂質、炭水化物またはこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 6 に記載のマイクロバブル組成物。

## 【請求項 8】

標的化分子がペプチド、擬ペプチド、アプタマー、タンパク質、抗体と抗体フラグメント、オリゴ糖、及び小さい有機分子からなる群から選択される、請求項 1 に記載のマイクロバブル組成物。

## 【請求項 9】

液体キャリアー中の、気体充填マイクロバブルの懸濁液を含む、標的に結合するのに有用なマイクロバブル組成物であって、該マイクロバブルが表面突起を有するマイクロバブル膜を実質的に有し、該マイクロバブル膜が標的に結合する標的結合分子をさらに含む、前記マイクロバブル組成物。

## 【請求項 10】

表面突起が膜の折り畳みを含む、請求項 9 に記載のマイクロバブル組成物。

## 【請求項 11】

マイクロバブル膜が脂質、タンパク質または界面活性剤を含み、マイクロバブルが約 1 ～ 約 10 マイクロメートルの平均直径を有する、請求項 9 に記載のマイクロバブル組成物。

## 【請求項 12】

気体の実質的に血液に不溶である、請求項 9 に記載のマイクロバブル組成物。

## 【請求項 13】

標的が細胞膜結合レセプターであり、標的結合分子がレセプターに結合する、請求項 12 に記載のマイクロバブル組成物。

## 【請求項 14】

標的化結合分子がペプチド、擬ペプチド、アプタマー、タンパク質、抗体と抗体フラグメント、オリゴ糖及び小さい有機分子からなる群から選択される、請求項 9 に記載のマイクロバブル組成物。

## 【請求項 15】

レセプターが細胞外マトリクスタンパク質、接着分子、レセプターに結合した G - プロ

10

20

30

40

50

テイン、細胞表面タンパク質、サイトカイン、糖タンパク、ペプチド、脂質、糖脂質またはこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 13 に記載のマイクロバブル組成物。

【請求項 16】

液体キャリアー中の、気体充填マイクロバブルの懸濁液を含む、標的に結合するのに有用なマイクロバブル組成物であって、該マイクロバブルが主に非球形マイクロバブル膜を有し、該非球形マイクロバブル膜が剪断応力下で、対応する球形マイクロバブル膜よりも高い変形度を示し、該マイクロバブル膜が標的に結合する標的結合分子を含む、前記マイクロバブル組成物。

【請求項 17】

マイクロバブル膜が脂質、タンパク質、ポリマーまたは他の界面活性剤またはこれらの組合せを含む、請求項 16 に記載のマイクロバブル組成物。

【請求項 18】

気体を実質的に血液に不溶である、請求項 16 に記載のマイクロバブル組成物。

【請求項 19】

マイクロバブルが約 1 ～ 約 10 マイクロメートルの平均直径を有する、請求項 16 に記載のマイクロバブル組成物。

【請求項 21】

標的が細胞膜結合レセプターであり、標的化分子がレセプターに結合する、請求項 16 に記載のマイクロバブル組成物。

【請求項 22】

マイクロバブルを標的に結合させる方法であって、請求項 1、9 及び 16 のいずれか 1 項に記載のマイクロバブル組成物に標的を接触させることを含む、前記方法。

【請求項 23】

マイクロバブル組成物のマイクロバブル膜がスパーサー腕により接着された標的化分子を含む、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

標的に向けられたマイクロバブル組成物の製造方法であって、  
液体キャリアーに懸濁され、球形マイクロバブル膜を有する、気体充填マイクロバブルを形成し；  
球形マイクロバブルを非球形マイクロバブルに変化させ；そして  
該マイクロバブル膜に、標的に結合する標的化分子を接着あるいは導入することを含む、前記方法。

【請求項 25】

標的化分子が、該変化より前に膜に接着あるいは導入される、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

標的化分子が、該変化より後に膜に接着あるいは導入される、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 27】

該変化が、球形マイクロバブル膜内からの気体の部分的放出を含む、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 28】

該変化が、球形マイクロバブル膜を圧力にかけることを含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

該圧力が、静水圧、超音波、またはマイクロバブル膜の浸透圧差により適用される、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 30】

標的化分子がペプチド、擬ペプチド、アプタマー、タンパク質、抗体と抗体フラグメン

10

20

30

40

50

ト、オリゴ糖、及び小さい有機分子からなる群から選択される、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 3 1】

請求項 1、9 及び 1 6 のいずれか 1 項に記載のマイクロバブル組成物を含む薬剤組成物であって、液体キャリアが薬学的に許容可能な液体キャリアである、前記薬剤組成物。

【請求項 3 2】

治療用組成物である、請求項 3 1 に記載の薬剤組成物。

【請求項 3 3】

診断用組成物である、請求項 3 1 に記載の薬剤組成物。

10

【請求項 3 4】

超音波造影剤である、請求項 3 1 に記載の薬剤組成物。

【請求項 3 5】

患者において超音波造影を行う方法であって：

患者に請求項 3 4 に記載の超音波造影剤を導入し；そして

該組成物を基準に超音波像を現像する

ことを含む、前記方法。

【請求項 3 6】

請求項 3 2 に記載の治療用組成物を患者に投与することを含む、患者の治療的処置を行う方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

〔関連出願〕

本出願は 2 0 0 2 年 7 月 1 1 日に出版された米国仮出願 N o . 60/395,179 の利益を請求し、ここにそのすべてを参考文献として組み込む。

【0 0 0 2】

〔政府の権利〕

本発明は政府認可番号 NIH T32 HL 07284-26 および R01HL 64381 の援助により行われた。政府は本発明に関して、幾分かの権利を有する。

30

【背景技術】

【0 0 0 3】

本発明は概してマイクロバブル組成物と方法に関し、特に特定の基質または物質に結合するよう標的化された (targeted) マイクロバブル組成物に関する。

さらに背景技術として、超音波研究の領域において、気体充填マイクロバブルがグレースケール及びドップラー超音波のコントラストを顕著に向上する。コントラストの増強は、マイクロバブルに取り込まれている気体とそれを取り巻く血液との音波のインピーダンスのずれに起因する。超音波変換器が放射する音波パルスは異なるインピーダンスを有する物質の界面で後方に反射 (後方散乱) されるが、インピーダンスのずれが大きいと超音波の後方散乱の割合が大きくなり、超音波の後方散乱の割合が大きくなるとより大きな超音波コントラストが達成される。超音波の音波パルスがマイクロバブルに当たるとバブルの気相の容積振動 (volumetric oscillation) が誘導される。この振動は高度に非線形であり、大きな後方散乱を起こすので、変換器アレイにより検出することができる (Forsberg 及び Shi, 2001)。マイクロバブルの振動により形成された後方散乱は、研究中の組織構造により形成されるものよりも数桁も大きくなりうる (Klibanov, 1999)。

40

【0 0 0 4】

超音波造影剤 (ultrasound contrast agents; UCA) としてのマイクロバブルの使用には、多くの臨床学的利用の可能性がある。例えば心臓解剖の視覚化 (Shubら、1976; Crouseら、1993)、器官または組織の灌流の評価 (Rimら、2001; Mulvaghら、2000)、および心筋の生存能力の評価 (Villanueva, 2000) 等が挙げられる。このような各応用法では自

50

由に流動するマイクロバブルを用いる；すなわち、マイクロバブルは研究中の組織に必ずしも付着したままでいるわけではない。自由に流動するUCAは組織レベルでの臨床学的関連情報を提供することができるが、関心のある部位に結合するマイクロバブルを生起させることで、分子スケールでの超音波イメージングが可能になりうる。マイクロバブルはバブルの外表面に標的化分子 (targeting molecule) を付けることにより、特定の分子に目標を定められることができる。これにより、生物活性物質を研究中の組織に送達することができるようになる他、かかる組織における非常に空間的に特定の部位に集まった病状の検出が可能になる。

#### 【0005】

マイクロバブル造影剤の効率に影響する要因は多い。心筋の造影のための静脈注射UCAの臨床的投与量は $10^9$ オーダーのマイクロバブルである (Gunda及びMulvagh, 2001)。しかしKlibanovら (1997) は、左心室の乳白化 (opacification) には、 $\text{mm}^3$  血液当たり僅か20マイクロバブルの投与量で充分であることや、平坦な面を僅か3%覆うだけでごく基本的な (ハーモニックのものではなく) 造影により検出可能な超音波シグナルを作ることができることを示している。この結果は、臨床的な超音波画像化は、低量のマイクロバブルで達成することができることを示唆している；しかし、超音波コントラストの度合いは標的部位におけるマイクロバブルの濃度に従い増加する。予想通り毛細血管閉塞を引き起こさずに体内に安全に注射できるUCAの量には上限がある。したがって安全と造影の解像度の最適なバランスは、精密に標的化された造影マイクロバブルを少数注射することにより達成できる。

#### 【0006】

標的化されたマイクロバブル組成物に関する従来技術は限られている。脂質及びタンパク質シェルのマイクロバブルの初期の観察により、肝臓 (Girardら、2001)、脾臓及び肺 (Waldayら、1994)、および再灌流心筋層 (reperfused myocardium) (Kellerら、1990; Villanuevaら、1997) への選択的な蓄積が示された。この現象は後に、流動が停滞している部位、例えば肝臓類洞 (Konoら、2001) にマイクロバブルが陥る (entrapment) こと、及び活性化した白血球によるマイクロバブルの食作用 (Lindnerら、2000) によることが明らかになった。近年の文献は、マイクロバブルシェルの組成を変えたり、マイクロバブル表面の抗体を固定することにより、ICAM-1 (Villanuevaら、1997; Wellerら、2003)、P-セレクチン (Lindnerら、2001)、及び活性化された白血球 (Lindnerら、2000; Christiansenら、2002) に標的化されたマイクロバブルにより、炎症の造影化の可能性を示している。血管形成、特に腫瘍の場合のものは、インテグリン  $\alpha_v\beta_3$  に標的化されたマイクロバブルを用いて研究されており (Leong-Poiら、2003; Ellegalaら、2003)、血栓は血小板レセプターGPIIb/IIIaに結合するマイクロバブルにより標的化された (Schumannら、2003)。さらに標的化されたマイクロバブルは、遺伝子 (Teupeら、2002; Porterら、2001) 及び薬剤 (Priceら、1998) の送達の目的で述べられている。

#### 【0007】

標的化されたマイクロバブル剤については、上述の文献よりも前に記載されている。例えば、米国特許No.6,264,917は、超音波と相互作用できるレポーター部分 (reporter moiety)、標的部位にアフィニティーを有する標的化ベクター (targeting vector)、及び標的化ベクターとレポーターとをつなぐリンカーから構成される診断用造影剤を記載している。米国特許No.6,245,318は、標的化ベクターをポリマースペーサー腕に固定化して標的部位に選択的に結合させることができるマイクロバブル構造物を開示する。標的基質に対する接着を増強する目的で1以上の標的化ベクターを導入することは米国特許No.6,331,289に記載されている。また、標的化されたマイクロバブルは生物活性送達スキーム、例えば米国特許No.6,443,898において暗示的に述べられている。標的化された組織に生物活性基質を送達するため、マイクロバブルの破壊を利用することは、米国特許No.6,416,740の音波に活性な薬剤送達系において記載されている。

#### 【0008】

発行された先行技術の詳細な研究は、以下のことを示す：上述の標的化マイクロバブル

スキームのいくつかは、*in vitro*及び*in vivo*の両方で標的部位におけるマイクロバブルの蓄積を達成できるものの、いずれの処方でも高レベルの非特異的な接着が起こる。例えば、血管炎症タンパク質に標的化された脂質シェルマイクロバブルは、*in vitro*及び*in vivo*の炎症組織と比較して、非炎症対照の条件下においておよそ0.2 (Wellerら、2003) ~ 0.3 (Lindnerら、2001) 倍の接着を示す。マイクロバブルに部分的に指図する (dictates) 標的化分子 (ターゲティング分子; targeting molecule) の選択をしたとしても、この方法にはマクロバブルの標的結合アフィニティー、形態学的な (topographical) 表面の特徴及び機械的構造が重大 (critical) である。平坦な基質に対する自由流動粒子の接着の生物物理学は、例えば血管内皮に対する白血球の接着などに関して深く研究されている。白血球の接着に関する生体内での観察の初期には、球形の白血球は変形可能 (deformable) になり、かつ内皮への接着に際して涙型の輪郭になると想定されることを報告しており (Atherton及びBorn, 1972,; Firrel及びLipowsky, 1989)、最近の研究では白血球の形態 (Fingerら、1996) や変形可能性 (deformability) (Parkら、2002; Yagoら、2002) が白血球の接着プロセスにとって重要であることを確認している。上述の生物学的过程と同様に、血管内のマイクロバブルの標的部位への接着は、より効率的な接着メカニズムを達成できるようにマイクロバブル構造を逃えることにより、増強することができる。最近の発明は標的化された治療用及び/又は診断用マイクロバブル組成物及びその調製法及び代替スキームの使用法について記載する。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0009】

したがって、一の側面において、本発明は、非球形膜を有するマイクロバブルを有し、標的化された表面または基質に対して、対応する球形マイクロバブルと比較して大きな結合能力を示す、マイクロバブル組成物を提供する。一の態様において本発明は、液体キャリアー中の、気体充填マイクロバブルを含む、標的に結合するマイクロバブル組成物を提供する。組成物中のマイクロバブルの実質的な割合 (すなわち少なくとも約20%) は、鈍鋸歯状 (crenated) マイクロバブル膜を有しており、ここで膜はさらに標的に結合する標的化分子を含んでいる。

【0010】

もう一つの態様において、本発明は、気体充填マイクロバブルの液体キャリアー中の懸濁液を含む、標的に結合するのに有用なマイクロバブル組成物を提供し、ここで実質的な割合のマイクロバブルは突起状表面と標的に結合する標的化分子とを有している。

30

【0011】

もう一つの態様において、本発明は、液体キャリアー中のマイクロバブル懸濁液を含む、標的に結合するのに有用なマイクロバブル組成物を提供し、ここで実質的な割合のマイクロバブルは非球形マイクロバブル膜を有し、気体核の表面積に対して過剰な表面積を保持している。非球形マイクロバブル膜は標的に結合する標的化分子を有し、流体の剪断応力下において対応する球形マイクロバブル膜よりも大きな変形性を示す。

【0012】

本発明の他の態様は、超音波造影剤に関し、上述したような鈍鋸歯形状、突起形状または非球形状の輪郭を有する膜を有するマイクロバブル組成物と薬学的に許容可能な液体キャリアーを含む。かかる造影剤を使用する超音波造影法も提供される。

40

【0013】

本発明の他の態様は、標的化されたマイクロバブル組成物の製造方法に関する。この方法は液体キャリアー中に懸濁させた、球形マイクロバブル膜を有する気体充填マイクロバブルを形成し、球形マイクロバブル膜を非球形マイクロバブル膜に変化させ、そしてマイクロバブル膜に標的に結合する標的化分子を導入する。

【0014】

本発明の他の態様は、本発明のマイクロバブル組成物を利用する治療法、診断法及び抽出方法を含む。

50

さらなる態様及び本発明の利点は、ここに記載する事項から明らかであろう。

【0015】

本発明の原理の理解を促進する目的で、以下の記載及び実施例の中に好適な態様を例示し、それらを説明するために特定の用語を使用することがある。しかしながらそのことにより本発明の範囲を限定するものと理解するべきではなく、本発明の好適な態様における変更やさらなる修正及び本発明の原理のさらなる応用は、本発明に関連する当業者には通常起こることであろうと企図する。

【0016】

上述したように、本発明は修飾した表面形態を導入した膜を有し、例えば標的表面や基質に容易に結合させるのに有用なマイクロバブル組成物を提供する。表面形態は、鈍鋸歯状、折り畳み状、突起状、およびしわ状などの非球形のものとし、これによりマイクロバブル膜の変形性を大きくすることができる。このようなマイクロバブル組成物は標的化された超音波造影剤およびその方法論に導入することができる。修飾マイクロバブル組成物の製造法は、球形表面膜を有するマイクロバブルを用意し、そして球形膜を上述したような表面形態を有する非球形膜に変化させることを含む。標的化基質は、球形から非球形形態への変化の前あるいは後に膜に導入するかあるいは接着することができる。

10

【0017】

膜形成物質に議論を転換すると、多種多様の物質が知られており、本発明のマイクロバブル組成物を製造するのに用いることができる。例えば、気相と液相の間の界面に層を形成することによって、バブル膜または殻の形成および維持の助けとなる化合物または組成物であれば何でも用いることができる。界面活性剤は、単一の化合物あるいはこれら化合物の任意の組合せ（例えば共界面活性剤 [co-surfactant]）を含む。好適な界面活性剤は脂質であり、ステロール、炭化水素、脂肪酸およびその誘導体、アミン、エステル、スフィンゴ脂質、およびチオール脂質（それぞれが単独でマイクロバブル殻を構成するかあるいは他の脂質、リン脂質、界面活性剤および洗剤との混合物で用いられる）、非イオン性界面活性剤、中性またはアニオン性界面活性剤およびこれらの混合物を含む。

20

【0018】

適切な界面活性剤として例えばポリオキシプロピレンポリオキシエチレン共重合体、糖エステル、脂肪アルコール、脂肪族アミノオキシド、ヒアルロン酸脂肪族エステル、ヒアルロン酸脂肪族エステルの塩、ドデシルポリ（エチレンオキシ）エタノール、ノニルフェノキシポリ（エチレンオキシ）エタノール、ヒドロキシエチルデンプン、ヒドロキシエチルデンプン脂肪酸エステル、デキストラン、デキストラン脂肪酸エステル、ソルビトール、ソルビトール脂肪酸エステル、ゼラチン、血清アルブミンおよびこれらの組合せが挙げられる。

30

【0019】

リン脂質含有界面活性剤組成物として、レシチン（すなわちホスファチジルコリン）、例えば卵白レシチン、大豆レシチンなどの天然レシチン、半合成（例えば部分的あるいは全水素化）レシチン、およびジミリスチルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、またはジステアロイルホスファチジルコリンなどの合成レシチン；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；ホスファチジルグリセロール；ホスファチジイノシトール；カルジオリピン；スフィンゴミエリン；上述のフッ素化類似体；上述の混合物およびコレステロールなどの他の脂質との混合物が挙げられる。個々に正味全体電荷（例えば負電荷）を示す分子を支配的に（例えば少なくとも75%）含むリン脂質を用いることができ、例えば天然のもの（例えば大豆または卵白由来のもの）、半合成のもの（例えば部分的または全体に水素化されたもの）および合成のホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジイノシトール、ホスファチジン酸及び/又はカルジオ脂質などである。

40

【0020】

非イオン性界面活性剤の例として、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマーが挙げられる。かかるクラスの化合物として、非イオン性プルロニック界面活性剤が

50

挙げられる。ポリオキシエチレン脂肪酸エステルも用いることができ、例えば、ポリオキシエチレンステアレート、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、グリセロールポリオキシエチレングリコールオキシステアレート、グリセロールポリエチレングリコールリシノレエート、エトキシ化大豆ステロール、エトキシ化ひまし油、およびこれらの水素化誘導体およびコレステロールが挙げられる。アニオン性界面活性剤、特に 12 ~ 24 の炭素原子を有する脂肪酸（またはその塩）、例えばオレイン酸、またはそのナトリウム塩を用いることもできる。

#### 【0021】

界面活性剤に加えて、水相内に他の薬剤を導入することもできる。かかる薬剤として伝統的な粘度調節剤、リン酸緩衝液あるいは他の伝統的な生物適合性緩衝液などの緩衝液、または酸、塩基などの pH 調節剤、浸透圧調節剤（等張性、高浸透圧性（hyperosmolarity）または低浸透圧性（hyposmolarity）を提供する）が挙げられる。好ましくは、溶液は pH 約 7 を有し等張である。マイクロバブルは疎水性ポリマーのブラシ、例えばポリオキシエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、またはポリグリセロールなどで覆われていてもよく、これによりマイクロバブルの物質または基質に対する非特異的接着を低減することができる。

10

#### 【0022】

マイクロバブルの核に使うことができる気体については、生物適合性の気体であれば何でも用いることができる（混合物を含む）。したがって気体として、空気；チッ素；酸素；二酸化炭素；水素；ヘリウム、アルゴン、キセノン、またはクリプトンなどの不活性気体；サルファーヘキサフルオライド、ジサルファーデカフルオライドまたはトリフルオロメチルサルファーペンタフルオライド等のサルファーフルオライド類；セレンウムヘキサフルオライド；メチルシランまたはジメチルシランなどの任意にハロゲン化されたシラン；低分子量炭化水素（例えば 7 までの炭素原子を含有する）、例えばメタン、エタン、プロパン、ブタンまたはペンタンなどのアルカン、シクロプロパン、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、エチレン、プロペン、プロパジエン、またはブテンなどのアルケン、またはアセチレンまたはプロピンなどのアルキン；ジメチルエーテルなどのエーテル；ケトン；エステル；ハロゲン化低分子量炭化水素（例えば 7 までの炭素原子を含有する）；またはこれらの混合物が挙げられる。ハロゲン化された気体の少なくともいくつかのハロゲン原子はフッ素原子であることができ；このようにして生物適合性ハロゲン化炭化水素気体を、例えばブromoklorodifluorometan、klorodifluorometan、ジklorodifluorometan、ブromotrifluorometan、klorotrifluorometan、kloropentafluoroeetan、ジklorotetrafluoroeetan、klorotrifluoroeエチレン、フルオロエチレン、エチルフルオライド、1, 1 - ジフルオロエタンおよびパーフルオロカーボン、例えば塩化メチレン、パーフルオロアセトンなどのフッ素処理した（例えば過フッ素化した）ケトン、およびパーフルオロジエチルエーテルなどのフッ素処理した（例えば過フッ素化した）エーテルから選択することができる。過フッ素化した気体、例えばサルファーヘキサフルオライドおよびパーフルオロプロパン、パーフルオロブタンおよびパーフルオロペンタンなどのパーフルオロカーボンの使用は、このような気体を含有するマイクロバブルの、血流中で認識されている高い安定性の観点から特に有利である。

20

30

40

#### 【0023】

マイクロバブル組成物の形成に関して、種々の適切な方法が知られている。マイクロバブルの形成には音波処理、すなわち超音波伝達セプタムを通じて、または超音波で振動させる皮下注射針からなる超音波プローブをセプタムに貫通させることによって処理することが好適である。場合によりマイクロバブルが形成される水性媒体中で気体（または気体混合物）の存在下でプローブタイプのソニケータを直接作用させるか、あるいはブレンダーまたはミリング/ミキシングなどの他の高速混合技術により、大容積のマイクロバブルを製造することができる。気体注入（例えばベンチュリ管気体注入）などの他の技術、機械的高剪断バルブ（またはダブルシリンジ針）と 2 本のシリンジ、またはシリンジ上のアス

50



ピレータアセンブリなどの機械的形成、あるいは単なる振とうが用いられる。マイクロバブルは界面活性剤溶液中に高圧で導入された修飾気体で過飽和された液体浸透薬剤 (a liquid osmotic agent) エマルジョンの使用を通じて形成することもできる。

#### 【0024】

音波処理をマイクロバブルの形成に用いる場合、色々な方法で行うことができる。例えば、界面活性剤溶液とバイアルの上部空き高に気体を含むバイアルを薄膜により音波処理することができる。膜は、例えばゴム、テフロン、マイラー、ウレタン、アルミニウム処理されたフィルム、あるいは他の音波透過性の合成または天然ポリマーフィルムまたはフィルム形成物質で作られていてよい。音波処理は、超音波プローブまたは集束超音波ビームを膜に接触させるかあるいはこれらで膜を押すことによって行うことができる。超音波プローブは使い捨てのものであってよい。いずれの場合であってもプローブは膜に接して置かれ、あるいは膜を通じて液体の中に挿入されてよい。音波処理が終わると、マイクロバブル溶液をバイアルから取り出し、患者に配る。音波処理は、シリンジ状の低エネルギー超音波振動吸引アセンブリを用い、インクジェットプリンタと同じようにシリンジ中で行うこともできる。また、シリンジまたはバイアルを、エネルギーを容器中のある部分に集束させた低エネルギー超音波浴に設置することもできる。

10

#### 【0025】

本発明のある態様において、標的化されたマイクロバブル組成物が提供される。かかる標的化されたマイクロバブル組成物はマイクロバブル膜に含有されたあるいは結合されたりリガンドまたは標的化分子を有するマイクロバブルを含み、リガンドまたは標的化分子は標的の表面または物質に、場合により特異的に結合する。用いられる標的化分子の例として、例えば

20

i) 抗体及び抗体フラグメント、高い特異性と高いアフィニティを有する抗体を含む。従来の及び/又は遺伝子学的に設計された抗体を利用することができる。マイクロバブル組成物のヒトへの使用にはヒト抗体が用いられ、標的化分子に対して起こりうる免疫反応を回避しまたは減じることができる。

ii) 細胞接着分子、そのレセプター、サイトカイン、成長因子、ペプチドホルモン、ペプチド擬似物及びこれらの断片。

iii) 非ペプチドアゴニスト/アンタゴニストまたは細胞接着分子、サイトカイン、成長因子及びペプチドホルモンのためのレセプターの非生物活性バインダー。

30

iv) オリゴヌクレオチド及び修飾オリゴヌクレオチド、ワトソン-クリックまたは他の型の塩基ペアにより、DNAまたはRNAに結合するアプタマーを含むがこれに限定されない。

v) プロテアーゼ基質/阻害剤。プロテアーゼは多くの病理学的状態に関与する。

vi) 種々の小さい分子、種々の生物学的レセプターに結合しうることが知られている生物活性化合物を含む。

vii) 基質の結合パートナーとしての不活性化されたプロテアーゼ。

#### 【0026】

標的化超音波造影に特定の関係のある他のペプチド標的化分子及びそれらの脂肪ペプチドは、ペプチドに結合するアテローム性動脈硬化症プラーク; ペプチドに結合する血栓、及びペプチドに結合する血小板を含む。

40

#### 【0027】

診断薬及び/又は治療薬として使用される、特定のタイプの標的及び意図する領域に標的化されていてもよい標的化分子基質の例としてCD34、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、E-セレクチン、P-セレクチン、PECAM、CD18インテグリン、VLA-1、VLA-2、VLA-3、VLA-4、VLA-5、VLA-6、GlyCAM、MAdCAM-1、フィブリン、及びミオシンが挙げられる。かような他、及び他の標的化分子は米国特許No.6,264,917に同定され議論されており、このような他の有用な標的化分子を一般的にかつ特定の同定する目的のためにここに参考文献として組み込む。

#### 【0028】

50

標的化分子の膜への接着は様々な方法にて達成することができる。例えば、標的化分子化学結合剤（例えばカルボジイミド（EDC）またはチオプロピオネート（SPDP））を用いて直接つなげることができる。しかし好ましくはスペーサー腕分子を通じて標的化分子を間接的にマイクロバブル膜に接着させる。例示すると接着した構造は以下のように表せる：

M - S - V

ここでMはマイクロバブル膜、Sはスペーサー腕、及びVは標的化分子である。

【0029】

本発明に使用されるスペーサー腕（S）は、分枝状あるいは線状合成高分子または生体高分子であり、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリビニルピロリドン、ポリオキシエチレン、ポリビニルピリジン、ポリビニルアルコール、ポリグリセロール、デキストラン、及び糖などが挙げられる。スペーサー腕分子の一端は気-液界面に挿入され、柔軟なポリマースペーサー腕は液体媒体の中に伸長し、標的化分子と標的との相互作用を向上させるであろう。

【0030】

本発明に使用される標的化分子は、例えば、上述した任意のものであることができる。標的化抗体または他のタンパク質のマイクロバブルへのスペーサー腕分子を介した接着のために多くの戦略をとることができる。例えば、スペーサー分子は、マイクロバブル膜に接着するか取り込まれる一端と、そして標的化分子に直接的にまたは最終的に接着するための反応基または他の結合基を有するもう一端を有してよい。一つの戦略としてはアビジン-ビオチン架橋法に基づくものが挙げられる。スペーサー分子は、例えばPEGは、一端に接着したビオチンと、もう一端に接着し、膜アンカーを形成するマイクロバブル膜形成分子（例えばリン脂質）を有する。膜アンカーはマイクロバブル膜に取り込まれ、スペーサー腕-ビオチンサイトが液相に伸長したままになる。そしてアビジンはスペーサー腕-ビオチンサイトに結合し、そしてアビジンの自由結合サイトがビオチン化抗体または他の標的化分子のスペーサー腕への結合に用いられる。このようにアビジン-ビオチンの組合せは、任意の所望のビオチン化抗体が後で接着されるような、特異的な標的化の用途のための普遍的な薬剤を提供することができる。さらに金属キレート分子をマイクロバブル表面に接着させることもでき、His標識をつけた組み換えタンパク質の接着は、既知の標準的なカップリングスキームを用いて直ちに達成することができる。スペーサー腕分子を介した標的化分子のマイクロバブル膜へかような及び他の接着方法は既知であり、本発明に使用することができる。他の情報を見つけることができ、例えば米国特許No.6,245,318があり、ここに参考文献として組み込む。

【0031】

本発明に従うマイクロバブルは、多くの方法により非球形にすることができる。一般にマイクロバブル中にとらえられている気体の体積を減少させると同時にマイクロバブルの膜物質の量を同じあるいは実質的に同じに保つことにより、球形のマイクロバブルを修飾して非球形マイクロバブルにすることができる。結果として気体の核を包むのに必要とされるよりも多くの、過剰の膜物質が生じ、この過剰の膜物質はマイクロバブルに当初の球形マイクロバブル（大きいサイズのもの）と比べて、及び等しいサイズの非球形マイクロバブルと比較してもかなりの変形度をもたらす。標的基質への接着に際して、この過剰な膜物質により、球形マイクロバブルと比較してより大きなマイクロバブル基質接触面積の形成が可能となる。過剰の物質は典型的にはマイクロバブル膜から突出部を形成し、これを鈍鋸歯状、折り畳み、しわあるいは他のでこぼこ（irregularities）等と記載することができる。球形マイクロバブルから非球形マイクロバブルを調製するときに、マイクロバブル内部から気体を除去するために静水圧または他の方法を望ましくは適用し、少なくとも約10%の気体、より好ましくは少なくとも約20%の気体を球形マイクロバブル内部から除去して非球形マイクロバブルに変化させる。典型的には、かかる方法は球形マイクロバブルから約10%～80%、より典型的には約20%～70%の範囲の中心気体を除去するために使用されるであろう。さらにかかる方法は気体核の減少を以下のようなレベ

ルで達成するように適用することができる：元の球形マイクロバブル群のうち少なくとも約20%のマイクロバブル、好ましくは約50%より多く、さらにより好ましくは約80%～100%の範囲。所望であればかかる方法の結果物である球形/非球形混合マイクロバブル群を処理して非球形マイクロバブルから球形マイクロバブルを分離して、そしてより濃縮させた非球形マイクロバブル群を達成することができる。

#### 【0032】

例として、球形マイクロバブルに圧力、例えば密閉した容器内での静水学的圧力をかけることにより非球形マイクロバブルを調製することができる。かくして表面に直接または間接的に接着した標的化分子を含有してもよいマイクロバブルは水相に分散されそして三方コックを備えた容器（例えばシリンジ）に入れられる。三方コックを閉じシリンジのピストンを部分的に押し、単位当たりの内部圧力を増加させる（1 - 20 psi）。圧力は容量全体にわたって均一に伝わり、かくしてマイクロバブル内部に加圧がかかり、そして気体容量の減少が起こる。過剰のマイクロバブル殻は気液界面の平面から水相に向かって突き出て、折り畳み/フラップ状の形態の鈍鋸歯状の不規則性を形成する。材料を約5～100秒間高い圧力でインキュベートし、その間、加圧下のマイクロバブル気体は部分的にマイクロバブルから外に発散し、そして周囲の媒体に溶解し、これにより、プランジャーを解放した後も永続的にマイクロバブル全体の容量の減少が起こり、そしてマイクロバブルは大気圧条件に戻っていく。

10

#### 【0033】

鈍鋸歯状のマイクロバブルは、まず水溶性気体と水不溶性（漸次移行する溶解性、[例えばデカフルオロブタンと空気など]を含めて）気体を含有する気体混合物から球形マイクロバブルを調製することによっても調製することができる。マイクロバブルが分散される水性媒体はまず、例えば減圧することにより脱気され、あるいは好ましくは不溶性気体と共に散布して溶解性気体を媒体から除去する。すると、脱気された媒体にマイクロバブルを分散させると、カプセル化したマイクロバブルの容量が、溶解性気体がバブルの内側から媒体へ追い出されるに従って減少し、そして膜表面の鈍鋸歯状形態が発生する。あるいは溶解性-不溶性気体混合物から調製されたマイクロバブルの分散液に不溶性気体を直接散布すると、バブル内部の溶解性気体の損失と容量の減少及び鈍鋸歯状形状の形成が起こる。場合により、マイクロバブル薬剤を患者の血流に注射した後に鈍鋸歯化方法、例えばマイクロバブルを超音波放射をかけるなどを行ってもよい。

20

30

#### 【0034】

本発明のマイクロバブル組成物は実質的なパーセンテージの（すなわち約20%以上）の非球形マイクロバブルを有するよう調製されるのが非常に望ましいだろう。より好ましくは、本発明のマイクロバブル組成物は支配的に（すなわち約50%以上）の非球形マイクロバブルを、さらに好ましくは約80%以上、本質的に100%の非球形マイクロバブルを含有する。このような濃厚非球形マイクロバブルは、マイクロバブル組成物の調製に従来用いられていた技術により、及び/又はその後施される精製技術により発生させることができる。さらに本発明のマイクロバブル組成物は、実質的に均一のマイクロバブルサイズ分布を有する。例えば、組成物は少なくとも約30%、好ましくは少なくとも約50%の非球形マイクロバブルが約3マイクロメートル（ミクロン）の群平均直径を有するよう調製され及び/又は精製される。さらに、組成物中の約30%、より好ましくは少なくとも50%の非球形マイクロバブルは約1～7マイクロメートルの範囲内の直径を有してよい。

40

#### 【0035】

標的化分子（例えば抗体）は、マイクロバブルを非球形にする操作の前、最中、あるいは後のいつでもマイクロバブルに接着することができると理解されるであろう。

スパーサー腕の接着した標的化分子と変形可能な非球形（例えば、鈍鋸歯状、しわ状、折り畳み状など）膜の両方を有するマイクロバブルは、標的化したものが表面に結合するときに特に優位性を示す。標的化分子が標的に結合する能力は、結合部位のレセプターの構造を適応させる膜の変形性とスパーサー腕の柔軟性の両方により増強される。

50

## 【0036】

本発明のマイクロバブル組成物は経口のあるいは非経口投与のための診断用組成物または治療用組成物などの薬学的組成物に処方することができ、そしてin vitroの造影法、送達法または分離法他のために使用することもできる。超音波造影法での使用のために、かかる組成物は投与のタイプに適切となるよう意図された従来の薬学的キャリアー及び賦形剤を伴う超音波剤の有効量を含有することができる。非経口用組成物は直接投与されるかあるいは全身用投与のための大量の非経口用組成物と混合することができる。このような溶液は薬学的に許容可能な緩衝液と、場合により塩化ナトリウムなどの電解質を含有してもよい。

## 【0037】

本発明の診断用組成物は超音波造影において所望の増強を達成できる有効投与量で投与されるだろう。かかる投与量は非常に広く、特定の患者、造影法に賦される臓器や組織、造影方法、使用される造影機器などに依存しうる。本発明の診断用組成物は従来の方法でを使用することができる。組成物を患者、典型的には温血動物に、全身的または造影する臓器または組織に局所的のいずれかにより投与し、そして患者は造影法に賦される。例として、標的化分子のレセプターが管表面に存在する任意の臓器の超音波造影を本発明に従って行うことができる。

## 【0038】

本発明の治療用組成物は患者に送達すべき少なくとも1つの活性薬剤、例えば治療用薬剤、例えば薬剤物質を含むだろう。かかる組成物は任意の好適な経路で、例えば経口または非経口投与により、局所的または全身的に送達されうる。この目的のために使用できる物質の例として、例えば米国特許No.6,264,917に開示されたものが挙げられ、かかる使用可能な薬剤物質を一般的にあるいは特定の特定の目的のために、ここに参考文献として組み込む。

## 【0039】

本発明のマイクロバブル処方薬の製造における使用のためにキットを作成することができる。かかるキットはマイクロバブルを形成するための上述の気体（単数または複数）を封じ込めた容器、液体及び膜形成界面活性剤とを含有する。容器は、調製された球形マイクロバブル組成物に静水圧をかけるための器具、例えばシリンジなどを場合により含有していてもよい。あるいは容器は気体（単数または複数）及び界面活性剤及びマイクロバブルを形成するために加えることのできる液体を含有することができる。さらに界面活性剤は容器中で他の物質とともに存在していてもよく、マイクロバブルを形成するために液体のみが加えられる必要がある。マイクロバブルを形成するのに必要な物質が既に容器内に存在するならキットの他の部品によりパッケージされることができ、好ましくは一つの形態に、あるいはキットの他の部品とすぐに組み合わせることができるよう調整された形態でパッケージされる。

## 【0040】

本発明のマイクロバブル組成物は親和力分離試薬（affinity isolation reagents）としても使用でき、例えば水または他の液体媒体中での、通常のまたは人工的重力場におけるマイクロバブルの上方への易動性に基づいたものである。そのように使用する場合組成物は、例えば環境的試料や生物学的液体または他の試料から標的物質または実体（entity）（例えば細胞、微粒子）を濃縮することができる。

## 【0041】

本発明のさらなる理解、及び態様と優位性を促進するために、以下の実施例を提供する。この実施例は例示的なものであり、本発明を制限するものではないと理解されたい。

## 【実施例】

## 【0042】

## [ 実験部 ]

## セクション1：材料及び方法

## 1.1 試薬

10

20

30

40

50

P - セレクチン F c 融合タンパク質 ( P - セレクチン . F c ) を凍結乾燥形にて R&D Systems ( Minneapolis, MN ) より得た。凍結乾燥されタンパク質 7 5 0  $\mu$  g を Dulbecco のリン酸緩衝液 ( DPBS ) ( Invitrogen, UK ) 1 5  $\mu$  L に溶解して P - セレクチン . F c の部分試薬を作成し、これを液体窒素中で凍結し、4 ヶ月未満 - 2 0 で保存した。ビオチン化の前にアンチ - P - セレクチン抗体 Rb40.34 ストックを 10,000 ダルトン MWC0 透析カートリッジ ( Pierce, Rockford, IL ) を用いて DPBS 中で一昼夜透析した。抗体 - マイクロバブル架橋系のための N-ヒドロスクシンイミド - ビオチン ( NHS-ビオチン ) とストレプトアビジンを Sigma ( St. Louis, MO ) から得た。ユーロピウムラベルしたストレプトアビジンと DELFIA 溶液を Wallac Oy ( Turku, Finland ) から得た。抗体濃度を測定するためのアドバンストタンパク質アッセイ試薬を Cytoskeleton, Inc ( Denver, CO ) から得た。流フローチャンバー ( flow chamber ) 実験における非特定の接着を防止するための TBS 中のブロッカーカゼインを Pierce ( Rockford, IL ) から得た。Tween-20 を J.T.Baker ( Phillipsburg, NJ ) から得た。Coulter 容器用の希釈剤としての Isoton-II を Beckman Coulter ( Miami, FL ) から得た。Kimura ( 0 . 0 5 % wt/vol トルイジンブルー、2 2 % エタノール中 0 . 9 % NaCl、及び 0 . 0 7 M リン酸緩衝液、pH 6 . 4 : 全て Sigma ( St. Louis, MO ) より ) を血液カウントにおける白血球の変色に用いた ( Olsem ら、2001 ) 。

10

#### 【 0 0 4 3 】

##### 1 . 2 逆平行板型フローチャンバー

in vitro での接着能の実験は、平行板型フローチャンバー ( GlycoTech, Rockville, MD ) にて行った。上板と下板の間の距離はガasketの厚みから測定し、0 . 2 5 4 mm で、フローパス幅は 2 . 5 cm であった ( ガasket " B " ) 。P - セレクチン . Fc 基質をおいた 3 5 mm 直径のポリスチレン皿 ( Corning, Corning, NY ) がフローチャンバーの上板の役割をした。マイクロバブルの浮力のため、特別に誂えたホルダーを用いてフローチャンバーを逆さに用いた。減圧と周囲に巻くゴムバンドにより皿をフローチャンバーの上にしっかりと置き、フローチャンバー全体を逆さにしたホルダーに挿入した。吸い込み状態にあるシリンジポンプ ( Harvard Apparatus, Cambridge, MA ) を用いてマイクロバブル分散液を吸引して規定の切断速度でフローチャンバーに通した。実験は Leitz Laborlux I 顕微鏡 ( Rockleigh, NJ ) で一部エピ蛍光剤 ( epifluorescence ) を使用し、4 0 倍の対物レンズ ( Olympus, Tokyo, Japan ) で視覚化した。フローチャンバー実験から得られたデータをその後のオフライン分析のために標準的な VHS カセット ( Sony, Tokyo, Japan ) またはデジタルビデオカセット ( Sony, Tokyo, Japan ) に記録した。逆平行板型フローチャンバーの線図を図 1 に示す。

20

30

#### 【 0 0 4 4 】

##### 1 . 3 マウス

5 匹の雄の C57B1/6 と、P - セレクチンノックアウトマウス ( P- / ) を Hilltop Labs ( Scottsdale, PA ) から入手し、U . Va の小さな動物施設にて飼った。全てのマウスは生後 8 ~ 1 2 週で見たところ健康だった。全ての動物実験はバージニア大学動物保護及び利用委員会制度 ( institutional animal care and use committee ) により承認されたものである ( プロトコル # 2 4 7 4 ) 。

#### 【 0 0 4 5 】

40

##### 1 . 4 抗体のビオチン化

ハイブリドーマから得た Rb40.34 上清を DPBS 中 4 で一昼夜透析した。各々 2 mg のモノクローナル抗体 ( mAb ) をビオチン化するために 4 5  $\mu$  g の NHS ビオチンを 1 0  $\mu$  L DMSO に溶解した。混合物を 2 時間 4 でインキュベートし、次いで一昼夜透析し結合しなかったビオチンを除去した。

#### 【 0 0 4 6 】

##### 1 . 5 P - セレクチンの吸着

3 5 mm のポリスチレン皿をメタノールで洗浄し、P - セレクチン . Fc タンパク質の装着の前に空気中で乾燥させた。各洗浄済みの皿の中心に、全ての皿について同じ円のテンプレートを用いて 1 cm 直径の円をフェルトペンで描いた。P - セレクチン . Fc 融合

50

タンパク質の必要重量 (25, 150 または 250 ng) を DPBS で 200  $\mu$ L に希釈し、皿の円を描いた部分に吸着させた。次いで皿を用意した蓋とぬらしたペーパータオルで覆い過剰な蒸発を防いだ。結合は一昼夜4で行った。その後皿をDPBS中0.05%のTween-20で5回洗浄し、結合しなかったタンパク質を除去した。皿表面への非特定のな接着を防ぐため、皿をTBSに2mLのカゼインを溶解したもので少なくとも2時間室温でインキュベートしてブロックした。全ての皿をブロックし、そして同じ日に使用し、フローチャンバー中で適切に封できない欠陥のある皿は廃棄した。負の対照として幾つかのブロックした皿を1.0mLのDPBS中の1.0mg Rb40.34で少なくとも30分間インキュベートし、0.05% Tween-20で5回洗浄した。あるいは幾つかの皿はP-セレクトイン・Fcの代わりにカゼインでインキュベートし、次いで洗浄し、ブロックした。

10

#### 【0047】

##### 1.6 マイクロバブルの調製

本実験で使用したマイクロバブルはジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC) の脂質殻でデカフルオロブタン ( $C_4F_{10}$ ) 気体核をカプセル化したものである。ポリエチレングリコール (PEG) のブラシで脂質殻の周りを取り囲んだ。ビオチン化  $C_4F_{10}$  充填マイクロバブルを前記されたとおり (Kimら、2000; Lindnerら、2001) 調製した。簡単に述べると、 $C_4F_{10}$  気体をホスファチジルコリン、PEGステアレート、及びビオチン-PEG-DSPCの水性分散液に高出力ソニケーションにより分散させた。これにより脂質-カプセル化された  $C_4F_{10}$  マイクロバブルが形成した；マイクロバブルに取り込まれなかった脂質を遠心浮遊法を繰り返して除去した。2つのマイクロバブルの群を調製した：蛍光プローブ (Di-0またはDi-1) を脂質殻に取り込んだ、蛍光ラベルしたものと、ラベル化していないものである。それぞれのマイクロバブル群を別々に4で2ヶ月間以内で保存し、顕微鏡観察とCoulterサイズ分析で検出された気体の損失は最小限であった。

20

#### 【0048】

各群 (Di-1ラベル化したものとラベル化していないもの) のおよそ  $250 \times 10^6$  個のバブルを500RPMで5分間バケツ遠心分離により5回洗浄し、再度2.0mL  $C_4F_{10}$  飽和DPBSに懸濁させた。洗浄は、プランジャーをはずした5.0mLシリンジで行った。遠心分離によりバブルはシリンジの頂部に堆積し (US特許No.6245,318に記載されたとおりである)、シリンジの底から Luer-lockバルブを用いて遊泳物 (infranatant) を除去した。

30

#### 【0049】

小さなマイクロバブルと遊離の及びミセル状の脂質を除去するための2回の洗浄の後、Di-1ラベル化したマイクロバブル群を以下のように一部破碎した。2.0mL分散液を8.0mLの空気を含む10mLシリンジに吸い込んだ。シリンジを閉じ、体積が6.5mLになるまで押し下げ、分散液中の全てのバブルに均一に750mmHgの圧力が行き渡るようにした。分散液への圧力の付加は電子マノメータ (Dwyer, Michigan City, IN) で測定した。繰り返し洗浄し、しわ状の群から空の殻フラグメントを除き、両群について、Coulter Counter (Beckman Coulter, Miami, FL) により測定してより均一のサイズ分布のものを提供した。

#### 【0050】

$10^7$  個のマイクロバブル当たり3  $\mu$ gのストレプトアビジンを各マイクロバブル群に加えた。氷上での30分間のインキュベートの後マイクロバブルを2回洗浄して、結合しなかったストレプトアビジンを除去した。 $10^7$  個のマイクロバブル当たり7.5  $\mu$ gのビオチン化Rb40.34を各群に加えた。マイクロバブルを30分間氷上でインキュベートし3回洗浄して結合しなかった抗体を除去した。この方法により典型的には2.0mLの各群中に  $20 \sim 50 \times 10^6$  個の抗体結合マイクロバブルを生産した。濃度及び平均直径などを含む各群の特性は、球形マイクロバブル及びしわ状のマイクロバブルの両方につき洗浄した後得た。

40

#### 【0051】

##### 1.7 P-セレクトイン・Fc部位の濃度測定

50

既知の濃度 (25、150または250 ng / 200 µg) のP-セレクチン・Fcを上  
述の通り35 mmの皿に吸着させた。カゼイン中で2時間のブロッキングの後1.0 mL  
PBS中0.96 µgのビオチン化Rb40.34を各皿に加えた。溶液の量は皿の全表面を覆うの  
に充分であった。室温で30分間のインキュベーションの後、0.05 % Tween-20で7回洗浄  
して結合しなかった抗体を除去し、1.0 mL中ユーロピウムラベルしたストレプトアビ  
ジンを各皿に加えた。室温で30分間のインキュベーションの後、皿を7回洗浄して結合しな  
かったストレプトアビジンを除去した。0.9 mLのDELTA増強溶液 (enhancement solut  
ion) を各皿に加え、室温で5分間インキュベートした。反応物を各皿から集め、96穴  
のマイクロタイタープレート (穴当たり300 µL) に入れ、SPECTRAMax Gemini XSデュ  
アルスキャニングマイクロプレート分光蛍光計 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) を  
用いた時間分解分光蛍光計に用いた。プレートを360 nmで励起し、250 ~ 1250  
µ秒のタイマー間隔の間610 nmで読んだ。カゼインのみでインキュベートしたスキャ  
ニングプレートにより非特定の抗体の接着のレベルを測定した。Rb40.34のビオチン化  
は、アビジン-HABA置換法 (Green, 1965) を用いて1モルの抗体当たりおよそ0.3モ  
ルのビオチンであると測定された。吸着されたP-セレクチン・Fcのサイト密度 (site  
densities) は、Rb40.34がP-セレクチン・Fc二量体の各ヘッドと1対1で結合し、  
ストレプトアビジンとRb40.34が1対1で結合すると仮定して計算した。

10

## 【0052】

## 1.8 フローチャンバー実験

抗体ラベル化したしわ状のマイクロバブルと球形のマイクロバブルとを同数ずつ混合し  
、希釈してC<sub>4</sub>F<sub>10</sub>飽和DPBS緩衝液1 mL当たりおよそ3 × 10<sup>6</sup> バブルとした。マイクロ  
バブルの緩衝液の飽和によりマイクロバブルへのあるいはマイクロバブルからの気体の移  
動を防いだ。混合したマイクロバブル分散液を磁気攪拌棒で連続的に攪拌し、全ての実験  
において確実に均一にした。混合したマイクロバブル分散液を望ましい剪断速度で10 c  
mの0.6 mm直径のチューブを通じてフローチャンバーに吸い込んだ。各実験の間中、  
P-セレクチン・Fcが吸着された1 cm直径の円の中心近傍の一つの視野 (110 µm  
× 150 µm) を観察した。エビ蛍光発光を低強度透過光に維持し、これにより蛍光ラベ  
ル化したしわ状のマイクロバブルとラベル化していない球形マイクロバブルとの区別が可  
能になった。各皿を単一の剪断速度で実験の間中観察した。各実験をおよそ10分間続き  
、あるいは視野が結合マイクロバブルで飽和するまで行った。各皿の単一の視野につき、  
各群のマイクロバブルの総流量75 ~ 300が観察された。

20

30

## 【0053】

## 1.8.1 接着能

各群の接着マイクロバブルの数を数えることによりオフラインで接着能を測定した。マ  
イクロバブルを一時的に接着している、すなわち結合したマイクロバブルが10秒以内に  
剥がれるものか、あるいは強固に接着している、すなわち結合したマイクロバブルが10  
秒以上持ちこたえたもののいずれかにクラス分けした。接着マイクロバブルの数をマイ  
クロバブルの流量で表面の結合距離 (1マイクロバブル直径) 内に標準化し、接着能を算  
出した。

## 【0054】

## 1.8.2 マイクロバブル休止時間 (pause time)

マイクロバブル接着行動の継続時間における分布を上記のフローチャンバー実験用に集  
めた。ビデオを1/3の速度で再生して短命の接着行動の検出を可能にした。バブルが静  
止したままでいるフレーム数を数え、これをビデオのフレームレートで割り、行動の継続  
時間を算出した。少なくとも10秒間接着したままのマイクロバブルを「強固に接着」と  
勘定し、10秒間を超えては分析しなかった (これらのバブルの大部分が残りの実験では  
結合したままであることが観察された)。一瞬結合したバブルの休止時間 (pause time)  
を各P-セレクチン・Fcサイト密度でプールして (pool)、そしてこれをプロットした  
。

40

## 【0055】

50

### 1.9 生体内顕微鏡法

マウスに  $0.5 \mu\text{g}$  のマウス腫瘍壊死因子 (TNF-) (Sigma, St. Louis, MO) を陰嚢内に手術前 2 時間に投与し、挙筋での P-セレクチンの発現が最大になるようにした。マウスは、 $125 \text{ mg} / \text{kg}$  体重のケタミン (Parke-Davis, Morris Plains, NJ)、 $12.5 \text{ mg} / \text{kg}$  体重のキシラジン (Phoenix Scientific, St. Joseph, MO) 及び  $0.025 \text{ mg} / \text{kg}$  体重の硫酸アトロピン (Elkins-Sinn, Cherry Hill, NJ) を腹腔内注射により麻酔にかけた。電気温パッドを用意して体温を  $38^\circ\text{C}$  に維持した。気管に PE90 チューブ (Becton Dickinson, Sparks, MD) を挿管し、自発呼吸を促進させ、そして右頸静脈に PE20 チューブのカニユーレを挿管した。マイクロバブル分散液を頸部カニユーレを通じて投与し、各実験の最後に頸動脈から血液試料を採取した。

10

#### 【0056】

挙筋を露出させ、 $5\%$  の  $\text{CO}_2$  で平衡させた等張の重炭酸塩緩衝液 ( $131.9 \text{ mM NaCl}$ 、 $18 \text{ mM NaHCO}_3$ 、 $4.7 \text{ mM KCl}$ 、 $2.0 \text{ mM CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $1.2 \text{ mM MgCl}_2$ ) を連続的に注いだ。露出させた挙筋を顕微鏡試料台 (Carl Zeiss, Thornwood, NY) にピンで刺し、生理食塩水浸漬対物レンズ (SW 40/0.8 num 口径) の真下に置き、生体内顕微鏡法に使用した。試料を高解像度 CCD カメラ (Daga-MTI, Inc, Michigan City, IN) で視覚化し、オフライン分析用に VHS ビデオカセットに録画した。Di-I ラベル化マイクロバブル ( $\text{ex}=480\text{nm}$ 、及び  $\text{em}=535\text{nm}$ ) あるいは Di-O ラベル化したマイクロバブル ( $\text{ex}=545\text{nm}$  及び  $\text{em}=610\text{nm}$ ) のいずれかに用いるフィルターで挙筋にエピ蛍光照射し、接着したマイクロバブルの存在を明らかにし、そして引き続き光を透過させて、血管空間に接着した

20

#### 【0057】

各群の  $2.5 \times 10^6$  マイクロバブル (Di-I ラベル化しわ状及び Di-O ラベル化球形) を頸部カニユーレを通じて注射した。注射後 4 ~ 20 分間、各タイプの接着したマイクロバブルの数を 10 個の視野につき測定した。二重スリット光ダイオード (CircuSoft Instrumentation, Hockessin, DE) を用いて各容器の中心線速度 ( $V_c$ ) を測定した。壁剪断速度 ( $WSR$ 、 $\text{s}^{-1}$ ) を以下の等式 15 により測定した：

#### 【0058】

##### 【数 1】

$$\gamma = 10.6 \cdot \left( \frac{V_c}{d} \right)$$

30

#### 【0059】

ここで、 $\gamma$  は壁剪断速度 ( $\text{s}^{-1}$ )、 $V_c$  は中心線速度 ( $\mu\text{m} / \text{s}$ )、及び  $d$  は血管直径 ( $\mu\text{m}$ ) (Reneman ら、1992) である。 $15 \sim 55 \mu\text{m}$  の小静脈のみ分析した。血液試料を  $90 \mu\text{L}$  Kimura と混合し、白血球を染色し、そして血球計で数えた。

#### 【0060】

### 1.10 マイクロバブルの変形

Di-I ラベル化した殻を両群に用いて上記の実験に記載したようにビオチン化マイクロバブルを調製した。 $100$  倍の水浸漬型対物レンズでの光の透過を可能とした修正フローチャンバーを構築した。標準的な Corning の  $35 \text{ mm}$  ポリスチレン皿から円形の  $1 \text{ cm}$  半径の穴を切り出し、 $200 \mu\text{g}$  のアビジンを吸着させてあるプラスチックカバーガラスを穴に適合させた。このような変更を加えた皿を数本のゴムバンドと通常のフローチャンバー減圧によりフローチャンバー台に固定した。修正フローチャンバーの線図を図 2 に示す。各マイクロバブル群をそれぞれ別々にフローチャンバーに引き込んだ。 $45 \text{ s}^{-1}$  での 5 分間 (分析に十分なバブルが吸着される時間) の引き込みの後、バブル分散液を  $\text{C}_4\text{F}_{10}$  飽和 DPBS で置換した。およそ  $5 \sim 20$  の接着マイクロバブルを取り囲む 5 つの視野が観測され、写真を撮った。そして剪断速度を 5 分間で  $122.5 \text{ g}^{-1}$  に増加し、その間にさらに 5 つの視野が観察された。剪断速度を 5 分間で  $306.3 \text{ s}^{-1}$  に増加し、またさらに 5 つの視野が観察された。カメラを流れの方向に沿わせるように注意した。各接着マイク

40

50



ロバブルの変形指数を、マイクロバブルにおける流れの方向に沿った最も長い軸の長さを、流れの方向に垂直な方向に沿った最も長い軸の長さで割り、算出した。

#### 【0061】

##### 1.11 音波レスポンス

上記の通り鈍鋸歯状のマイクロバブルを静水圧により調製した。 $2.4 \times 10^6$  または  $1.2 \times 10^6$  球形マイクロバブル（未処理）またはしわ状マイクロバブルの分散液を注射グレードの 0.9% NaCl の 0.5 L バッグに注入した。高調波造影を用い線形の超音波プローブによって、生理食塩水バッグ中でのマイクロバブルの音波レスポンス（echogenicity）を測定した。

#### 【0062】

もう一つの実験では 35 mm 皿の上に様々な濃度のアビジン（Sigma）をメッキ（plated）した。およそ  $5 \times 10^6$  のビオチンで被覆した鈍鋸歯状または球形（未処理）マイクロバブルを、平行板フローチャンバー内のアビジン被覆した皿に低剪断速度で注入した。各皿に結合したバブルの数を視覚的に確認した。以下の各実験で、フローチャンバーから皿を分離して  $C_4F_{10}$  飽和 PBS 浴に入れることにより、結合したマイクロバブルが空気に接触するのを防いだ。次いで各皿を PBS 浴中に置いて線形超音波プローブで造影した。各皿に結合したバブルの音波レスポンスを再度視覚的に Agilent Sonos5500 医療用超音波造影システムのスクリーン上で測定した。

#### 【0063】

##### 1.12 統計的分析

球形及びしわ状マイクロバブルの接着能を、各フローチャンバー実験において賦与した 3 つの壁剪断速度において比較した。Excel ver.9.0 表計算ソフト（Microsoft）を用いて 2 標本 t - 検定を行った。有意性は  $p = 0.05$  となった。10 の小静脈における接着したマイクロバブルの平均数を *in vivo* 実験で比較した。同様の 2 標本 t - 検定をこれらのデータについて行った。

#### 【0064】

##### 1.13 しわ状リガンドマイクロバブルによる、微粒子または細胞の標的化された抽出

実施例 1 - 5 に記載したように調製した 1 mL の洗浄ビオチン化鈍鋸歯状マイクロバブルを、ストレプトアビジン（1  $\mu$ m 直径、Molecular Probes, Eugene, OR）で被覆された  $\sim 1.1 \times 10^8$  の蛍光ポリスチレンラテックスビーズと混合して 30 分間混合のためにインキュベートすることができる。次いで材料を逆さに置いたシリンジまたはフラスコに入れそして通常の重力でまたは  $\sim 500$  rpm ( $r = 15$  cm) のバケツローターで遠心してマイクロバブルと接着した微粒子の浮遊物を得ることができる。あるいはマイクロバブルを抗体または他のリガンドまたは標的化分子で被覆し、特定の抗原を有する細胞混合物と混合することができる。抗原を有する細胞のマイクロバブルへの選択的な接着は、バブル - 細胞複合体の浮遊物を作りだし、そして意図した細胞を含み、水性媒体中のバブル及び堆積物に結合しない、抗原を有していない細胞を含まないマイクロバブル層浮遊物の選択的な濃縮を可能とするだろう。マイクロバブル表面上の鈍鋸歯形状の存在によりマイクロバブルが標的細胞に接着するのが容易になり、接着能と結合力を改善する。

#### 【0065】

## セクション 2：結果

### 2.1 マイクロバブルの圧壊

脂質殻がバブル表面を通過する気体の拡散のバリアを提供する。マイクロバブルへのゆっくりとした均一な正の圧力の負荷により、気体内容物が脂質殻を通過して拡散する。脂質単分子層殻の表面部分は気体核の表面よりももはや過剰となり、殻が外側に曲がりしわや折り畳みを形成する。このしわが外側に突き出た二重層を形成する。しわ状マイクロバブルが飽和  $C_4F_{10}$  溶液内で保存されれば、濃度勾配は再膨張（re-inflation）に対抗するので、しわは安定である。予想されるしわの構造の線図は図 3 に表される。マイクロバブルへの圧力の負荷は脂質単分子層（黄色）の曲がりを生起し、二重層のしわを形成する。PEG 分子は赤で、固定化 Rb40.34 抗体は黒で示される。

10

20

30

40

50

## 【0066】

しわはマイクロバブル表面上に正の静水圧を負荷することで生起される。このようなしわが存在することは蛍光分光分析により確認され、これにより白血球表面上に見られるマイクロ折り畳みに似た明確な外周及び折り畳みが明らかになる。しわは  $0.3 \mu\text{m}$  以下にわたることが観察される。Di-I 蛍光プローブの取り込みにより蛍光エピ発光のもとで脂質殻を視覚化することができ（図 4 A、および 4 B、上の図）、光の透過する明るい部分は気体核を表す（図 4 A 及び 4 B、下の図）。明るい部分の写真により、蛍光灯下に見られる構造は本当にバブルであり、単なる空の脂質殻ではないことが確かめられる。しわ状マイクロバブルと反対に、球形マイクロバブルは蛍光灯下で丸く見える。かかるしわは、マイクロバブルが  $\text{C}_4\text{F}_{10}$  飽和媒体中で保存されれば数時間安定である。

10

## 【0067】

Coulter のマルチサイザーを用いて 2 つのマイクロバブル群のサイズ特性を得た。Coulter カウンターは電気伝導度を測定することにより粒子のサイズを計算する。そこでサイズ分布は、Coulter カウンターの各マイクロバブル群の気体核のサイズレポートから得られ、そしてしわ状バブルの表面にある非連続性はカウントしない。2 つのマイクロバブル群の間の、およそ  $0.5 \mu\text{m}$  の直径の違いが、測定されたサイズ分布（図 5）から明らかである。このサイズの違いにより、しわ状マイクロバブルは幾らかの気体容量を損失し、このようにして脂質表面を平坦で、より容量の少ない折り畳みに変化させたということが確かめられた。いずれの群のマイクロバブルの気体容量も Coulter カウンターによりレポートされたのと等しい直径の球体の容積であるとして計算することができる。平均的なしわ状マイクロバブルの気体の容量は  $7.7 \mu\text{m}^3$  であり、平均的な球形マイクロバブルの方は  $13.2 \mu\text{m}^3$  であった。したがって平均的なしわ状マイクロバブルからは  $5.6 \mu\text{m}^3$  の  $\text{C}_4\text{F}_{10}$  が放出され、この容量損失は 41% に相当する。

20

## 【0068】

## 2.2 皿表面上の P-セレクトイン・Fc のサイト密度

異なる 3 つの濃度の組み換え型マウス P-セレクトイン（P-セレクトイン・Fc）基質についてフローチャンバー実験を行った。サイト密度対吸着された P-セレクトイン質量のグラフを、皿表面の P-セレクトイン・Fc タンパク質について作成し、これを図 6 に示す。サイト密度  $25 \text{ ng}$ 、 $150 \text{ ng}$ 、及び  $250 \text{ ng}$  は、それぞれ 31、97 及び 133 サイト /  $\mu\text{m}^2$  である。グラフは非線形で、 $0.785 \text{ cm}^2$ （1 cm 円の面積）当たりおよそ  $300 \text{ ng}$  P-セレクトインにおいて飽和していることがわかる。非特定のバックグラウンドの接着が  $14 \text{ サイト} / \mu\text{m}^2$  と等しいシグナルを生じた。

30

## 【0069】

## 2.3 In Vitro での接着能

## 2.3.1 強固な接着能及び一時的な接着能

この実験では、接着行動に 2 つのタイプが観察された：一時的な接着と強固な接着である。造影には強固な接着が望ましい。なぜなら意図した標的部分にマイクロバブルが集合するからである。P-セレクトイン標的化マイクロバブルの接着能を 3 つの P-セレクトイン・Fc サイト濃度につき 3 つの剪断速度でフローチャンバー法にて測定した。結果を図 7 に示す。強固な接着能は剪断速度にほぼ線形に減少することが見て取れる：剪断速度  $33.6 \text{ s}^{-1}$ 、最高の P-セレクトイン濃度（ $250 \text{ ng}$  / 平行板）において最大 7.6% から、 $122 \text{ s}^{-1}$ 、最低濃度（ $25 \text{ ng}$  / 平行板）において 2% にまで減少する（図 7、A、B、C）。測定された各サイト密度でしわ状マイクロバブルは球形マイクロバブルと比べて実質的に（ $p < 0.05$ ）より多くの強固な接着能を示した（ $33.6 \text{ s}^{-1}$  と  $76.6 \text{ s}^{-1}$ ）。アイソタイプ対照抗体（Iso Ab）を有する標的化しわ状及び球形マイクロバブル、または純粋カゼイン基質に注入される P-セレクトイン標的化マイクロバブルは、殆ど無視できる程の強固な接着しか生じなかった（ $< 2\%$ ）（図 7 D）。

40

## 【0070】

一時的な接着能は、球形及びしわ状マイクロバブルとも、剪断速度とともに減少した。一時的な接着能は、球形マイクロバブルの方が実質的に高く（剪断速度  $122.5 / \text{s}$  の

50

もとでの測定を除く)、この実験において統計的な違いは見られなかった。

#### 【0071】

#### 2.3.2 強固な接着行動の割合 (fraction)

強固な接着行動の割合を、強固な接着能を捕捉能 (capture efficiency) で割って算出した。この割合は、マイクロバブルが強固な (一時的の逆) 接着行動を形成する傾向、あるいは同様にどのように良好な捕捉行動が安定化され、そして強固な接着に変化するかを表すものである (図8)。強固な接着の割合は各剪断速度における P - セレクション・Fc サイト密度の関数としてプロットする。しわ状マイクロバブルの強固な接着の割合は、各剪断速度において 250 ~ 150 ng の P - セレクションでだいたい一定であり、25 ng P - セレクションでは若干減少する。球形マイクロバブルは、全ての条件において強固な接着の割合がしわ状マイクロバブルのそれよりも低い、同様のサイト依存性傾向を示した。

10

#### 【0072】

#### 2.3.3 休止時間分布

2つのタイプの接着行動が観察された: バブルが少なくとも10秒間接着する強固な接着と、バブルが離れるまでに10秒間未満しか接着しない一時的な接着である。少なくとも10秒間接着したバブルの大半はもっと長い時間結合したままであることが観察されたが、10秒間を強固な接着のカットオフとして選択し、これはフローチャンバー実験にて通常の持続時間である。フローチャンバー実験から得た休止時間分布の分析により一時的な接着行動及び強固な接着行動は2つの異なる群を形成し、しわ状及び球形バブルに異なる群を生じる (図9A ~ 9C)。これにより、強固及び一時的接着について10秒間をカットオフ時間として使用する正当性が明らかである。

20

#### 【0073】

#### 2.4 変形指数

種々の剪断条件下の球形及びしわ状マイクロバブルの変形度を測定して、しわ状マイクロバブルの強固な接着能が増強されるのは、結合することができるバブル表面領域における変形が誘導する増加によるものであるという仮説を検証した。接着能を測定した全ての剪断速度にわたってしわ状マイクロバブルは球形マイクロバブルよりも実質的により多く変形しており、これは図10に示されている。1を超える変形指数は流れの方向への伸長 (バブルに対する剪断力により変形が引き起こされていることを示す) と、P - セレクション・Fc 基質と接触しているマイクロバブル領域での対応する増加を表している。よりたくさん P - セレクション・Fc : Rb40.34 結合が形成されると、強固な接着が安定化される。しかし変形指数は、セクション2.4.2に記載された、剪断速度に対する強固な接着能の依存性とは相関関係がないように見える: 変形指数は剪断と共に増加するが強固な接着能は剪断と共に減少する。この矛盾点は、結合したバブルに対して剪断力が反対の振る舞いをするに起因するのであろう。剪断速度を増すと剪断力がバブルを圧す力の大きさが増加し、表面の変形の増加を引き起こす。しかしこの剪断力は結合したバブルに対して平行板表面から離そうとする、引き離す力としてはたらく。2つの相対する効果の相対的な大きさは、接着バブルの剪断引っ張りに対する感受性と脂質殻が変形される相対的な容易性から見積もられる。

30

40

#### 【0074】

#### 2.5 マウス拳拳筋における接着の増加

しわ状及び球形マイクロバブルの *in vivo* での接着能は、炎症中のモデルマウスにより検討した。結果を図11に示す。剪断速度 500 ~ 3000  $s^{-1}$  下のサイトカインで刺激した小静脈についてマイクロバブルの接着を検討した。4匹のc57B1/6マウスにおいてしわ状マイクロバブルが球形マイクロバブルよりも実質的に大きな接着を示した。P - セレクション欠損マウス (P-/-) における標的化マイクロバブルの使用あるいはアイソタイプ対照抗体 (Iso Ab) でのマイクロバブルの標的化は、両方のマイクロバブル群についておよそ2倍の接着にまで減少させた。球形マイクロバブルはしわ状マイクロバブルよりも直径で ~ 0.5  $\mu m$  サイズが大きかったが、このサイズの違いが内皮表面への送達の違いに

50

寄与したとは考えられない。さらに接着したしわ状及び球形マイクロバブルにサイズまたは伸長の違いは特に見られなかった。P-/-マウスまたはアイソタイプ対照実験で接着したマイクロバブルは、Lindnerらが報告(2001)したように、マクロファージに接着するようであった。

【0075】

## 2.6 しわ状及び球形マイクロバブルの音波応答性

等濃度で0.5Lバグの注射グレードの0.9%NaClに注入された場合、視覚的に測定されるように、鈍鋸歯状マイクロバブルにより提供されるコントラストは、円形マイクロバブルのそれとおおよそ等しく、測定範囲内ではバブル濃度と共に音波応答性が増加する。

10

【0076】

実験セクション1に記載されたビオチン被覆された鈍鋸歯状または球形(未処理)マイクロバブルを平行板フローチャンバー中のアビジン被覆皿に低剪断速度で注入する実験では、超音波コントラストシグナルは皿に結合したバブルの数と共に増加し、これも等しい濃度の円形及び鈍鋸歯状バブルについてほぼ等しかった。皿に結合したマイクロバブルは超音波の機械指数を0.5超にして破壊した(幾つかの超音波パルスの後、バブルからのシグナルが消失)。

【0077】

本発明が前記の明細書に詳細に説明されたが、例示的なものであると理解され、限定的な性質のものではなく、単に好適な態様が記載されただけであると理解されるべきであり、本発明の精神内の全ての変更及び修正は保護されることをが望ましい。さらに本出願に特定された全ての文献は通常の当業者が保有する能力を示すものであり、ここに参考文献として組み込まれ、以下に全て列挙する。

20

【0078】

## [参考文献]

Forstberg F and Shi WT. 2001. Physics of contrast microbubbles. In Ultrasound Contrast Agents, 2nd Edition. Ed. Boldberg BB, Raichlen JS, Forsberg F. Martin Dun itz, LTD, London, UK.

Klibanov AL, Hughes MS, Villanueva FS, Jankowski RJ, Wagner WR, Wojdyla JK, Wible JH, Brandenburger GH. 1999. Targeting and ultrasound imaging of microbubble-based contrast agents. *MAGMA*. 8: 177-184.

30

Crouse LJ, Cheirif J, Hanly DE. 1993. Opacification and border delineation improvement in patients with suboptimal endocardial border definition in routine echocardiography: Results of the Phase III Albunex Multicenter Trial. *Journal of American Cardiology* 22: 1494-1500.

Shub C, Tajik AJ, Seward JB. 1976. Detecting intrapulmonary right-to-left shunts with contrast echocardiography. *Mayo Clinic Proceedings* 51: 81-84.

40

Rim S, Leong-Poi H, Lindner JR, Couture D, Ellegala D, Mason H, Durieux M, Kassel NF, Kau] S. 2001. Quantification of cerebral perfusion with "real-time" contrast-enhanced ultrasound. *Circulation*. 104: 2582-2587.

Mulvagh SL, DeMaria A, Feinstein S. 2000. Contrast Echocardiography: Current and future applications. *Journal of the American Society of Echocardiography*. 13: 331-342.

Villanueva FS. 2000. The use of myocardial contrast echocardiography in clinical

50

evaluation after myocardial infarction. *Coronary Artery Disease*. 11: 235-242.

Villanueva FS, Jankowski RJ, Manaugh C, Wagner WR. 1997. Albumin microbubble adherence to human coronary endothelium implications for assessment of endothelial function using myocardial contrast echocardiography. *Journal of American Cardiology*. 30: 689-693.

Gunda M and Mulvagh SL. 2001. Recent advances in myocardial contrast echocardiography. *Current Opinion in Cardiology*. 15: 231-239.

10

Klibanov AL, Hugbs MS, Marsh JN, Hall CS, Miller JG, Wible JW, Brandenburger GH. 1997. Targeting of ultrasound contrast material: an in vitro feasibility study. *Acta Radiologica*. 38: 113-120.

Girard MS, Kono Y, Sirlin CB. 2001. B-mode enhancement of the liver with microbubble contrast: a blinded study in rabbits with VX2 tumors. *Acadamec Radiology*. 8 : 734-740.

Walday P, Tolleshuag H, Gjoen T, Kindberg GM, Berg T, Skotland T, Holtz E. 1994. Biodistributions of air-filled albumin microspheres in rats and pigs. *Biochemical Journal*. 299: 437-443.

20

Keller MW, Spotnitz WD, Metthrew TL, Glasheen WP, Watson DD, Kaul S. 1990. Intraoperative assessment of regional myocardial perfusion using quantitative myocardial contrast echocardiography: an experimental evaluation. *Journal of American Colleges of Cardiology*. 16:1267-1279.

Kono, Y, Steinbach, GC, Peterson T, Schmid-Schonbein GW, Mattrey RE 2002. Mechanism of parenchymal enhancement of the liver with a microbubble-based US contrast medium: an intravital microscopy study in rats. *Radiology*. 224: 253--257.

30

Leong-Poi H, Christiansen J, Klibanov AL, Kaul S, Lindner JR. 2003. Noninvasive assessment of angiogenesis by ultrasound and microbubbles targeted to  $\alpha_v\beta_3$ -integrins. *Circulation*. 107:455-460.

Lindner JR, Coggins MP, Kaul S, Klibanov AL, Brandenburger GH, Ley K. 2000. Microbubble persistence in the microcirculation during ischemia/reperfusion and inflammation is caused by integrin- and complement-mediated adherence to activated leukocytes. *Circulation*. 101: 668-675.

40

Lindner JR, Dayton PA, Coggins MT, Ley K, Song J, Ferrara K, Kaul S. 2000. Noninvasive imaging of inflammation by ultrasound detection of phagocytosed microbubbles. *Circulation*. 102: 531-538.

Lindner JR, Ismail S, Spotnitz WD, Skyba DM, Jayaweera AR, Kaul S. 1998. Albumin microbubble persistence during myocardial contrast echocardiography is associated with microvascular endothelial glycocalyx damage. *Circulation*. 98: 2187-2194.

Lindner JR, Song J, Christiansen, J, Klibanov, AL, Xu, F, Ley, K. 2001. Ultrasound assessment of inflammation and renal tissue injury with microbubbles targeted

50

to P-selectin. *Circulation*. 104: 2107-2112.

Lindner JR, Song J, Xu F, Klibanov AL, Singbarg K, Ley K, Kaul S. 2000. Noninvasive ultrasound imaging of inflammation using microbubbles targeted to activated leukocytes. *Circulation*. 102: 2745-2750.

Christiansen JP, Leong-Poi H, Klibanov AL, Kaul S, Lindner JR. 2002. Noninvasive imaging of myocardial reperfusion injury using leukocyte-targeted contrast echocardiography. *Circulation*. 105: 1764-1767.

10

Ellegala DB, Leong-Poi H, Carpenter JE, Klibanov AL, Kaul S, Shaffrey ME, Sklenar J, Lindner JR. 2003. Imaging tumor angiogenesis with contrast ultrasound and microbubbles targeted to  $\alpha_v\beta_3$ . *Circulation*. 108: 336-341.

Schumann PA, Christiansen JP, Quigley RM, McCreery TP, Sweitzer RH, Unger EC, Lindner JR, Matsunaga TO. 2003. Targeted-microbubble binding selectively to GPIIb/IIIa receptors of platelet thrombi. *Investigative Radiology*. 37: 587-593.

Price RJ, Skyba DM, Kaul S, Skalak TC. 1998. Delivery of colloidal particles and red blood cells to tissue through microvessel ruptures created by targeted microbubble destruction with ultrasound. *Circulation* 98: 1264-1267.

20

Teupe C, Richter S, Fisslthaler B, Randriamboavonjy V, Ihnig C, Fleming I, Busse R, Zeiher AM, Dimmeler S. 2002. Vascular gene transfer of phosphomimetic endothelial nitric oxide synthase (S1177D) using ultrasound-enhanced destruction of plasmid-loaded microbubbles improves vasoreactivity. *Circulation* 105: 1105-1109.

Porter TR, Hiser WL, Kricsfeld D, Dehgonul U, Xie F, Iversen P, Radio S. 2001. Inhibition of carotid artery neointimal formation with intravenous microbubbles. *Ultrasound in Medicine and Biology*. 27:259:265.

30

Weller GER, Lu E, Csikari MM, Klibanov AL, Fischer D, Wagner WR, Villanueva FS. 2003. Ultrasound imaging of acute cardiac transplant rejection with microbubbles targeted to intercellular adhesion molecule-1. *Circulation*. 108: 218-224.

Finger EB, Bruehl RE, Bainton DF, Springer TA. 1996. A differential role for cell shape in neutrophil tethering and rolling on endothelial selectins under flow. *The Journal of Immunology* 157: 5085-5096.

Atherton A and Born GVR. 1972. Quantitative investigation of the adhesiveness of circulating polymorphonuclear leukocytes to blood vessel walls. *The Journal of Physiology* 222: 447-474.

40

Firrell JC and Lipowsky HH. 1989. Leukocyte margination and deformation in mesenteric venules of rat. *American Journal of Physiology* 256: H1667-H1674. Forstberg F and Shi WT. 2001. Physics of contrast microbubbles. In Ultrasound Contrast Agents, 2nd Edition. Ed. Boldberg BB, Raichlen JS, Forsberg F. Martin Dunitz, Ltd, London, UK.

Park EYH, Smith MJ, Stropp ES, Snapp KR, DiVietro JA, Walker WF, Schmidtke DW, D

50

iamond SL, Lawrence VIB, 2002. Comparison of PSGL-1 microbead and neutrophil rolling: microvillus elongation stabilizes P-selectin bond clusters. Biophysical Journal 82: 1835-1847.

Yago T, Leppanen A, Qiu H, Marcus WD, Nollert MU, Zhu C, Cummings RD, McEver, R P. 2002. Distinct molecular and cellular contributions to stabilizing selectin-mediated rolling under flow. Journal of Cell Biology. 158: 787-799.

Olsen TS, Singbartl K, Ley K. 2001. L-selectin is required for fMLP-but not C5a-induced margination of neutrophils in pulmonary circulation. American Journal of Physiology 282: R1245-R1242. 10

Kim DH, Klivanov AL, Needham D. 2000. The influence of tiered layers of surface-grafted poly(ethylene glycol) on receptor-ligand-mediated adhesion between phospholipid monolayer-stabilized microbubbles and coated glass beads. Langmuir. 16:2804-2817.

Green, N.M. 1965. A spectrophotometric assay for avidin and biotin based on binding of dyes by avidin. Biochem. J. 94:23c-24c. 20

Reneman RS, Woldhuis B, Oude Egbrink MGA, Slaaf DW, Tangelder GJ. 1992. Concentration and velocity profiles of blood cells in the microcirculation. Anonymous Advances in Cardiovascular Engineering. P25-40

【 0 0 7 9 】

[米国特許文献]

6,331,289	Dec, 2001	Klaveness et al
6,245,318	Jun 2001	Klivanov et al
6,264,917	July 2001	Klaveness et al
6,416,740	July 2002	Unger
6,443,898	Sept 2002	Unger et al

30

【図面の簡単な説明】

【 0 0 8 0 】

【図 1】図 1 は、in vitro接着能の検討を行うのに使用する逆平行フローチャンバーを示す線図である。標的基質（P-セレクトリン・Fc）をフローチャンバープレート上板に吸着させ、標的化マイクロバブルの分散液を既知の切断速度でフローチャンバーに注入する。

【図 2】図 2 は、変形度の検討を行うのに使用する修正フローチャンバーを示す線図である。標的基質（アビジン）で薄カバーガラスを被覆し、これを標準 35mm 培養皿内に置く。高倍率水浸漬対物レンズとカバーガラスとのカップリングを可能とするために培養皿を通過する小さな観察穴を切る。フローチャンバーの残りの部分は、記載したとおりに組み立てる。 40

【図 3】図 3 は、本発明のある種の態様のしわ状形状を示す線図である。マイクロバブルへの圧力の負荷により脂質単分子膜（黄色）が折れ曲がり、二重のしわを形成する。PEG 分子は赤、固定化標的化抗体は黒で示される。

【図 4】図 4 A および 4 B は、それぞれしわ状及び球形マイクロバブルの蛍光像（上）及び明視野像（下）である。バブルはプラスチックカバーガラスに静的に吸着され、100 倍の高解像度デジタルカメラで写真撮影される。エピ蛍光により脂質殻の視角化が可能となり、ここではしわが生じており、明視野は気体核の視角化を可能とする。上のパネルの右下の隅にある線は 10 μm である。

【図 5】図 5 は実験部でさらに説明したとおり、マイクロバブルのサイズ特性を示す：（A）フローチャンバー実験に用いたバブルの平均マイクロバブル直径の棒グラフ；（B）球形 50

及びしわ状マイクロバブルのCoulterカウンターサイズ分布；(C)しわ状及び球形マイクロバブルのサイズパラメータの表

【図6】図6は、皿表面の標的レセプターP-セレクトリン・Fcのサイト密度を表すグラフであり、この点はさらに実験部に記載されている。ピオチン化Rb40.34を適切な量のP-セレクトリン・Fcで被覆した皿と共にインキュベートする。結合した抗体をEu結合ストレプトアビジンでラベル化し、P-セレクトリン・Fcサイト密度を  $e_m = 360 \text{ nm}$ 、 $e_x = 610 \text{ nm}$  で時間分解スペクトロスコピーにより定量した。

【図7】図7は、フローチャンバー実験におけるしわ状及び球形マイクロバブルの強固な接着を表し、この点はさらに実験部に記載されている。強固な接着の接着能は、結合距離内にいる総流量に対して、10秒間以上接着したままでいるマイクロバブルの割合として定義される。(A、B、C)種々のP-セレクトリン・Fcサイト密度に対するしわ状及び球形マイクロバブルの強固な接着能；(D)負対照条件における強固な接着能：Rb40.34バブルのカゼインへの接着能及びアイソタイプ対照バブルの250 ng / 皿P-セレクトリン・Fcへの接着能。

【図8】図8は、フローチャンバー実験における強固に接着したマイクロバブルの割合を示し、この点はさらに実験部に記載されている。強固な接着は、強固な接着能を捕捉能で割ることにより計算した。

【図9A】図9Aは、フローチャンバー実験における球形及びしわ状マイクロバブルの休止持続時間を示し、この点はさらに実験部に記載されている。頻度を各バブルのタイプの接着行動の総数に対して標準化し；標準化した頻度の実際値を各カラムの上に記載した。休止時間のデータを各オフラインでの接着行動の持続時間を計算することにより接着能フローチャンバーの結果から集めた(実験、セクション2.4.2)。>10秒接着したバブルを「強固に接着した」とし、10秒のカラムで示した。全ての一時的接着バブルの平均休止時間は実質的に10秒以内であり、したがって二つの行動群のカットオフとして10秒を用いることが正当化される。

【図9B】図9Bは、フローチャンバー実験における球形及びしわ状マイクロバブルの休止持続時間を示し、この点はさらに実験部に記載されている。頻度を各バブルのタイプの接着行動の総数に対して標準化し；標準化した頻度の実際値を各カラムの上に記載した。休止時間のデータを各オフラインでの接着行動の持続時間を計算することにより接着能フローチャンバーの結果から集めた(実験、セクション2.4.2)。>10秒接着したバブルを「強固に接着した」とし、10秒のカラムで示した。全ての一時的接着バブルの平均休止時間は実質的に10秒以内であり、したがって二つの行動群のカットオフとして10秒を用いることが正当化される。

【図9C】図9Cは、フローチャンバー実験における球形及びしわ状マイクロバブルの休止持続時間を示し、この点はさらに実験部に記載されている。頻度を各バブルのタイプの接着行動の総数に対して標準化し；標準化した頻度の実際値を各カラムの上に記載した。休止時間のデータを各オフラインでの接着行動の持続時間を計算することにより接着能フローチャンバーの結果から集めた(実験、セクション2.4.2)。>10秒接着したバブルを「強固に接着した」とし、10秒のカラムで示した。全ての一時的接着バブルの平均休止時間は実質的に10秒以内であり、したがって二つの行動群のカットオフとして10秒を用いることが正当化される。

【図10】図10は、種々の剪断下におけるしわ状及び球形マイクロバブルの変形度を示し、この点はさらに実験部に記載されている。ピオチン化蛍光しわ状または球形マイクロバブルを、意図した剪断速度で5分間アビジンの基質に接着させた。接着したマイクロバブルの映像を高分解能力カメラで100倍でとらえた。変形指数を流れの方向における伸長度(x)を流れと垂直の方向におけるバブルの長さ(y)で割って算出した。xとyの方向の間にピクセルサイズの偏りはなかった。

【図11】図11は、しわ状及び球形マイクロバブル群に関して、P-セレクトリン標的化マイクロバブルのin vivoでの蓄積を示す。しわ状(Di-1ラベル化)及び球形(Di-0ラベル化)P-セレクトリン標的化またはアイソタイプ対照マイクロバブルの $2.5 \times 10^6$ の混合

10

20

30

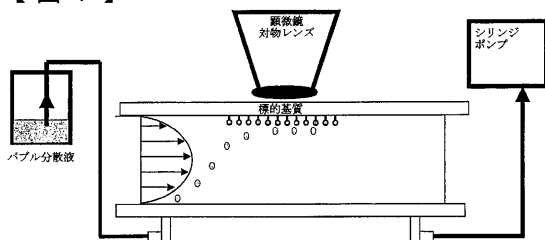
40

50

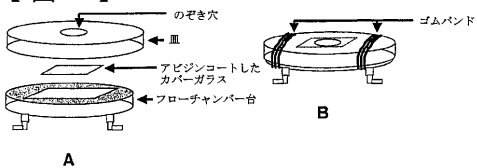


分散物を、手術の2時間前に500 ng マウスTNF- $\alpha$  で予め処理したc57B1/6またはP-/-マウスの静脈内に注射した。炎症マウス拳峯筋におけるマイクロバブルの接着を、小静脈中で接着したしわ状及び球形マイクロバブルを10箇所数えることにより測定した。(A)炎症微小循環におけるしわ状及び球形マイクロバブルの接着；(B)生理学的パラメータ。

【図1】



【図2】



【図3】

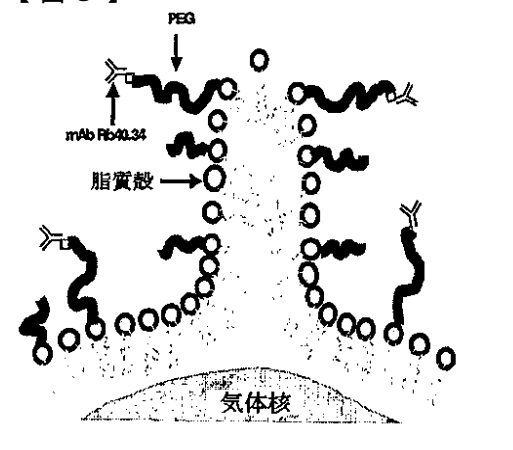


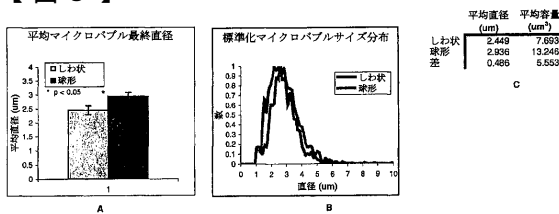


FIGURE 4A

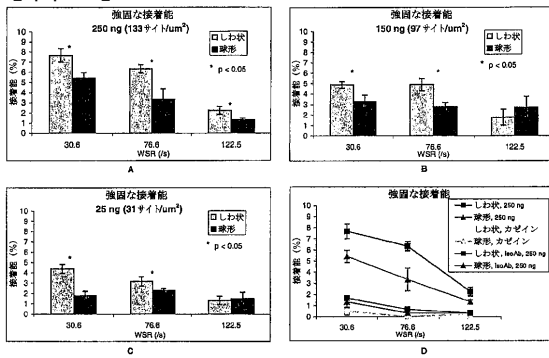


FIGURE 4B

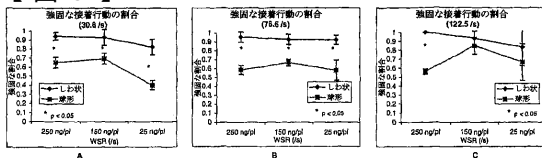
【図5】



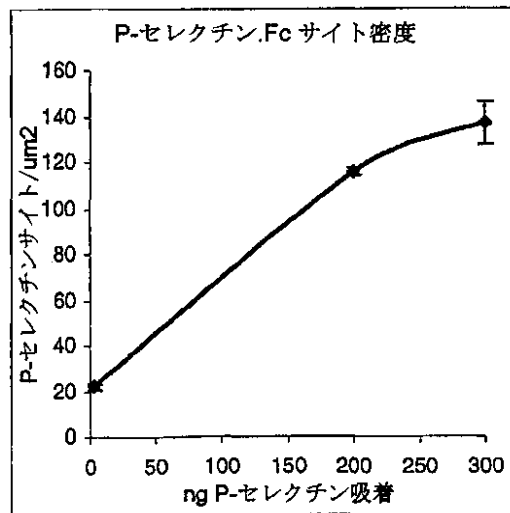
【図7】



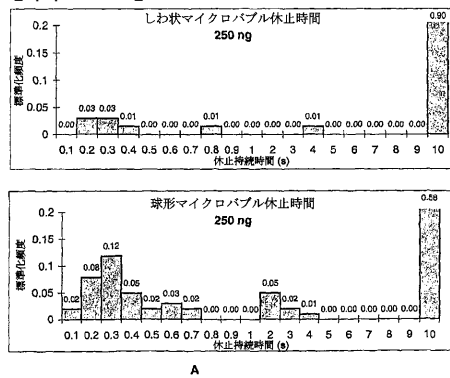
【図8】



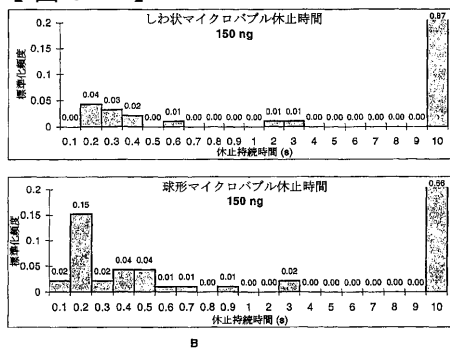
【図6】



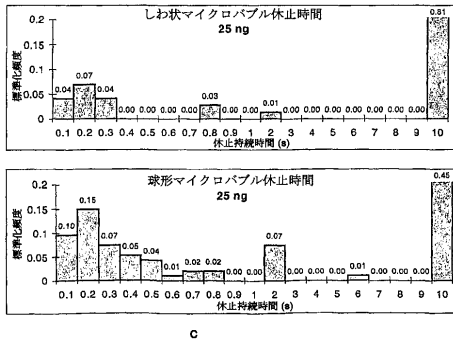
【図9A】



【図9B】

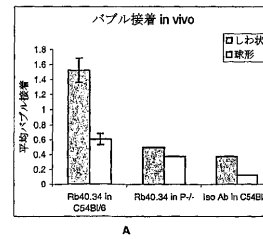


【図 9 C】



C

【図 1 1】



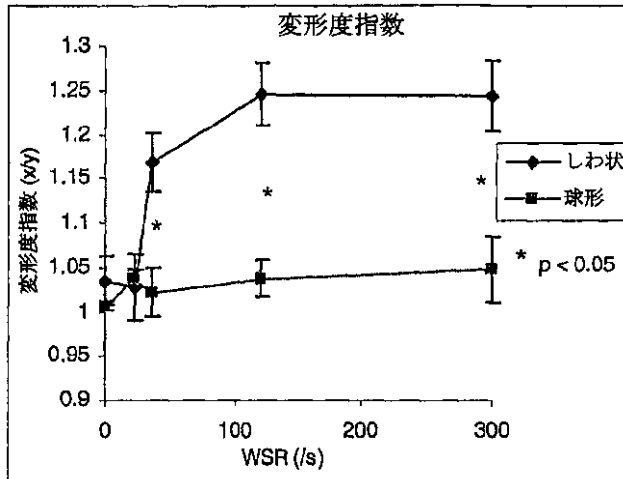
A

生理学的パラメータ

	血管直径 (um)	Vb (um/s)	SR (/s)	n (マウス)
WT	33.35445	3147.321	1672.8629	4
P-/-	38.91542	2946.094	1632.9659	1
ISO Ctrl.	37.97615	1750	793.54692	1

B

【図 1 0】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/21712																				
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : A61K 49/00, 9/127; A61B 8/00 US CL : 424/9.51, 9.52, 9.5, 450 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																						
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/9.51, 9.52, 9.5, 450 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet																						
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>																						
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																				
Y	US 5,846,518 A (YAN et al) 08 December 1998 (08.12.1998), see entire document.	1-28, 30-36																				
Y	US 6,416,740 B1 (UNGER) 09 July 2002 (09.07.2002), see entire document.	1-28, 30-36																				
Y	US 6,443,898 B1 (UNGER et al) 03 September 2002 (03.09.2002), see entire document.	1-28, 30-36																				
Y	US 5,869,538 A (VAN LIEW et al.) 09 February 1999 (09.02.1999), see entire document.	1-28, 30-36																				
Y	US 6,051,207 A (KLAVERNESS et al) 18 April 2000 (18.04.2000), see entire document.	1-28, 30-36																				
Y	US 6,224,554 B1 (TICKNER et al) 01 May 2001 (01.05.2001), see entire document.	1-28, 30-36																				
Y	US 5,464,932 A (ALLCOCK et al) 07 November 1995 (07.11.1995), see entire document.	1-28, 30-36																				
Y	US 6,187,288 B1 (SCHNEIDER et al) 13 February 2001 (13.02.2001), see entire document.	1-28, 30-36																				
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																						
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A"</td> <td>document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"I"</td> <td>later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"E"</td> <td>earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"X"</td> <td>document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L"</td> <td>document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y"</td> <td>document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O"</td> <td>document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&amp;"</td> <td>document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P"</td> <td>document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"I"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family	"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"I"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention																			
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone																			
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art																			
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family																			
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																					
Date of the actual completion of the international search 16 November 2003 (16.11.2003)		Date of mailing of the international search report 09 DEC 2003																				
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer <i>Marianne DiBrino</i> Marianne DiBrino, Ph.D. Telephone No. 703-308-0196																				

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/21712

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6,245,318 B1 (KLIBANOV et al) 12 June 2001 (12.06.2001), see entire document.	1-28, 30-36
Y	US 6,548,048 B1 (CUTHBERTSON et al) 15 April 2003 (15.04.2003), see entire document.	1-28, 30-36
Y	US 6,372,195 B1 (SCHUTT et al) 16 April 2002 (16.04.2002), see entire document.	1-28, 30-36
Y	PRICE ET AL. Delivery of Colloidal Particles and Red Blood Cells to Tissue Through Microvessel Ruptures Created by Targeted Microbubble Destruction With Ultrasound. Circulation. 29 September 1998, Vol. 98, pages 1264-1267, see entire article.	1-28, 30-36

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/21712

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)**

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claim Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claim Nos.: Claim 29  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
Claim 29 depends upon claim 38 which is not preceding claim 29.
3. ☐ Claim Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/21712

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

STN (BIOSCIENCE)

search terms: gas filled microbubble, liposome, target molecule, crenated, non-spherical, surface projection, converting inventor's names

## フロントページの続き

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

テフロン

(74)代理人 100114904

弁理士 小磯 貴子

(72)発明者 クリバノフ,アレクサンダー・エル

アメリカ合衆国ヴァージニア州 2 2 9 0 3 , シャーロットヴィル, ネットル・コート 6 3 9

(72)発明者 レイ, クラウス・エフ

アメリカ合衆国ヴァージニア州 2 2 9 0 3 , シャーロットヴィル, カーリンズ・ウェイ 8 5 0

(72)発明者 ライチャク, ジョシュア・ジェイ

アメリカ合衆国ヴァージニア州 2 2 9 0 3 , シャーロットヴィル, ワートランド・ストリート 1  
2 1 0 7 , アpartment 1

F ターム(参考) 4C076 AA62 BB11 DD01 DD35 EE01 EE41 EE51 FF16 FF43 FF68

GG11 GG21

4C084 AA17 MA05 MA41 MA65 NA13 ZA361 ZC751 ZC781

4C085 HH09 JJ03 KA16 KA36 KA40 KB39 KB42 KB60 KB67 KB82

LL01 LL07

4C601 DE07



专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2006510579A5</a>	公开(公告)日	2006-08-17
申请号	JP2004521673	申请日	2003-07-11
[标]申请(专利权)人(译)	目标儿子LLC		
申请(专利权)人(译)	Tageson LLC		
[标]发明人	クリバノフアレクサンダーエル レイクラウスエフ ライチャクジョシュアジェイ		
发明人	クリバノフ,アレクサンダー・エル レイ,クラウス・エフ ライチャク,ジョシュア・ジェイ		
IPC分类号	A61K49/00 A61K45/00 A61K9/50 A61K47/06 A61B8/00		
CPC分类号	A61K9/127 A61K47/6925 A61K49/223		
FI分类号	A61K49/00.C A61K45/00 A61K9/50 A61K47/06 A61B8/00		
F-TERM分类号	4C076/AA62 4C076/BB11 4C076/DD01 4C076/DD35 4C076/EE01 4C076/EE41 4C076/EE51 4C076/FF16 4C076/FF43 4C076/FF68 4C076/GG11 4C076/GG21 4C084/AA17 4C084/MA05 4C084/MA41 4C084/MA65 4C084/NA13 4C084/ZA361 4C084/ZC751 4C084/ZC781 4C085/HH09 4C085/JJ03 4C085/KA16 4C085/KA36 4C085/KA40 4C085/KB39 4C085/KB42 4C085/KB60 4C085/KB67 4C085/KB82 4C085/LL01 4C085/LL07 4C601/DE07		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
优先权	60/395179 2002-07-11 US		
其他公开文献	JP2006510579A		

#### 摘要(译)

本发明描述了一种微泡组合物，其含有微泡，所述微泡具有结合了变形表面形态的膜，所述微泡可用于例如促进与靶表面或基底的结合。表面形态是由于非球形，例如，圆锯齿状，折叠，突出，或起皱，和类似物，它可以提高微泡膜的可变形性。可以将这种微泡组合物引入目标超声造影剂及其方法中。制备改性微泡组合物的方法包括制备具有球形膜的微泡并将球形膜改变为如上所述的非球形膜。在从球形变为非球形之前或之后，可以将靶向物质引入膜中。