

(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2015-534549

(P2015-534549A)

(43) 公表日 平成27年12月3日(2015.12.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 9/16 (2006.01)	A 6 1 K 9/16	2 G 0 4 5
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/00	A 4 C 0 7 6
A 6 1 K 51/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/00	C 4 C 0 8 4
A 6 1 K 47/34 (2006.01)	A 6 1 K 49/02	A 4 C 0 8 5
A 6 1 K 47/22 (2006.01)	A 6 1 K 47/34	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 51 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2015-531585 (P2015-531585)
 (86) (22) 出願日 平成25年9月14日 (2013. 9. 14)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年5月13日 (2015. 5. 13)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/069079
 (87) 国際公開番号 W02014/041150
 (87) 国際公開日 平成26年3月20日 (2014. 3. 20)
 (31) 優先権主張番号 12184562.2
 (32) 優先日 平成24年9月14日 (2012. 9. 14)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 515070044
 ステイヒティング カトリケー ユニフェ
 ルシテイト
 STICHTING KATHOLIEK
 E UNIVERSITEIT
 オランダ国 ナイメーヘン ゲールト フ
 ローテプライン-ザイト 10
 Geert Grooteplein-Z
 uid 10 Nijmegen the
 Netherlands

(74) 代理人 100075557
 弁理士 西教 圭一郎
 (72) 発明者 フィドル, カール フスタフ
 オランダ国 セルトーヘンボス ウェスト
 ワル 54

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 造影剤およびイメージングのためのその使用

(57) 【要約】

本発明は、医用超音波イメージングを向上する造影剤に関する。特に、提供される造影剤は、細胞イメージングおよび細胞治療、ならびにインピボ標的化、薬剤送達、およびがん流または血管系イメージング用途に有用である。より具体的には、フッ素化有機化合物と金属とを含む粒子を提供する。そのような粒子は、超音響および超音波イメージングを含む音響イメージング、19Fイメージング、T1およびT2強調イメージングを含む1HイメージングのようなMRIイメージング、SPECT、PET、シンチグラフィ、蛍光イメージングおよび光コヒーレンスイメージング、ならびに断層撮影用途などの、定性的または定量的イメージングに有利に採用されてもよい。これは、続いて、細胞標識化、顕微鏡、組織学において、またはインピボおよびインピロトにおける血管系もしくはがん流イメージングに採用されてもよい。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

パーフルオロクラウンエーテルおよびガドリニウム錯体を含むことを特徴とする乳酸 - グリコール酸共重合体 (P L G A) 粒子。

【請求項 2】

パーフルオロクラウンエーテルは、パーフルオロ - 15 - クラウン - 5 - エーテル、パーフルオロ - 12 - クラウン - 4 - エーテル、およびパーフルオロ - 18 - クラウン - 6 - エーテルからなる群から選択されることを特徴とする請求項 1 に記載の粒子。

【請求項 3】

ガドリニウム錯体は、ガドテリドールであることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の粒子。 10

【請求項 4】

薬剤、受容体リガンドまたは抗体などの、治療因子または標的化因子を含むことを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の粒子。

【請求項 5】

蛍光色素のような色素または放射性核種などの検出因子を含むことを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の粒子。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の粒子を多数含む粒子状物質であって、平均粒子径が、100 ~ 300 ナノメートル、好ましくは 150 ~ 250 ナノメートルの間の値であり、たとえば、200 ナノメートルであることを特徴とする粒子状物質。 20

【請求項 7】

界面活性剤を実質的に含まないか、または界面活性剤を含まないことを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の粒子、または請求項 6 に記載の粒子状物質。

【請求項 8】

インビトロイメージングにおける、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の粒子または粒子状物質の使用であって、前記イメージングは、画像診断、転移または血管系のイメージング、定量的イメージング、治療的イメージング、細胞ワクチンのイメージング、細胞治療のイメージング、樹状細胞ワクチンのイメージング、幹細胞のイメージング、ベータ膵島細胞のイメージング、音響イメージング、光音響イメージング、超音波イメージング、光学コヒーレンスイメージング、MRI イメージング、多核 MRI イメージング、¹⁹F イメージング、¹H イメージング、T₁、T₂ および T₂* 強調イメージング、光子密度強調イメージング、SPECT、PET、シンチグラフィ、生物発光イメージング、ならびに蛍光イメージングからなる群から選択されることを特徴とする使用。 30

【請求項 9】

インビボイメージングにおける、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の粒子または粒子状物質であって、前記イメージングは、画像診断、転移または血管系のイメージング、定量的イメージング、治療的イメージング、細胞ワクチンのイメージング、細胞治療のイメージング、樹状細胞ワクチンのイメージング、幹細胞のイメージング、ベータ膵島細胞のイメージング、音響イメージング、光音響イメージング、超音波イメージング、MRI イメージング、多核 MRI イメージング、¹⁹F イメージング、¹H イメージング、T₁、T₂ および T₂* 強調イメージング、光子密度強調イメージング、SPECT、PET、シンチグラフィ、生物発光イメージング、ならびに蛍光イメージングからなる群から選択されることを特徴とする粒子または粒子状物質。 40

【請求項 10】

インビトロ細胞標識、インビトロ顕微鏡、血管系もしくはかん流のインビトロイメージング、またはインビトロ組織学のための、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の粒子または粒子状物質の使用。

【請求項 11】

インビボ細胞標識、インビボ顕微鏡、血管系もしくはかん流のインビボイメージング、 50

またはインビボ組織学における使用のための、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の粒子または粒子状物質。

【請求項 1 2】

治療因子のインビボ送達における使用のための、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の粒子または粒子状物質。

【請求項 1 3】

疾患の治療または予防における使用のための、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の粒子または粒子状物質。

【請求項 1 4】

前記疾患は、癌、循環器疾患、心臓病、脳卒中およびかん流病変、移植後の移植片拒絶、免疫疾患、自己免疫疾患、ならびに血管疾患からなる群から選択されることを特徴とする請求項 1 3 に記載の使用のための粒子。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、医用画像を向上させる造影剤に関する。特に、提供される造影剤は、細胞イメージング、細胞治療、インビボ標的化、および薬剤送達用途に有用である。

【背景技術】

【0002】

細胞治療は、糖尿病、心臓病、および癌などの疾患を潜在的に治療する非常に将来有望な分野である。細胞治療の何らかの形態に関する進行中の臨床試験は 15,000 を超える (www.clinicaltrials.gov)。細胞治療の発展および最適化における主要なハードルは、非侵襲的な方法で、患者の体内における細胞を一度に観察するための手段が不足していることである。

20

【0003】

イメージングは、患者の体内において治療細胞を、それらの生存能力、局在、数および機能性の観点から、一度に観察するための臨床的に利用可能な解決法を提供するかもしれない (Srinivas M, Aarntzen EH, Bulte JW, Oyen WJ, Heerschap A, de Vries IJ, Figdor CG. Imaging of cellular therapies. Adv Drug Deliv Rev. 2010 Aug 30;62(11):1080-93 を参照)。

30

【0004】

¹H MRI、¹⁹F MRI、蛍光イメージング、ならびに超音波および光音響イメージングのような音響イメージング技術などの多くのイメージング技術を用いて細胞を可視化することができるように、細胞を標識化するために最適な薬剤を開発することが試みられている。

【0005】

医用イメージング法における超音波の使用は、当分野でよく知られている。それは最も頻繁に使用される臨床画像診断技術である。超音波は、確立された安全記録を有する経済的で非侵襲的なリアルタイム技術として知られている。それは長期的研究に使用することができ、反復使用は身体にとって有害ではない。超音波装置はイオン化放射線を全く発生せず、それらの操作は放射性同位体の使用を伴わない。超音波イメージングを実施するための装置は、携帯することでき、既に広く使用されている。超音波イメージングは潜在的に定量的であり、それは全身イメージング技術ではなく、したがって、標的の器官に限定される。超音波イメージングは、画像深度に関して限定される。

40

【0006】

典型的には、気体が充満した微小気泡が、超音波イメージングにおける造影剤として採用される。それらは通常、比較的大きな寸法 (1000 ~ 10000 nm の直径) を有し、一般的には細胞標識化に不向きである。さらに、それらは、たとえば腫瘍イメージングなどにおける小さな血管をイメージングすることにも不向きである。そのような気体が充満した微小気泡は短い存続期間を有し、典型的には数秒から数分である。それらは、気泡

50

が破裂するときに細胞に損傷が生じるというさらなるデメリットも有する。さらに、気体が充満した微小気泡は不安定であるので、それらは非常に長い時間保存することができず、それらは典型的には水和後直ちに使用しなければならない。最後に、そのような大きな薬剤は、血液循環に残しておくことができないので、インビボ標的化または薬剤送達用途のための非常に限定された機会を提供する。それらの大きな寸法は、腎臓による迅速なクリアランスを促進し、インビボにおけるそれらの有用な存続期間をさらに制限する。

【0007】

超音波造影剤、およびそれらの使用は、超音波造影剤：基本原理において概説されている (Eur J Radiol. 1998 May;27 Suppl 2:S157-60 and Kiessling et al., Theranostics 2011, volume 1, 127-134)。

10

【0008】

米国特許出願第20100158815号明細書は、細胞の超音波可視化を向上するために細胞に内在化される造影剤の使用を記載している。このことは、しかしながら、造影剤が気体であり、数時間を超える細胞追跡について不安定であるという本来的なデメリットを有する。

【0009】

米国特許出願第20110020239号明細書は、イメージング用途のためにエクスピボで細胞を標識化するための方法を提供しているが、特定の造影剤を何も詳細に記載していない。

20

【0010】

今日まで記載された多くの造影剤にもかかわらず、細胞イメージング、好ましくは、超音波および光音響イメージング技術に適切な、安定で、手頃な価格の、効果的な造影剤が非常に必要とされている。細胞を、検出のための、好適なトレーサーまたは造影剤で標識化することができれば、これらの両者は、治療細胞を観察する申し分のない方法である。その技術は、好ましくは定量的であるべきである。さらに、安定な超音波造影剤は、超音波血管造影法、腫瘍イメージングなどにも応用することもできる。

【発明の概要】

【0011】

発明者らは、粒子の超音波および光音響可視化は、粒子が金属と組み合わせたフッ素化有機化合物を含む場合に非常に向上することを見出した。

30

【0012】

そのような粒子は、光音響および超音波イメージング、T1およびT2強調画像を含む、19Fイメージング、1HイメージングなどのMRIイメージング、SPECT、PET、シンチグラフィ、ならびに蛍光イメージングなどの、定性的または定量的イメージングにおいて有利に採用されてもよい。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明者らは、本明細書において、超音波および他の検出法に使用するための改良された造影剤を提供する。本発明者らは、本明細書において、金属と組み合わせたフッ素化有機化合物を含む粒子を記載している。本発明者らは、液体パーフルオロカーボンと金属とを含む乳酸-グリコール酸共重合体(PLGA)粒子の例を示す。そのような粒子は、超音波イメージングに限らず、MRIイメージング(1Hおよび19F)において向上された性能を有することが示された。粒子は、蛍光色素、またはルシフェラーゼ(もしくはルシフェラーゼをコードする核酸)のいずれかが粒子内に組み込まれた場合、蛍光イメージング、または生物発光を用いて検出されてもよい(Pharm Res 2004; 21:354-364)。

40

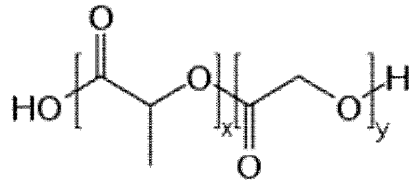
【0014】

用語「乳酸-グリコール酸共重合体」またはPLGAは、当該技術分野において認められている用語であり、可変の長さおよび組成の、乳酸およびグリコール酸モノマーの生分解可能なポリマーを意味する。PLGA粒子は、たとえばポリエチレングリコール(PEG、Curr Drug Deliv. 2004 Oct;1(4):321-33)などの追加のポリマーを含んでもよい。

50

PLGA粒子は、当分野において知られており、イメージングにおける使用が記載されている（たとえば、Biomaterials. 2010 Sep;31(27):7070-7）。PLGAの構造は、化学式1で示される（xおよびyは、それぞれ乳酸およびグリコール酸の単位の数を示す）。

【化1】



10

【0015】

気体が充満したPLGA粒子は、超音波における使用も提案されている。中国特許出願第101574530号公報は、PLGA-PEG-PLGAマルチポリマー微小気泡超音波造影剤の使用であって、微小気泡がパーフルオロプロパン、デカフルオロブタン、または六フッ化硫黄などの気体を含む使用を記載している。

【0016】

本発明者らは、液体フッ素化有機化合物を含む、乳酸-グリコール酸共重合体（PLGA）粒子は、超音波および光音響イメージングに特に適しており、そのような粒子の性能は、金属が粒子中に存在する場合に顕著に向上し得ることを見出した。

20

【0017】

本明細書において使用されるような、用語「a」または「an」は、少なくとも1つを表す。したがって、フッ素化有機化合物は、1つ以上のフッ素化化合物として解釈されるべきである。

【0018】

用語「粒子」は、当分野における通常の意味で本明細書において使用される。この用語は、具体的には、マトリックスポリマーの物理的特性によって、室温において乾燥した固体形態であるポリマー粒子を表す。

【0019】

Invest Radiol. 2006 Mar;41(3):305-12, Radiology. 2013 Aug;268(2):470-80などの刊行物、さらにいくつかの刊行物は、本明細書に記載されたような「粒子」ではない「パーフルオロカーボンエマルジョン滴」を記載するために用語「パーフルオロカーボンナノ粒子」を使用している。唯一つの刊行物W02912/113733は、特定のパーフルオロカーボンおよびガドリニウム造影剤を含む実際の粒子を列挙している。しかしながら、パーフルオロカーボンは、不活性担体として作用し、活性剤ではなく、粒子は肝細胞癌における¹H MRIに限定される。

30

【0020】

したがって、リポソーム、ミセル、およびエマルジョン滴は、本明細書にて使用される用語である粒子には含まれない。なぜなら、これらは、液体でもある分散相の上の液体表面被覆（典型的には液体）からなるからである。本発明に係る粒子は界面活性剤を含まず、反復される凍結融解および凍結乾燥サイクルにも適している。エマルジョン滴は、凍結乾燥によって無傷に回復させることができず、エマルジョンは、軟凝集、クリーム化、癒着、およびオストワルド成長にさらされる。これらの効果は、本明細書において液体連続層に分散した固体として定義される「ゾル」としても知られる液体培地における粒子には当てはまらない。

40

【0021】

さらに、本発明に係るもののような実際の粒子は、沈殿によって無傷に回復させることができない微小液滴の分散を含むエマルジョンとは異なり、沈殿させることができる。エマルジョン液滴は、生物学論文において、頻繁に不適切に「粒子」または「ナノ粒子」と

50

称されるが、この用語は化学的に不正確であることに留意すべきである。

【0022】

また、本明細書において使用されるような用語である粒子は、体積または質量などの、いくつかの物理的または化学的特性が原因で局在した小さな物体を示す。本発明の粒子は、たとえば50～500ナノメートルなどの、1～1000ナノメートル、好ましくは10～1000ナノメートルの寸法を有するマイクロ粒子またはナノ粒子である。寸法分布は、約100～300などの、好ましくは約50～500ナノメートル、たとえば200ナノメートルの間のピークである。

【0023】

好ましい実施形態において、粒子は生分解可能および/または生体適合性である。

10

【0024】

溶液に共存するいくつかの粒子は、本発明の範囲内である、粒子状物質、またはコロイド状態濁液、またはゾルを形成してもよい。粒子状物質との用語は、ナノ粒子および/またはマイクロ粒子などの粒子から本質的に構成される組成物を示すために本明細書において使用される。

【0025】

本明細書において使用されるような用語「液体」は、標準大気圧(約1000ヘクトパスカル)で体温(37)において単離形態にある場合、化合物の液体物理状態を表す。

【0026】

用語「フッ素化有機化合物」は、1以上の共有結合した炭素およびフッ素原子を含む有機化合物として解釈されるべきである。特に有用なフッ素化有機化合物は、たとえば、フッ素化有機ポリマーである。好ましい実施形態において、フッ素化有機化合物は、パーフルオロカーボンである。

20

【0027】

用語「パーフルオロカーボン」は、実質的に全ての、または全ての炭素-水素結合が炭素-フッ素結合によって置き換えられた、炭素化合物またはポリマーを表す。パーフルオロカーボンは、酸素などの他の元素を含むことができる。特に好ましいパーフルオロカーボンは、パーフルオロポリエーテル、パーフルオロクラウンエーテル、パーフルオロオクタン、およびパーフルオロオクチルプロミドを含む。

【0028】

本明細書において例示されるような特定の用途において、本発明者らはパーフルオロクラウンエーテルを有利に使用した。用語「パーフルオロクラウンエーテル」(PFCE)は、安定な環構造において共有結合した、炭素、酸素およびフッ素を含む環状パーフルオロカーボンとして解釈されるべきである。典型的には、PFCEはポリマーであってもよい。

30

【0029】

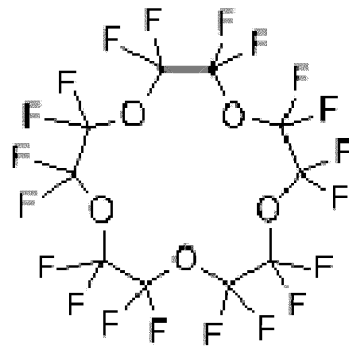
特に有用なパーフルオロクラウンエーテルは、パーフルオロ-15-クラウン-5-エーテルであり、その構造は化学式2で示される。

【0030】

本発明に係る粒子は好ましくは実質的に界面活性剤を含まず、このことは、それらが、0.1%未満、好ましくは0.01%未満、より好ましくは、たとえば0.0001%または0.00001%未満のような0.001%未満の界面活性剤を含むことを意味することに留意すべきである。また、このことは、本明細書において、実質的に界面活性剤を含まないことを示す。好ましくは、粒子は全く界面活性剤を含まない。このことは、本明細書において、界面活性剤を含まないことを示す。

40

【化2】



10

【0031】

超音波および光音響イメージングにおいて、液体フッ素化ポリカーボンを含む粒子の性質は、当該粒子中に金属が含まれる場合、顕著に向上させることが可能であることが見出された。

【0032】

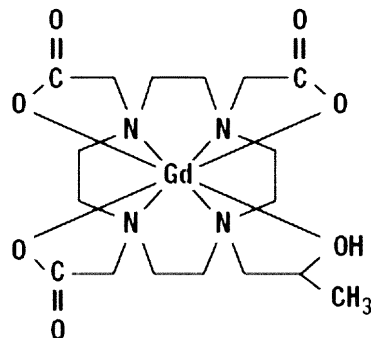
用語「金属」は、遷移金属、アルカリ金属および希土類金属を含む、元素周期律表における金属として定義される元素を表す。特に、それは、金属錯体のような生体適合性のある形態にある金属を表す。特定の好ましい金属は、ガドリニウム (Gd) である。ガドリニウム錯体は、たとえば、ガドテリドールを含む「Prohance (登録商標)」と称される化合物などが市販されている。ガドテリドールの構造は、化学式3に示される。

20

【0033】

したがって、本発明は、実質的に界面活性剤を含まない、好ましくは界面活性剤を含まない粒子であって、パーフルオロクラウンエーテル、およびガドリニウム錯体を含む粒子に関する。特に好ましい粒子は、ポリマーからなる粒子であり、より具体的にはPLGA粒子である。

【化3】



30

40

【0034】

PLGA粒子は、幅広い寸法の範囲で合成されてもよい。有利には、前記粒子は細胞標識が実現可能であるような寸法を有し、特に有利な寸法分布は150~250nmなどの100~300ナノメートル、たとえば約200ナノメートルを含む。本明細書において、用語「約」または「およそ」は、プラスマイナス10%を意味する。この寸法範囲は、インビボ標的化用途のための小さな血管からの溢出に特に有利である。

【0035】

本発明に係る粒子は、インサイチュ (in situ) またはインビボ細胞標的化のために、およびそれらがターゲティング試薬を有利に含む目的のために適していることが見出され

50

た。

【0036】

用語「ターゲティング試薬」は、本明細書において、インビボまたはインビトロにおいて、特定の細胞もしくは細胞腫に、または関連部位に粒子を向ける試薬を表す。特に有用なターゲティング試薬は、抗体および受容体リガンドを含む。

【0037】

粒子は、超音波の他の方法によって検出されてもよい。粒子は、蛍光色素または他の試薬の添加なしに、光音響イメージングを用いて検出することができる。驚くべきことに、本発明者らは、PFCを有するPLGA粒子が、ガドリニウムなどの金属の添加によって向上される信号によって光音響イメージングを用いて検出することができることを見出した。吸収ピークは約706nmで生じる。色素、またはIC-Green（登録商標）などの光音響造影剤の添加が可能である。これらは、PLGA粒子中のPFCとして、同一または異なるピーク波長で吸収するために選択することが可能である。また、本発明者らは、たとえば、マウスにおける筋肉注射の後などにインビボで粒子を検出することができることを見出した。粒子で標識された細胞は、光音響イメージングを用いて、インビボおよびインビトロファントムの両方で検出することも可能である。PFCを含むPLGA粒子は、インビトロおよびインビボの両方で光音響イメージングを用いて検出するに足り、この効果は、金属の添加によって向上される。好適な粒子の例は、PFCおよびガドテリドールを含む、約200nmの直径のPLGA粒子である。

10

【0038】

本発明者らは、前記粒子がMRIイメージングにも適していることを見出した。本明細書において「MRIイメージング」は、磁気共鳴映像法を意味し、1Hおよび19Fイメージングなどの多核イメージングを含む。さらに、イメージングは、T1、T2、またはプロトン密度強調であってもよい。

20

【0039】

本発明に係る粒子は、蛍光色素、もしくは蛍光タンパク質、または蛍光試薬をコードする核酸などの色素も含み得る。このことは、インビボだけではなく、組織学的分析または他の顕微鏡分析も含む、粒子の蛍光イメージングを可能にする。

【0040】

粒子を検出する他の方法は、粒子に放射性核種を組み込むことである。このことは、オートラジオグラフィ、シンチグラフィ、SPECT、PET、または放射性化合物を検出することができる他の検出方法を可能にする。また、ルシフェラーゼ酵素、またはルシフェラーゼ（または類似の酵素）をコードする核酸ベクターを組み込むことによって、生物発光をインビボ検出に使用することができる。

30

【0041】

粒子は、光コヒーレンストモグラフィを含む光コヒーレンス技術を用いて検出することもできる。

【図面の簡単な説明】

【0042】

【図1】PFC、ガドリニウム、およびIC-Green（登録商標）を有するPLGA粒子の粒径分布を示すグラフである。平均径は、181nmであった。プロットは、6つの独立測定の結果を示す。密接な重なりは、高い再現性を示す。

40

【図2】MI値を高めたゲルにおける粒子の画像である。超音波画像は、脱気水（ネガティブコントロールとして、気体を除去した水）、PFC（パーフルオロ-15-クラウン-5-エーテル）を含むPLGA粒子、またはPFCおよびガドリニウム（PFC-Gd）、ならびに通常の水道水（溶解空気を有し、明るく見える）を示す。画像の解釈は、下部の表として提供され、+は脱気水コントロールと比較した陽性シグナルを示し、-は陰性シグナルを示す。

【図3】、高（MI = 2.0 黒）および低エネルギー（MI = 0.1 灰）超音波に30秒間さらされた後の、直径、計数率、またはPDI（多分散性係数、直径の分布の広が

50

り因子)の変化を示す図である。高および低ガドリニウム含有量(実施例1)を有するPFC Eを含むPLGA粒子が使用され、ガドリニウムなしのPLGA粒子に比較された。グラフは、低および高超音波エネルギーにさらされた後の初期の粒径の割合として描かれている。初期の粒径は、180nmであった。超音波にさらされた後のわずかな変化は、細胞標識化および他の用途に容認可能な範囲内である。

【図4】コントラストに基づいて粒子の濃度の効果を示す図である。粒子は、アガロースゲルのウェルにおいて低エネルギー(MI=0.2)超音波にさらされた。PFC Eおよびガドリニウムを含むPLGA粒子は1mlあたり20mgで容易に可視化されたが、1mlあたり2および0.2mgの濃度はあまり見えなかった。PFC Eは、金属を添加することなく、PFC Eを含むPLGAを含む粒子を有するウェルを示す。画像は、ウェルの底における粒子の沈降または凝固を防ぐために粒子の添加直後に撮影された。データは、定量化に利用することができる粒子濃度と画像コントラストとの間の関係を示す。

【図5】本発明に係る粒子と、従来技術のコントロールとによって実施されたエクスピボ実験の画像である。本発明に係る粒子は、肝組織に注入され、超音波によって可視化された(MI=0.2)。画像は、注入の直後に撮影された。5分後に撮影された画像は、全く変化を示さなかった。合成の間(高、中、および低、実施例1)に添加されたGdの様々な量を有するPFC E粒子が、BR14粒子と共に採用された。BR14は、市販の微小気泡造影剤である。注入領域は、囲みによって示される。

【図6】本発明に係る粒子を採用するエクスピボ実験の画像である。PFC Eおよび高いGd含有量を有するPLGA粒子は、実施例1に記載されたように実質的に作製された。肝組織は、200マイクロリットルの脱気水(矢印)、または5mgの粒子を含む200マイクロリットルの水を注入された。画像は、注入の直後(左パネル)、および2時間後に室温(右パネル)で取得された。粒子に由来するコントラストは、明確に見ることができ、経時変化を示さなかった。

【図7】実施例10に記載されたようなBR14微小気泡のAモード超音波キャラクタリゼーションを示すグラフである。囲みは、試料上の関連領域を示す。これらの囲み内のシグナル(すなわちピーク)は、試料が超音波活性であることを示す。

【図8】実施例10に記載されたようなSonovue(登録商標)微小気泡のAモードキャラクタリゼーションを示すグラフである。Sonovue(登録商標)は、臨床用途に販売される市販の超音波微小気泡造影剤である。囲みは、試料上の関連領域を示す。これらの囲み内のシグナル(すなわちピーク)は、試料が超音波活性であることを示す。

【図9】実施例10に記載されたような本発明に係る粒子のAモードキャラクタリゼーションを示すグラフである。囲みは、試料上の関連領域を示す。これらの囲み内のシグナル(すなわちピーク)は、試料が超音波活性であることを示す。

【図10】本発明に係る粒子を有する細胞の標識化を示す画像である。樹状細胞は、実施例11に記載されたような、本発明に係るPLGA粒子で標識された。細胞は、標識されない(左パネル)か、またはPFC Eおよびガドリニウムを含むPLGA粒子によって標識された(右パネル)。PFC E-Gd標識された細胞は、明確に見ることができる。非標識化細胞は、背景上に見えなかった。円は、細胞のある領域を示す。

【図11】本発明に係る粒子が多型細胞イメージングに適していることを示す画像である。PFC E、高ガドリニウムおよびICGを含むPLGA粒子で標識された200万個の初代ヒト樹状細胞は、超音波(左パネル)、蛍光イメージング(第2パネル)、および磁気共鳴イメージング(MRI、第3、第4、および第5パネル)を用いて可視化することができた。蛍光画像は、グレースケール画像における蛍光領域を示すために編集された。3つのMRIパネルは、(左)T1強調1H MRI画像(細胞のある高信号領域は、矢印によって示される)、(中央)標識された細胞のみが見える19F MR画像、および(右)1Hスキャン上に19Fスキャンを重ねたものを示す。

【図12】大腿四頭筋内に本発明に係る粒子の5mgの注入前後におけるマウスの足の超音波画像である。パネルは、注入の直前直後だけではなく、注入の2.5時間後に撮影された画像も示す。矢印は、注入直後と、2.5時間後との両方で検出可能である、粒子に

10

20

30

40

50

起因するコントラストの増加を示す。

【図13】図13(A)は、PLGAポリマー内における、PFCとしてパーフルオロ-15-クラウン-5-エーテル(PFCE)、蛍光色素としてIC-Green(登録商標)およびガドテリドール(Prohance(登録商標)、Bracco社)を含む、約200nmの直径の粒子について粒子のイメージ図である。図13(B)、10mgの様々なPFCが、0.2~1の範囲の様々なMI値における音響コントラストについて試験された。脱気水が陰性コントロールとして使用され、続いて空のPLGA(PFCなし)粒子、様々なPFC、つまりPFヘキサン、PFデカリン、PFOおよびPFCEを有する粒子が使用された。PFCE粒子へのGdの添加は、さらにシグナルを向上する。粒子は、ゲルファントムにおけるウェルにおいて撮影された。図13(C)、Gdの低下した濃度を有する、PFOまたはPFCEを含むPLGA粒子の10mgがブタ肝臓に注入され、撮影された。200 μ lのBR14がコントロールとして注入された。BR14下で生じる減衰領域は、]で示され、これは、全ての粒子に欠けている。図13(D)、PFCE、PFCE-Gd、PFO-GdおよびPFOのみを含む粒子の、0.2、2、および20mgが、ゲルファントムにおいて撮影された。脱気水は、コントロールとして同様に撮影された。粒子から得られる、ウェルにおけるシグナル強度がプロットされ、粒子濃度と音響コントラストとの間の直線関係を示し、PFCE-Gd粒子は非常に高いコントラストをもたらす。図13(E)は、肝組織に100 μ lで注入された、2.5、5、および20mgのPFCE-Gd粒子の超音波画像である。図13(F)は、対応する電子顕微鏡(EM)画像に重ねられた、IC-Green、PFCEおよびGd(それぞれ左から右に)の局在を示すEDX(X線回折を用いる電子顕微鏡)画像である。PFCEおよび色素は、粒子の外端に局在するが、Gd錯体は内部である。スケールバーは、200nmを示す。

10

20

【図14】図14(A)、粒子の19F含有量は、超音波照射後にも測定された。粒子は、1.3のMIにおいて、超音波照射に60秒間さらされた(7.5MHz、0.5cm焦点)。図14(B)、DLSデータは、上述のように、粒子が超音波にさらされた前後に取得された。平均粒子径(nm)、平均計数率(kcps)、およびPDIが示される(上から下)。図14(C)は、超音波エネルギーにさらされた前後の粒子の液滴径分布である。図14(D)は、プローブ音波処理前(左)後における粒子で取得されたSEM画像である。粒子に変化は見られなかった。スケールバーは、500nmを示す。

30

【図15】図15(A)は、エネルギーが増大する超音波を照射された様々な粒子の挙動を示す。結果は水道水の反応に標準化され、Sonvue(Bracco社)微小液滴について、反応は圧力増加として迅速に衰える。これに対して、粒子は、高い超音波圧力において、増加する反応、それらの安定性を示す。高いGd含有量(PFCE-Gdhi)を有する粒子が最高の性能を示す。液体PFCEは、コントロールとして使用された。図15(B)は、側面および上部から設定した模式図である。粒子の分散は、長方形のガラスキャピラリ中に流されて安定化され、圧電材料が、波節または波腹に粒子を集める微小流路において低常波を生じるために使用される。下部パネルは、時間内に右から左までの粒子における集束効果を描写する。実際の実験において、粒子は流路で動かず、流路全体において同時に集束する。図15(C)は、PFCE-Gd粒子(左)とPFOB粒子(右)との試料についての処理後の画像の例である。図15(D)、様々な粒子の散乱断面積は、粒子の寸法の関数として、被覆された気泡の散乱断面積と比較して、剛体球理論を用いて計算された。四角記号は、放射圧の正記号を示し、キャピラリの中央に向けた動きに変わり、一方円は、放射圧の負記号を示す。

40

【図16】図16(A)は、PFCE、IC-Green、およびGdを含む粒子で標識された200万個のDCの、蛍光、1Hおよび19F(疑似色)MRI、ならびに超音波イメージングである。細胞は、イメージング前にエクスピボにおいて肝組織試料に注入された。図16(B)、1000万個のDCが粒子で標識され、ウェルにおいて超音波を用いて示され、撮影された。図16(C)、0.2~300万個の細胞がPFCE、Gdを含む粒子で標識され、ゲルファントムにおいて超音波を用いて撮影された。標識および非

50

標識細胞について得られるシグナル強度がプロットされる。

【図17】図17(A)は、PFCE-Gd粒子(矢印)の5mgの注入の前、直後(0時間)、および注入の2.5時間後の大腿四頭筋の超音波画像である。マウスは、注入後に拘束されず、自由に動けるようにされた。図17(B)は、0.1mgのPFCE-Gd粒子の注入の前(左)および後(右)のマウスの鼠径リンパ節の高周波超音波画像である。節の平均コントラストは、注入後、任意単位あたり230から2662まで変化した。図17(C)、マウスは、20mgのPFCE-Gd粒子を皮下注射にて注入され、2週間観察された。画像(上から下)は、1匹のコントロールと2匹の注入マウスとの、腎臓、脾臓、肝臓、および流入領域同側または反対側鼠径リンパ節である。さらに、マウスは、体重または行動において全く変化しなかった(図示せず)。

10

【実施例】

【0043】

実施例1: パーフルオロ-15-クラウン-5-エーテルを含む粒子の作製
PLGA(0.09グラム)をガラス管内で3mlジクロロメタンに溶解した。液体のパーフルオロ-15-クラウン-5-エーテル(890マイクロリットル)を、水で希釈されたProhance(登録商標)(ガドリニウムの3mg/ml溶液)の50ml溶液に続いて添加した。任意に、蛍光色素などの追加の試薬をこの段階でフルオロカーボンに添加してもよい。蛍光粒子が求められる場合、1mgのICGまたはIC-Green(インドシアニングリーン、Akorn Pharmaceuticals社)が溶液に添加された。

【0044】

以下に詳細に記載されるように、本発明者らは、ガドリニウムの、高、中、低含有量の粒子を作製した。この目的のために、上述のProhance(登録商標)水溶液は、それぞれ11.5、5.75、および2.85mlのProhance(登録商標)に水を加えて50ml溶液にした。続いて全混合物を、一定の超音波処理(Branson Digital Sonifier 250; 60秒間のオンおよび10秒間のオフで3分間サイクル、20の最大温度で、30%振幅; カップホーンが使用された)の下において25mlのポリビニルアルコール水溶液(20グラム/リットル)に滴下して加えた。得られるエマルジョンは、続いて4で置かれ、24mlの溶液が残るまで約12時間一定に攪拌して蒸発させられた。等しい体積の水が続いて添加され、エマルジョンは4において30分間21000gで遠心された。ペレットは水で2回洗浄され、残った懸濁液は-60で少なくとも24時間凍結乾燥された。粒子は続いて、密封された試験管に入れられ-80で保存された。特に明記しない限り、本明細書に記載された実験において使用される粒子は、高いガドリニウム含有量を有する。

20

30

【0045】

実施例2: 粒子のキャラクタリゼーション

本発明者らは、上述のように作製された粒子が、乾燥形態で-20において保たれる場合、少なくとも1年間安定であることを見出した。また、粒子は、マイナス4において少なくとも3ヶ月間にわたって作業濃度で溶液内において安定であった。

【0046】

実施例1に従って作製される粒子の直径は、以前に記載されたように(Biomaterials, 2010 Sep;31(27):7070-7)動的光散乱法(DLS)を用いて測定された。図1は、181nmにおいて鋭いピークを有する、80~500nmの範囲の寸法の粒子を示す。図1は、個別の独立した6つの合成の結果を示す。結果は同一であり、全ての曲線は実質的に重なり、高い再現性を示す。粒径分布は、数カ月間安定であった。粒子は、凍結乾燥され、保存のために凍結された。しかしながら、水(凍結)中のアリコートとして保存された粒子も安定であった。

40

【0047】

実施例1に従って作製され、高および中程度のガドリニウム含有量を有する粒子は、1mg/mlの濃度で水中に溶解され、超音波イメージングの条件下において非常に安定であると考えられる。本発明者らは、低および高超音波MI(MI=0.1および2.0)

50

に30秒間さらされる前後の粒径および計数率(粒子の数の指標)を測定した。計数率は、粒子が超音波によって破壊されたか否かにかかわらず試料あたりの粒子の数を概略で示す。計数率は、Gd含有量の増加が超音波にさらされた粒子の安定性を向上させることを示す。本発明者らは、30秒間の高エネルギー超音波にさらされた後、直径、計数率、またはPDI(直径の分布の広がり因子)が変化しないことを見出した(図3)。

【0048】

図3に示されたデータから、本発明に係る粒子は最も厳しい超音波条件下でさえ安定であり、Gd含有量の増加は超音波照射に対する粒子の安定性を向上すると結論付けられる。

【0049】

実施例3:インビトロ超音波イメージング

7.5MHzの中心周波数を有する線形配列トランスデューサ(L11-3)が全ての超音波スキャンに使用された(SONOS 7500, Philips Medical Systems, Best, The Netherlands)。MIは、示されるように0.1~2.0まで変動した。ゲインは通常、90%に設定された。

【0050】

ゲルファントムは、8%ゼラチン(Dr. Oetker, Ede, The Netherlands)、および2%寒天(Agar Powder CMN, Boom社, Meppel, The Netherlands)溶液で構成された(これらのゲルは超音波画像において明るく示された)。

【0051】

超音波照射は、0.2~1までの範囲のメカニカルインデックス(MI)で実施された。MIは、どれだけのエネルギーが撮影の間に、対象または試料に移動されたのかを示す安全測定基準である。臨床上の限界は、診断撮影について1.9、産科スキャンについて1.0である。

【0052】

実施例4:エクスピボ超音波イメージング

中心周波数7.5MHzを有する線形配列トランスデューサ(L11-3)は、全ての超音波スキャンに使用された(SONOS 7500, Philips Medical Systems社, Best, The Netherlands)。MIは、示されるように、0.1~2.0まで変動した。ゲインは通常、90%に設定された。

【0053】

実施例5:インビボ超音波イメージング

中心周波数7.5MHzを有する線形配列トランスデューサ(L11-3)は、全ての超音波スキャンに使用された(SONOS 7500, Philips Medical Systems社, Best, The Netherlands)。MIは、示されるように、0.1~2.0まで変動した。ゲインは通常、90%に設定された。

【0054】

実施例6:ガドリニウムは、粒子の超音波可視性を向上する。

PLGA/PFCE粒子は、高いGd含有量で実施例1に従って作製され、実施例3の手順に従って超音波可視性について試験された。結果は、図2に示される。ガドリニウムの添加が超音波シグナルを向上することが示される。ガドリニウムの添加は、フッ化有機化合物を含む粒子の超音波可視性の向上を提供すると結論付けられる。

【0055】

実施例7:定量

高いGd含有量で実施例1に従って作製されたPLGA/PFCE粒子は、実施例3の手順に従って超音波可視性について試験された。様々な濃度の粒子、20、2および0.2mg/mlが水で希釈されて使用された。その結果は、図4に示される。そこには、超音波シグナルが、使用された粒子の濃度に比例することが示されている。本発明に係る粒子は、定量的超音波イメージングにおいて有用であると結論付けられる。独立した実験において、本発明に係る粒子で標識された場合、わずか200,000個の細胞を可視化する

10

20

30

40

50

ことができることが確認された。

【0056】

実施例8：従来技術との比較

液体PFC Eと、高、中、および低量のガドリニウムとを含むPLGA粒子は、実質的に実施例4の手順に従って、ブタ肝臓に注入され、超音波によって可視化された(MI = 0.2)。比較のために、ブタ肝臓は、市販されている、パーフルオロブタンガスコアを含むBR14 (Bracco Diagnostics社) 3000nm粒子も注入された。

【0057】

本発明者らは、超音波照射によって破壊されない粒子を含むGdの定量的反応を観察した。この点について定量的とは、シグナルが粒子のガドリニウム含有量の増加によって増加することを意味する。さらに、本発明に係る粒子は、ガスコア粒子によって通常得られるような、いわゆる影を生じない。この影効果は、特にBR14注入領域の下部に存在した(図5)。本発明者らは、本発明に係る粒子が、超音波照射によって破壊されないとの定量的反応のレベルと、影の欠如との両者において、従来技術に比較して有利な特性を提供すると結論付ける。後者は、調査中の領域のはるかに詳細な分析を可能にする。

10

【0058】

実施例9 本発明に係る粒子は、長時間見え続ける。

実施例1に従って作製される粒子(200マイクロリットルの水において高いガドリニウム含有量を有する粒子5mg)は、実施例4の手順に従って肝臓に注入された。水は、コントロールとして注入された。図6における結果は、粒子が肝臓において室温にて2時間後でさえも明確に見えることを示している。気体状コアを含む従来の造影剤は通常、超音波エネルギー照射下において非常に短い存続期間を有する(Phys Med Biol. 2009 Mar 21;54(6):R27-57)。本発明者らは、図6のデータから、本発明に係る粒子は、超音波イメージングにおいて長く残るシグナルを提供すると結論付けた。影効果の欠如も、この実験において確認された。

20

【0059】

実施例10；従来技術の粒子との直接比較

従来技術の造影剤を含む試料は、本発明に係る造影剤と比較された。述べられたような薬剤(図7におけるBR14、図8におけるSonovue、図9におけるPFC Eおよび高ガドリニウムを含むPLGA粒子)は、超音波にさらされ、得られたエコーは記録されプロットされた。Aモードまたは振幅モードは、標準的な超音波キャラクタリゼーション技術である。y軸は、受信シグナルの振幅を表し、x軸は時間である。エコーは、容器の壁、および他の接触面からも生じる。(試料を含む)関連領域は、画像において囲みによって示される。データは、4種類の異なる電圧で示される(異なるMI値と等価である)。このプロットは、BR14、ならびにSonovue微小気泡(両方とも市販されている)、ならびに実施例1に記載されたように作製された、PLGA/PFC EおよびGd粒子について示される。

30

【0060】

全ての試料は、200ul中に5mgであった。試料は、5MHz集束トランスデューサ(Panametrics NDT A308S, 1.5 inches focal distance)を備える水槽の保持体に置かれた。トランスデューサは、パルス受信機(Squarewave 5066PR)に接続され、単一パルスで作動する遅延発生器(BNC delay generator model 575)によって駆動される。受信機の出力は、単一モードに設定されたオシロスコープ(Tektronix 4034)に転送された。焦点は、保持体の中央(すなわち、試料)に設定され、後方散乱シグナルが記録された。周波数は5~6MHz(トランスデューサの中心周波数)に設定され、電圧は100~400Vまで変動された。得られたデータは、ヒルベルト変換を用いて処理された。

40

【0061】

データは、本発明に係るガドリニウム含有粒子が、市販試薬に比較した優れた性能ではない場合、同等の性能を有することを示す。さらに、市販試薬は、実験によって破壊されたが、本発明に係る粒子は破壊されなかった。

50

【 0 0 6 2 】

実施例 1 1 細胞標識

本発明者らは、Biomaterials. 2010 Sep;31(27):7070-7 and NMR Biomedに実質的に記載されたような粒子を有する初代ヒト樹状細胞 (D C) を標識した。そこで、細胞の標識は、コアに金属なしにフッ素化ポリカーボンを含む P L G A によって説明される。本発明者らは、本発明に係る粒子に使用されるような追加の金属が、細胞の、生存性、表現型、機能性、および移動能に影響をもたらさないことを見出した。また、粒子を取り込んだ細胞は、粒子の金属含有量によって影響を受けない。このことは、驚くべきことである。なぜなら、P L G A のみが露出されるからである。さらに、粒子の実際の金属含有量は微量であり、細胞に影響を与えとは予測されない。1 0 0 万個の細胞あたりに送達される全ガドリニウム量は、インビボにおける使用についてガドリニウムの承認された臨床容量より 1 0 0 倍近く低い。

10

【 0 0 6 3 】

1 0 0 0 万個の標識された樹状細胞 (D C) は、アガロースゲル中のウェルにそれらを設置することによって撮影された。ここで、本発明者らは、細胞が非常に迅速に底に沈降するときにウェルの底を撮影した。結果は、図 1 0 に示される。本発明者らは、細胞が、超音波イメージングにおいて、本発明に係る粒子を用いて良好に可視化されてもよいと結論付ける。

【 0 0 6 4 】

実施例 1 2 多様な細胞イメージング

本発明に係る粒子で標識された細胞は、超音波イメージング、蛍光イメージング、および M R I を用いてエクスビボで可視化された。

20

【 0 0 6 5 】

蛍光色素を含む粒子は実施例 1 に従って作製され、多様なイメージングにおいて使用された。結果は、図 1 1 に示される。本発明に係る粒子は、蛍光イメージングにおいて追加の色素を含む場合、超音波および M R I (1 H および 1 9 F の両方) で可視化される。超音波画像：細胞は、明るい白いスポットである。蛍光：アスタリスク (*) は細胞を示す。蛍光色素、I c G の存在は、蛍光イメージングを可能にする。M R I : T 1 コントラスト (矢印) は、G d によって生じ、1 9 F シグナルは、P F C E から生じる (疑似色) 。

【 0 0 6 6 】

実施例 1 3 顕微鏡および組織学分析

蛍光色素を含む粒子は、実施例 1 に従って作製され、Biomaterials. 2010 Sep;31(27):7070-7 and NMR Biomed. 2012 Sep;25(9):1095-103に実質的に記載されたように組織学的分析において使用された。その中で、細胞の標識は、コアにおける金属なしに、フッ素化ポリカーボンを含む P L G A 粒子によって表わされる。本発明者らは、本発明に係る粒子の、細胞内およびインビボ挙動に相違がないことを見出し、本発明の粒子への蛍光色素の添加は、粒子の細胞内研究だけではなく、インビボ移送後の組織学的分析を可能にする。

30

【 0 0 6 7 】

実施例 1 4 インビボイメージング

粒子は、高いガドリニウム含有量で、実施例 1 に従って作製された。粒子の 5 m g は、大腿四頭筋に注入され、実施例 5 の手順に従って超音波画像を得た。図 1 2 は、注入前、注入直後、注入の 2 . 5 時間後の結果を示す。粒子はインビボで容易に見ることができ、2 . 5 時間後でさえも粒子に起因するコントラストは持続すると図 1 2 から結論付けてもよい。

40

【 0 0 6 8 】

実施例 1 5 さらになる実験

粒子は、約 2 0 0 n m の直径を有する P F C 封入 P L G A からなる。蛍光色素または可溶性金属錯体などの追加の部分を添加することができる。本発明者らは、P F C としてパーフルオロ - 1 5 - クラウン - 5 - エーテル (P F C E) 、およびガドテリドール (可溶性 G d 錯体 ; Bracco Diagnostics 社) を含む粒子 (図 1 3 A) に注目した。なぜなら、この

50

組み合わせは超音波および¹⁹F MRIについて最も良いコントラストをもたらしたからである。蛍光色素IC - Green (Akorn社)も含まれるが、音響コントラストに必須ではない。様々なPFCを有する同様のPLGA粒子は、様々な値のメカニカルインデックス(MI)のゲルファントムにおいてインビトロで試験された(図13B)。本発明者らは、Gd錯体を有するPFCE粒子(PFCE - Gd)が全てのMIで最も高いコントラストを示すことを見出した。本発明者らは、Gd含有量が超音波コントラストに影響を与え(図13C)、1mgのPFCE粒子あたり40、20、10、および0μgの濃度のGdが試験された。最も高いGd含有量は、最も良いコントラストをもたらす。粒子の¹⁹F含有量は、 8×10^{18} ¹⁹F / s / mgで一定のままであった。ここで、BR14微小気泡(Bracco社)は、基準として使用された(約3000nmの平均径を有するパーフルオロブタン気体微小気泡)。PFO粒子は、陰性コントロールとして使用された。さらに、粒子は、顕著に高い散乱減衰率(STAR)を示し、粒子に基づく減衰のより小さな領域によって示される(画像におけるBR14下で強調される)。全てのさらなる実験は、最も高いGd含有量を有するPFCE粒子を用いて実施された(PFCE - Gd_{hi}、特に示されない限り)。図1dおよびeにおいて、粒子は、ゲルファントムにおいて、またはインビトロ組織試料における注入後のいずれかで撮影された。図13Dは、陰性コントロールとして脱気水を用いて、粒子濃度とコントラストとの間の関係を分析したものである。試料上に目的の領域についてのシグナル強度(ROI)が比較のためにプロットされた。同様の実験が組織に注入されたPFCE - Gd粒子のみを用いて実施された(図13E)、濃度とシグナルとの間の明確な関係も存在した。最後に、本発明者らは、対応する電子顕微鏡(EM)画像に重ねられたPFCE - Gd粒子のエネルギー分散型X線分光学データ(EDX)を検討した。IC - Green、PFCE、およびGdの分布が示される。Gd、およびより少ない程度でIC - Greenは粒子全体に分布していると考えられるのに対して、PFCEは周辺に沿って一層濃縮されるがPLGAマトリックス内に留まるようである。Gdの分布は、より小さな粒子とは異なり、わずかに異なるGd錯体、ガドベネートジメグルミン(MultiHance; Bracco社)を用いて作製され、GdはPFCEと共に粒子の周辺に沿って限定された(データは示されていない)。興味深いことに、これらの粒子は、超音波画像における向上したコントラストを示さなかった。

【0069】

粒子の安定性

本発明者らは、粒子が、極めて高いエネルギープローブ超音波処理を含む超音波照射に対して安定であることを示す。PFCE - Gd粒子は、インビトロにおいて組織試料に注入され、コントロールとして水道水を用いた(矢印、図6)。試料は、2時間後に迅速に撮影され、室温で置かれた。粒子に由来するコントラストにおける変化は、観察されなかった。(溶解した気泡からの)水道水に起因する全てのコントラストは、組織に広がる液体として、注入直後に消散された。本発明者らは、PFCE、GdおよびIC - Greenを含む粒子、またはPFCEおよびIC - Greenのみを有する粒子のフッ素含有量を、¹⁹F NMRを用いて、超音波エネルギーに60秒間さらされる前後で測定した(図14A)。PFCE含有量における変化はいずれの粒子についても見られず、液体PFCEが蒸発する場合に予想されるように、PFCEは音響コントラストの発生の際に失われないことが示される。さらに、粒径、平均計数率(単位体積あたりの粒子の数の指標)、およびPDI(直径分布の広がり)の測定(図14B)において変化は観察されなかった。これらのデータは、超音波エネルギーによって粒子に影響されないことを示す。図14Cは、超音波照射の前後でPFCE - Gd粒子についての代表的液滴径分布を示す。液滴径分布における変化は、超音波照射によって生じなかった。本発明者らは、EMを用いて粒子を観察した場合、同様に観察されるが、これらの場合、本発明者らは、超音波イメージングよりも非常に高いエネルギー付与が得られるプローブ音波処理に粒子をさらした。最後に、粒子は、DLS特性において、凍結乾燥粉末として、少なくとも6月間変化することなく容易に保存することができる。

【0070】

音響特性キャラクタリゼーション

増加エネルギーの超音波が照射された場合、SonoVue 微小気泡 (Bracco社; 250 nmの平均径を有する六フッ化硫黄気泡) と共に粒子の挙動が測定された (図15A)。微小気泡に対する応答は、気泡の消失によって圧力増加として容易に衰えるが、粒子は反応増大を示す。純水液体PFCEはコントロールとして使用された。試験された他の粒子は、PFCE、ならびに高および低Gd含有量を有するPFCE (PFCE-Gd_{hi} およびPFCE-GD_{lo}) である。

【0071】

音響特性活性および粒子のエコー輝度は、音響放射力に基づく方法を用いて定量化された¹⁶。超音波造影剤によって後方散乱されるシグナル、およびそれに作用する放射圧は同じ起源を有するので、散乱係数の測定は、定義された音響場における変位を測定することによって達成することができる (図15B)。圧電素子は、均一に分散した粒子によって、四角形のガラスキャピラリにおいて定常波を生じるために使用された。超音波の定常波の発生は、数秒内に、それぞれ流路の中央および端部に位置する波節または波腹に向けた移動を誘導する。粒子の動きは、高速カメラによって記録され、分析された (図15C)。

【0072】

音響場におけるランダム粒子に作用する力は牽引力¹⁷、粒子の動きに続く周囲の液体の加速を説明する追加の質量力¹⁸、および粒子の動きを駆動する放射圧を含む。与えられた寸法の粒子の軌跡を決定するために、運動量保存式をこれらの3つの力から書くことができる。第1近似において、粒子は、剛球とランダム音響場との相互作用を記載する広く受け入れられた理論に従うと想定される¹⁶。放射圧は、球面調和関数におけるフィールド分解に由来する2つの関与に分解することができ、 f_1 は相対密度にのみ依存し、 f_2 は相対圧縮率のみに依存する。定常波における粒子の放射圧 (F_r) は、

【数1】

$$F_r = \frac{V_p P_a^2}{4\rho_0 c_0^2} \left[f_1 + \frac{3}{2} R_{\text{real}}(f_2) \right] \sin(2ky)$$

であり、ここで ρ_0 は液体の質量密度であり、 P_a は音響波の圧力であり、 V_p は粒子の体積であり、 c_0 は液体における音の速度であり、 k は波動ベクトルである。

【0073】

ポリマーナノ粒子について、係数 f_2 の虚数部を無視することができることを示すことができる。後方散乱圧力は、その結果、以下の式によるトランスデューサの検出における放射圧に関連する。

【数2】

$$P_{sc} = \frac{P_a}{r} \frac{k\rho_0 c_0^2}{\pi} \frac{F_r \left(\gamma = \frac{\lambda}{8} \right)}{P_a^2}$$

【0074】

この式から、強度における散乱断面積は、入力強度を超える全散乱電力として定義することができる。

【数 3】

$$\sigma_{sc} = \left(\frac{r p_{sc}}{P_a} \right)^2 = \left(\frac{k \rho_0 c_0^2 F r \left(y = \frac{\lambda}{8} \right)}{\pi P_a^2} \right)^2$$

【0075】

超音波コントラストは、非平面接触面によって反射された、または組織に存在するか、もしくは人工的に注入された小さな散乱体から散乱された圧力波から生じる。粒子からの散乱は、大部分の粒子にあてはまり、式で示される理論に対応する幾何学的散乱、または高振幅半径方向振動による音響波を散乱するなどのコントラスト気泡のための共鳴振動挙動によって生じてよい。散乱横断面は、したがって、有効断面を表し、音響強度は粒子によって吸収されて球体法則で再放射され、コントラスト発生に二次的に関連する。試料の効率のよい横断面は、図15Dに示される。青い波線は、レイリープレセット理論¹⁹に従って、超音波コントラスト発生に典型的に使用される被覆された気泡の散乱挙動を描く。これらのコントラスト気泡についての幾何学的散乱は、検討される範囲内における振動散乱よりも低いので、無視される。PLGAまたはPFCEのみではなく、PFCE-Gd粒子は、同一寸法の気泡から予期されるよりも8桁大きい散乱係数を示す(図15D)。興味深いことに、最大粒子の散乱係数は、同等寸法の被覆気泡について予期されるものと同様であった。しかしながら、そのような小さな気泡は、非常に不安定であり、実際には使用することができない。さらに、PFCEを有する粒子の製造は、劇的に、それらの挙動を修飾し、それらの効率を、特にGdの添加下において向上する。他の試料に反して、PFCEに基づくナノ粒子は小さい気泡のように波腹に向かって動き(図15C)、同一寸法の気泡に比較して2桁大きい散乱係数を示す(図15D)。粒子の超高速画像²⁰は、超音波照射を受けた粒子に変化を示さなかった(データは示さず)。

【0076】

細胞標識化およびイメージング

臨床試験²において使用されたような初代ヒトDCは、標識され撮影された。細胞生存における効果は、非標識化コントロールに関して観察されなかった。Gd錯体なしを除いて、同様の粒子に関する以前の研究は、変異マーカの発現、T細胞活性化能力、および移動能に関して細胞における標識化の効果を示さなかった²¹、²²。標識された細胞は、エクスピボにおける組織試料における注入後、蛍光、MR、および超音波イメージングを用いて容易に検出された(図16A)。200万個の標識細胞が注入された。超音波イメージングが第1に実施され、続いて蛍光およびMRイメージングが実施された。蛍光の持続、および特に¹⁹F MRシグナルは、超音波にさらされることによって粒子が損傷されていないことを示す。図16Bは、ゲルファントムにおける1000万個のDCを示し、細胞は、非標識、PFO粒子で標識、またはPFCE-Gd粒子で標識のいずれかであった。また、PFCE-Gd粒子で標識された細胞は、最も高いコントラストを示すことが明らかである。最後に、これらの細胞の希釈系列がなされ、超音波を用いて撮影された(図16C)。3~0.2百万個の、標識された、または非標識細胞が撮影された。ウェルを取り巻くROIについての比較強度がプロットされ、コントラストの明確な増強を示す。

【0077】

インビボイメージングおよび毒性

PFCE-Gd粒子は、マウスにおいて筋肉注射された(図17A)。画像は、注入前、直後、および2時間後で示される。マウスは注入の間に麻酔されるが、次の撮影セッション前に回復された。したがって、粒子は、マウスの動きによって筋肉内にある程度分散された。さらに、以前の画像と共にいくらかの結像面を正確に得ることはできない。これらの問題にも関わらず、注入された粒子は、依然として明確に検出可能である。これらの画像は、臨床的な超音波スキャナで得られた。

【0078】

粒子は、マウスにおける節間注入後に撮影された（図17B）。これらの注入は臨床的
 症状を最小化し、細胞はDCワクチン接種治療において患者のリンパ節に直接に注入する
 ことができる^{2 3}。しかしながら、マウスリンパ節に注入することができる小体積（10
 μ l未満）が原因で、わずかな粒子（0.1mg）が細胞の代わりに注入された。これら
 の実験において、0.1mgは100,000細胞に対応し、一定の細胞の取り込みをも
 たらすが、典型的には300~1500万個の細胞が臨床試験において注入される。高分
 解超音波は21MHzで実施され、典型的にはそれらの長軸において2mm以下のリンパ
 節に位置する。節の平均コントラストは、粒子の注入後10倍を超えて変化した。注入の
 18時間後においてコントラストは検出されなかった（示されていない）。リンパ節を切
 除しても、蛍光シグナルは検出されず、粒子が注入された節から除去されたことを示唆す
 る。

10

【0079】

最後に、本発明者らは、非常に大量の投与である20mgの粒子を皮下に注射されたマ
 ウスにおいて粒子の毒性を調べた（図17C）。これらのマウスは、注射されなかったコ
 ントロールに比較して2週間観察された。この期間中、体重、行動、または外見に変化は
 観察されなかった。終点において、マウスは犠牲にされ、それらの臓器は計量され調べら
 れた。コントロール動物に比較して顕著な相違は観察されなかった。特に、腎臓、脾臓、
 肝臓、および流入領域リンパ節が、詳細に調べられた。細胞標識後の効果の欠如、およ
 びクリアランスの証拠をまとめると、これらのデータは、粒子が生体適合性を有すること
 を示す。

20

【0080】

実施例16 さらなる手順および方法

粒子合成

粒子は、ProHance (Bracco Imaging Europe社, Amsterdam) から得たガドテリド
 ールを添加して、以前に記載^{2 2}されたように作製された。簡潔には、50mlの水のみ
 、または水およびProhance、Gd_{h i}に1780 μ lおよびGd_lに1400
 、に溶解された1gのポリビニルアルコールが、890 μ lのPFCE (Exfluo社, Tex
 as USA)、または232 μ lのPFO (Perfluoron, Alcon社)を有するジクロロメタン
 に溶解された180mgのPLGA (Resomer RG 502 H, ラクチド:グリコリド モル比
 48:52~52:48; Boehringer Ingelheim社, Germany)に、氷上で、10秒パ
 ルスにおいて2分間40%出力で駆動している、カップホーンを備えるDigital
 Sonifier 250 (Branson, Danbury, USA)を用いて超音波処理とともに、滴
 下して加えられた。Malvern Zetasizer Nanoにおいて、動的光散乱が行われた。Gd含有
 量は、質量分析器を用いて測定された。PFCE-Gd_l粒子は、20 μ g/mg含ま
 れ、PFCE-Gd_{h i}は40 μ g/mgであった。

30

【0081】

インビトロイメージング

インビトロ超音波イメージングは、ゲルファントムにおける試料について実施されたか、
 または7.5MHzの中心周波数で直線配列トランスデューサ(11-3L)を備えるPh
 ilips SONOS 7500スキャナを用いてウシ肝臓組織に注入された。MI値は、0.2に限定
 された。中心周波数7.5MHzを有する直線配列トランスデューサ(L11-3)が全
 ての超音波スキャンに使用された(SONOS 7500, Philips Medical Systems社, Best, The
 Netherlands)。MIは、本明細書において述べられたように、0.1~2.0まで変化
 した。ゲインは、典型的には90%に設定された。

40

【0082】

8重量%ゼラチン(Dr. Oetker, Ede, The Netherlands)および2重量%寒天(Agar P
 owder CMN, Boom社, Meppel, The Netherlands)溶液(これらのゲルは超音波画像におい
 て明るく示された)、またはポリビニルアルコール冷却ゲル(15重量%PVA (Boom社
 , Meppel, The Netherlands)、冷却液体(Koelvloeistof Basic Safe, Halfords, The N

50

etherlands)、ならびに65重量%の水からなるゲルファントムは、均一な液体が形成されるまで、密封されたシリンダにおいて90℃に加熱された。型に注がれた後、1回の凍結融解サイクル(-25℃で12時間、続いて20℃で12時間)。コントラストの分析(図13D)は、ウェル上に目的の領域を描き、Image J(U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA)を用いて平均ピクセル強度を測定することによって実施された。

【0083】

MRイメージングおよび分光法は、二重 $^1\text{H}/^1\text{H}$ 体積コイルを用いる、水平磁石ボアを備えた11.7T MRシステム(Bruker Biospin社, Ettlingen, Germany)において行われた。画像設定は、800/10.5msのTR/TE、2x2x2mmボクセル、256x128マトリックス、およびスピンエコー系列を用いて ^1H について2アベレージ; 960/46ms、4x4x4mmボクセル、64x32マトリックス、RARE因子8を有するRARE系列を用いて512アベレージであった。

【0084】

蛍光イメージングについて、マウスまたは試料チューブがFluorVivo300(INDEC BioSystems社, Santa Clara, CA USA)に置かれた。露光時間は、0.05~0.15秒間であった。

【0085】

細胞単離および標識化

初代ヒトDCは、記載されたように 2^1 、被験者血液から単離され、3~8日間のインビトロ培養期間において100万個の細胞あたり5mgの粒子で標識された。細胞は、使用前によく洗浄された(3回)。生存能力のある細胞は、トリパンブルー色素排除法で細胞数計測器を用いて計数された。

【0086】

インビボイメージング

マウスは、中央動物研究所(Nijmegen, the Netherlands)において、特定の無菌条件下で飼育された。全ての実験は、Nijmegen動物実験委員会の動物取り扱いガイドラインに従って行われた。インビボ超音波イメージングは、MS550Sトランスデューサを備えるVisualSonics Vevo 2100システムを用いて行われた。マウスは、イソフルレンを用いて麻酔された。

【0087】

口腔内注入は、NanoFil Microliterシリンジ(World Precision Instruments社, Germany)を用いて、顕微鏡ガイダンス下で行われた。

【0088】

EMおよびEDX測定

試料は、懸濁液の蒸発によってガラスプレート上に固定された。金の層は、続いて、20kVおよび60.000xまでの倍率での環境制御型走査電子顕微鏡FEI ESEM XL30による観察前に試料に沈着された。

【0089】

透過電子顕微鏡(TEM)およびTEM-EDS、エネルギー分散X線分析(EDS)と一体となったTEMは、0.24nmの点分解能を備える最先端の200KV JEOL TEM 2100システムで実施された。この顕微鏡は、2つのGatanカメラ、200kVの加速電圧で最も高い点分解能および感度のGatan833OrionおよびGatan890ultrascanと、2つの検出システムSTEMおよびEDS(元素分析のためのエネルギー分散X線分析)とを備えている。TEM測定のための標準的な標本保持体、およびEDS測定のためのベリリウム標本保持体を使用された。試料標本は、溶液の液滴(6~10 μl)を炭素被覆されたCuグリッド(200メッシュ、EM science社)に置き、風乾によって作製された。TEM画像はナノ粒子とそれらの寸法分布を可視化することができるが、第2の電子イメージングは、ナノ粒子の化学組成、元素マッピング、および元素イメージング分布の試験を可能にする。

10

20

30

40

50

【0090】

音響キャラクターゼーション

図15Aにおいて示される結果は、Panametrics 5MHz A308Sトランスデューサに接続されたPanametrics 5077PRパルス受信機を用いて得られた。44mmの厚みのキュベットを含む試料保持体は、ポリジメチルシロキサン(PDMS)製であり、トランスデューサの焦点に置かれる。水のリファレンスは、各シリーズで取得された。実験設定は、圧電性結晶に付着した約380マイクロメートル寸法の四角のキャピラリに基づき、図15Bにおいて示されるような1.94MHzの周波数でキャピラリにおいて音響定常波が生じる。粒子の動きは、オリンパス顕微鏡に接続された光子APX高速カメラの使用によって、1秒間あたり125フレームで記録された。10x対物レンズが可視化のために使用される。シグナルは、TaborAWG波形発生器で生み出され、ENI350Lパワー増幅器を用いて増幅された。ストリーミングの迅速な蓄積が原因で、実験は、液体中のストリーミングの衝撃を制限するために低圧で実現された。分析は、Matlab(登録商標)を用いて達成された。特に、PIV曲線は、自由に利用可能なソフトウェアOpenPIVを用いて得られた。2つの方法が、さらなる正確さのために光学記録を分析するために同時に使用された。第1は、画像の補助マトリックスの相互相関に基づくPIV分析である。相対移動は、PIV分析から得ることができ、既知の幾何学に縮尺を変更することができる。第2の方法は、水平方向における平均に基づく。得られるピクセル線は、図15Cにおいて示されるような単一フレームにおける以前のものに追加される。

10

20

【0091】

インビボ毒性試験

粒子の20mgがマウスに皮下注射され、それらのマウスを未処理のコントロールと比較して2週間観察した。臓器は、観察のために除去され、2週間後に計量された。

【0092】

実施例17 さらなる検討

PFCは、独特の音響特性を有し、特に音の非常に遅い速度²⁴に関して、それらのコントラスト特性に影響を与え得る。PFC液滴は超音波に以前に使用されたが、これらはPFCの蒸発を必要とし、サブマイクロン寸法になる傾向がある^{7、15、25~28}。また、PFCは、典型的にはMRIのための造影剤として使用するための金属に混合された。しかしながら、酸化鉄結晶のような、固体金属ナノ粒子を有する傾向がある^{29、30}。溶解可能なGd錯体、具体的には他の同様の錯体とは逆のガドテリドールの役割は、我々のデータ(たとえば、図13C)において明らかであるが、未確定のままである。溶解金属錯体を用いる音響シグナルの増強に関する文献は存在しないが、固体金属粒子は超音波CASとして頻繁に使用される^{29、31~33}。したがって、超音波について、液体形態のままである液体PFCを向上させる固体金属錯体に関する文献は現在のところ存在しない。PFCが本発明者らの粒子において液体で残る証拠は、その高い沸点(145)、DLSおよびEMデータにおける変化の欠如、およびフッ素含有量(図14)、超音波照射後でさえ¹⁹F MRIを実施する能力(図16A)を含む。

30

【0093】

粒子後方散乱超音波による正確なメカニズムが曖昧なままであったが、粒子の音響活性は、示された実験において、間違いなく、観察および測定された。超高速記録²⁰は、任意のキャピテーション事象から除かれる。また、音響特性に使用される低圧(15kPa)は、非線形効果またはキャピテーションについてわずかな可能性を残す。したがって、新規メカニズムが研究されるべきである。この仕事は、典型的な90°設定で実現することができない。なぜなら、理論は、散乱波の指向性を予期し、粒子の少ない影によって示されると考えられるからである(図13C)。一層複雑な理論^{34、35}は、音響拳動におけるシェルの潜在的効果を説明するために必要であろう。物理メカニズムを完全に解明するための包括的な音響研究は、現在の仕事の範囲を超えるものである。現在、本発明者らは、受け取られた信号の強度を説明するために、粒子の共鳴の重要な形態であると考え

40

50

る。なぜなら、この種類のシステムについて全ての機械的共鳴は、非常に高い周波数でもたらされるからである。

【0094】

PFCを含むPLGA粒子は、最小の毒性で最高の細胞取り込みを以前に示した。事実、これらの粒子で実現された、細胞の¹⁹Fローディング、¹⁹F MRI研究のための主要パラメータは、以前に最も高く報告された。Gd錯体の添加は、その極めて低い濃度が原因で、取り込み、または粒子の他の特性に顕著な影響を与えとは予測されない。さらに、Gd含有量は、現在推奨される臨床容量よりも数桁低い(表1)。PLGA、PFCおよびIC-Greenについても同様である(表1)。これらの成分のクリアランスも十分に研究された。これは、金またはシリカナノ粒子⁹、¹⁰、¹¹のような通常固体である、他の安定な超音波造影剤を超える重要な利点であり、長いインビボ保持時間¹²と低い臨床応用性¹³を有する傾向がある。

10

【0095】

本明細書において記載された、PFCおよびGd錯体(ガドテリドール、Bracco社)を有する200nmのPLGA粒子は、超音波エネルギーによって影響を受けることなく、高い音響コントラストを生じる。特に、粒子は、血液循環、現在の微小気泡剤の主な限定から除去されるために十分に小さく、それらのより大きな寸法およびより短い残存期間が原因で血液循環に限定される。さらに、粒子は、高いエネルギープローブ超音波処理にも安定である(図14D)。そのような安定性は、内皮外の領域へのインビボ標的化、および細胞標識などの長期用途に必要である。本発明者らは、粒子が高い周波数におけるコントラスト生成に使用することができることも示し(図17B)、このことは高い解像度を可能にするので、超音波に基づく画像研究について小さな動物モデルの開発を可能にする。粒子は、GMP条件下において臨床使用のために容易に作製することができる。このことは、細胞とインビボとの両方で観察された毒性の欠如とともに、それらのヒトにおける使用の好適性を示す。PLGA粒子も、標的化試薬、およびワクチン送達などの様々な用途に関する文献において広く適用され、放射性リガンド³⁷の添加を含み、「ステルス」粒子³⁵を作製するためにPEGで被覆されるなど様々な修飾にさらされる。粒子分解の割合、および後続の薬剤放出率、循環時間、ならびに多型モデル機能性は、制御することができる³⁹、²²、⁴⁰。これらの改良の全ては、本発明者らの粒子で可能になり、必要なさらなるカスタマイズが可能である。

20

30

【0096】

超音波イメージングは、個人の治療研究に理想的に適しているが、その潜在可能性は、好適な安定性、生体適合性の造影剤の欠如によって実現されていない。本明細書に記載された粒子は、細胞追跡、および標的化薬剤送達を含む、臨床的、および臨床前の用途における多型モデルイメージングに容易にカスタマイズすることが可能である。

【表 1】

化合物	従来のヒトにおける使用	推奨投与量	推定投与量 (100万個のDCあたり)	クリアランス 経路
PLGA	ワクチン送達のため の、足場、 粒子 ⁴¹	用途によっ て変化す る；典型的 には30mg	<1mg	通常の細胞代 謝
PFC たとえば Perfluoron (Alcon 社) Oxygent (Alliance Pharma 社) PFCE	眼の手術 代用血液 ¹⁹ F MRI I シグナ ル ⁴²	8mg >100g n/a	0.1~0.3ng (DC集団に 依存)	肺における呼 気；PFCは インビボにお いて代謝され ない
Gd 錯体 た とえば ProHance Multihance (両者とも Bracco 社)	¹ H MRI のための造 影剤の静脈 注射	4000mg	<1mg	腎臓によって 除去される
IC-Green (Pulsion 社)	静脈内造影 剤	35mg	<5mg	腎臓によって 除去される

10

20

30

参考文献

1. Srinivas, M. et al. Imaging of cellular therapies. *Adv Drug Deliv Rev* 62, 1080-1093 (2010).
2. Aarntzen, E.H. et al. Early identification of antigen-specific immune responses in vivo by [¹⁸F]-labeled 3'-fluoro-3'-deoxy-thymidine ([¹⁸F]FLT) PET imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 18396-18399 (2011).
3. Aarntzen, E.H. et al. Targeting of ¹¹¹In-labeled dendritic cell human vaccines improved by reducing number of cells. *Clin Cancer Res* 19, 1525-1533 (2013).
4. Qin, S., Caskey, C.F. & Ferrara, K.W. Ultrasound contrast microbubbles in imaging and therapy: physical principles and engineering. *Phys Med Biol* 54, R27-57 (2009).
5. Sirsi, S. & Borden, M. Microbubble Compositions, Properties and Biomedical Applications. *Bubble Sci Eng Technol* 1, 3-17 (2009).
6. Kiessling, F., Huppert, J. & Palmowski, M. Functional and molecular ultrasound imaging: concepts and contrast agents. *Curr Med Chem* 16, 627-642 (2009).

40

50

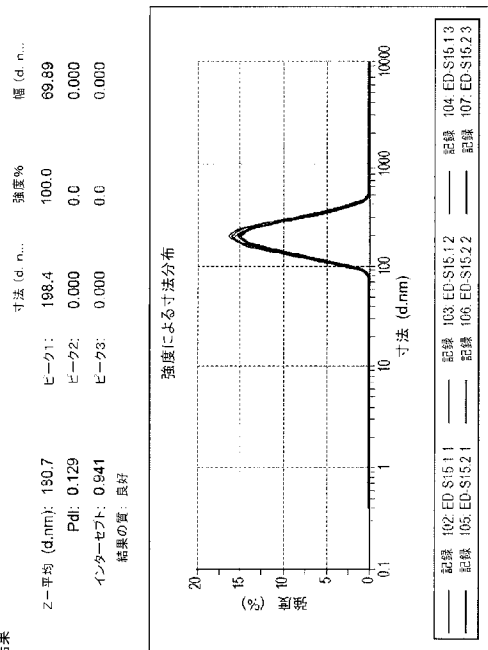
7. Reznik, N. et al. The efficiency and stability of bubble formation by acoustic vaporization of submicron perfluorocarbon droplets. *Ultrasonics* 53, 1368-1376 (2013).
8. Aggeli, C., Giannopoulos, G., Lampropoulos, K., Pitsavos, C. & Stefanadis, C. Adverse bioeffects of ultrasound contrast agents used in echocardiography: true safety issue or "much ado about nothing"? *Curr Vasc Pharmacol* 7, 338-346 (2009).
9. Delogu, L.G. et al. Functionalized multiwalled carbon nanotubes as ultrasound contrast agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 16612-16617 (2012).
10. Jokerst, J.V., Khademi, C. & Gambhir, S.S. Intracellular aggregation of multimodal silica nanoparticles for ultrasound-guided stem cell implantation. *Sci Transl Med* 5, 177ra135 (2013).
11. Chung, E., Nam, S.Y., Ricles, L.M., Emelianov, S.Y. & Suggs, L.J. Evaluation of gold nanotracers to track adipose-derived stem cells in a PEGylated fibrin gel for dermal tissue engineering applications. *Int J Nanomedicine* 8, 325-336 (2013).
12. Longmire, M., Choyke, P.L. & Kobayashi, H. Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats. *Nanomedicine (Lond)* 3, 703-717 (2008).
13. Lin, C., Fugetsu, B., Su, Y. & Watari, F. Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on Arabidopsis T87 suspension cells. *J Hazard Mater* 170, 578-583 (2009).
14. Kang, S.T. & Yeh, C.K. Intracellular acoustic droplet vaporization in a single peritoneal macrophage for drug delivery applications. *Langmuir* 27, 13183-13188 (2011).
15. Strohm, E.M., Min Rui, Michael C Koliros, Ivan Gorelikov, Naomi Matsuura in *IEEE International Ultrasonics Symposium Proceedings* 495-498(2010).
16. Settnes, M. & Bruus, H. Forces acting on a small particle in an acoustical field in a viscous fluid. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 85, 016327 (2012).
17. Mettin, R. & Doinikov, A.A. Translational instability of a spherical bubble in a standing ultrasound wave. *Applied Acoustics* 70, 1330-1339 (2009).
18. Magnaudet, J. & Eames, I. The Motion of High-Reynolds-Number Bubbles in Inhomogeneous Flows. *Annual Review of Fluid Mechanics* 32, 659-708 (2000).
19. Leighton, T.G. *The Acoustic Bubble*. (Academic Press, 1996).
20. Gelderblom, E.C. et al. Branderis 128 ultra-high-speed imaging facility: 10 years of operation, updates, and enhanced features. *Rev Sci Instrum* 83, 103706 (2012).
21. Bonetto, F. et al. A large-scale (19)F MRI-based cell migration assay to optimize cell therapy. *NMR Biomed* 25, 1095-1103 (2012).
22. Srinivas, M. et al. Customizable, multi-functional fluorocarbon nanoparticles for quantitative in vivo imaging using 19F MRI and optical imaging. *Biomaterials* 31, 7070-7077 (2010).
23. Aarntzen, E.H. et al. In vivo imaging of therapy-induced anti-cancer immune responses in humans. *Cell Mol Life Sci* 70, 2237-2257 (2013).
24. Strohm, E.M., Michael C. Koliros in *IEEE International Ultrasonics Symposium* 2368-2371(2011).
25. Matsunaga, T.O. et al. Phase-change nanoparticles using highly volatile perfluorocarbons: toward a platform for extravascular ultrasound imaging. *Theranostics* 2, 1185-1198 (2012).

26. Reznik, N. et al. Optical studies of vaporization and stability of fluorescently labelled perfluorocarbon droplets. *Phys Med Biol* 57, 7205-7217 (2012).
27. Sheeran, P.S., Luois, S.H., Mullin, L.B., Matsunaga, T.O. & Dayton, P.A. Design of ultrasonically-activatable nanoparticles using low boiling point perfluorocarbons. *Biomaterials* 33, 3262-3269 (2012).
28. Szijjarto, C., Rossi, S., Waton, G. & Krafft, M.P. Effects of perfluorocarbon gases on the size and stability characteristics of phospholipid-coated microbubbles: osmotic effect versus interfacial film stabilization. *Langmuir* 28, 1182-1189 (2012).
29. Li, A. et al. Superparamagnetic perfluorooctylbromide nanoparticles as a multimodal contrast agent for US, MR, and CT imaging. *Acta Radiol* 54, 278-283 (2013). 10
30. Barnett, B.P. et al. Use of perfluorocarbon nanoparticles for non-invasive multimodal cell tracking of human pancreatic islets. *Contrast Media Mol Imaging* 6, 251-259 (2011).
31. Li, F. et al. Preparation of gold nanoparticles/functionalized multiwalled carbon nanotube nanocomposites and its glucose biosensing application. *Biosens Bioelectron* 24, 1765-1770 (2009).
32. Niu, C. et al. Doxorubicin loaded superparamagnetic PLGA-iron oxide multifunctional microbubbles for dual-mode US/MR imaging and therapy of metastasis in lymph nodes. *Biomaterials* 34, 2307-2317 (2013). 20
33. Niu, D. et al. Facile synthesis of magnetite/perfluorocarbon co-loaded organic/inorganic hybrid vesicles for dual-modality ultrasound/magnetic resonance imaging and imaging-guided high-intensity focused ultrasound ablation. *Adv Mater* 25, 2686-2692 (2013).
34. Strifors, H.C. & Gaunard, G.C. Differences in the acoustic echoes from submerged elastic shells containing different fluids. *Ultrasonics* 30, 107-112 (1992).
35. Kovalev, V.A. Matching of asymptotic approximations in the problem of the scattering of acoustic waves by an elastic spherical shell. *Journal of Applied Mathematics and Mechanics* 66, 581-590 (2002). 30
36. Srinivas, M., Boehm-Sturm, P., Figdor, C.G., de Vries, I.J. & Hoehn, M. Labeling cells for in vivo tracking using (^{19}F) MRI. *Biomaterials* 33, 8830-8840 (2012).
37. D'Souza, M. & DeSouza, P. Preparation and testing of cyclosporine microsphere and solution formulations in the treatment of polyarthritis in rats. *Drug Dev Ind Pharm* 24, 841-852 (1998).
38. Avgoustakis, K. Pegylated poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: preparation, properties and possible applications in drug delivery. *Curr Drug Deliv* 1, 321-333 (2004). 40
39. Mahapatro, A. & Singh, D.K. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *J Nanobiotechnology* 9, 55 (2011).
40. Jain, A.K., Das, M., Swarnakar, N.K. & Jain, S. Engineered PLGA nanoparticles: an emerging delivery tool in cancer therapeutics. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 28, 1-45 (2011).
41. Lu, J.M. et al. Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. *Expert Rev Mol Diagn* 9, 325-341 (2009).
42. Hahn, T. et al. Visualization and quantification of intestinal transit and motor function by real-time tracking of ^{19}F labeled capsules in humans. *Magn Res* 50

on Med 66, 812-820 (2011).

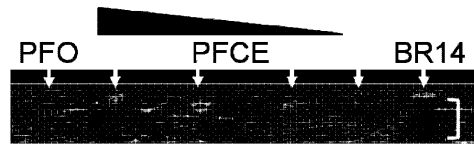
【 図 1 】

Figure 1
結果



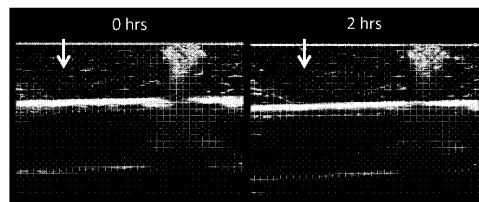
【 図 5 】

Figure 5

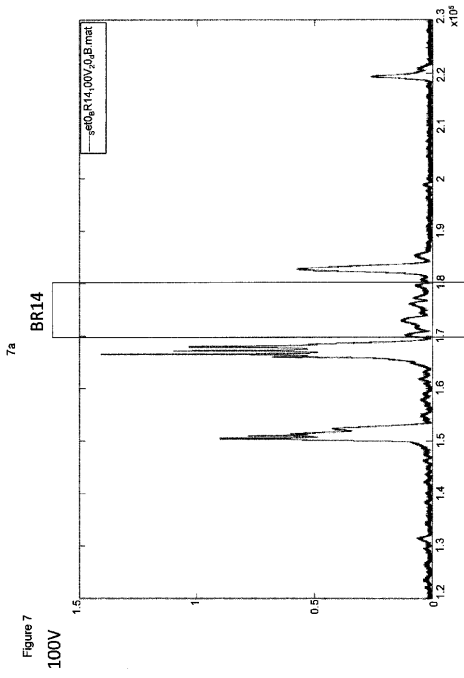


【 図 6 】

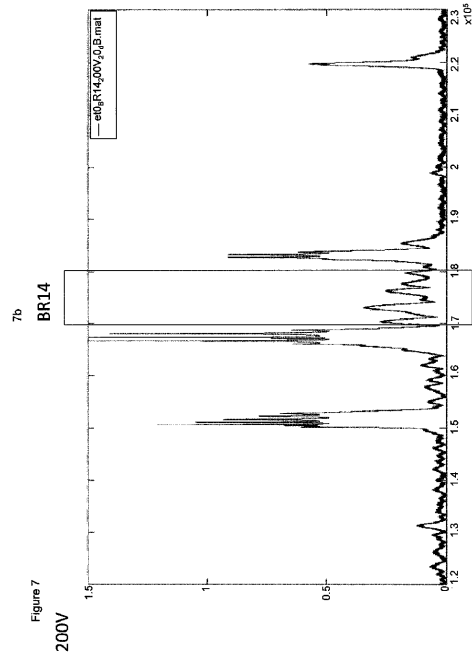
Figure 6



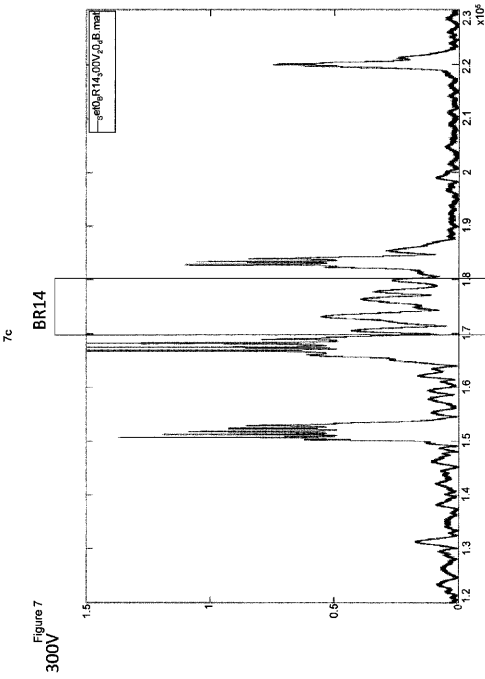
【 7 a 】



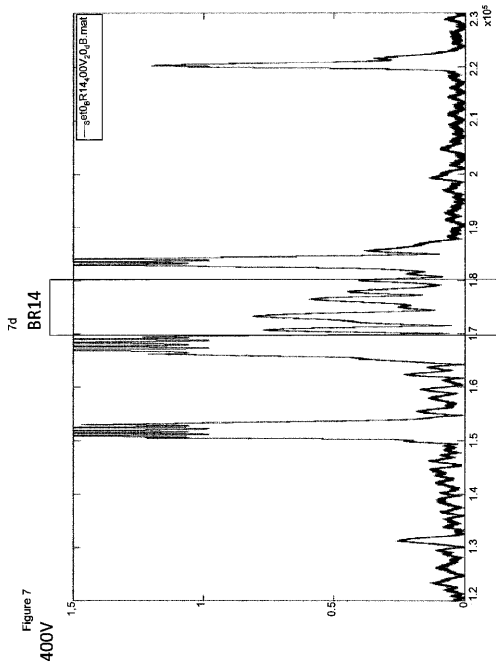
【 7 b 】



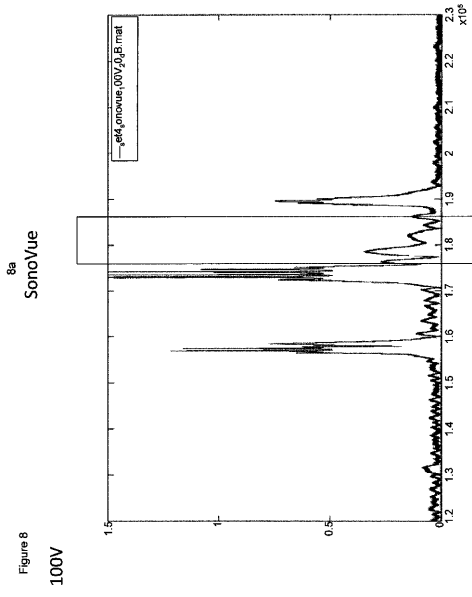
【 7 c 】



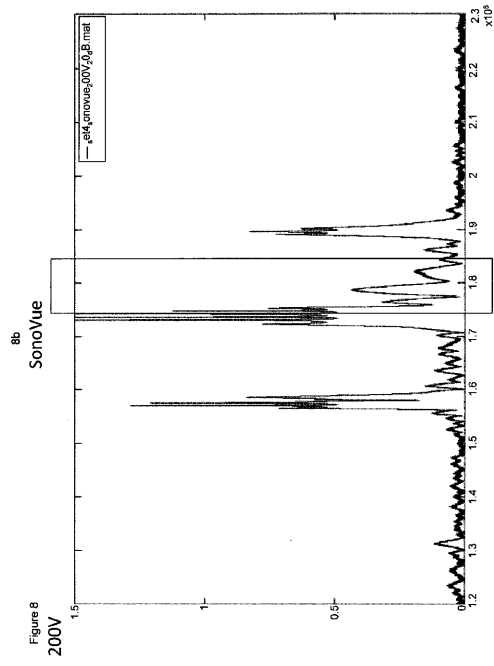
【 7 d 】



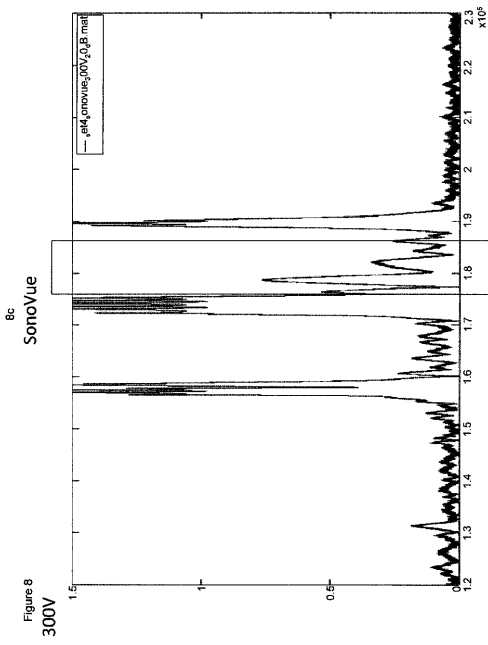
【 8 a 】



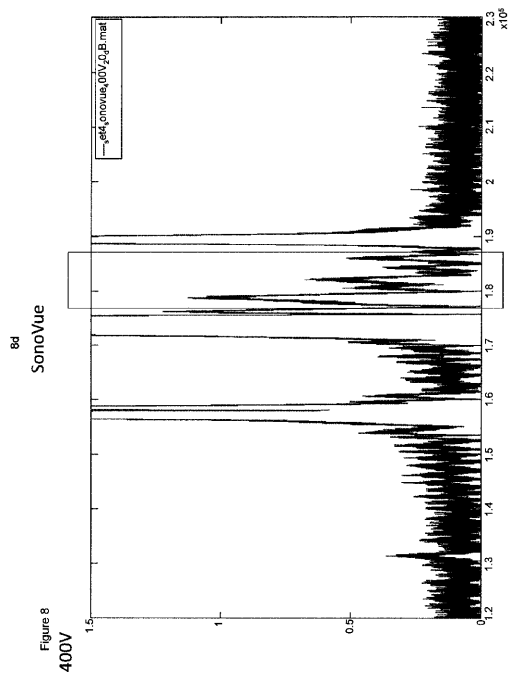
【 8 b 】



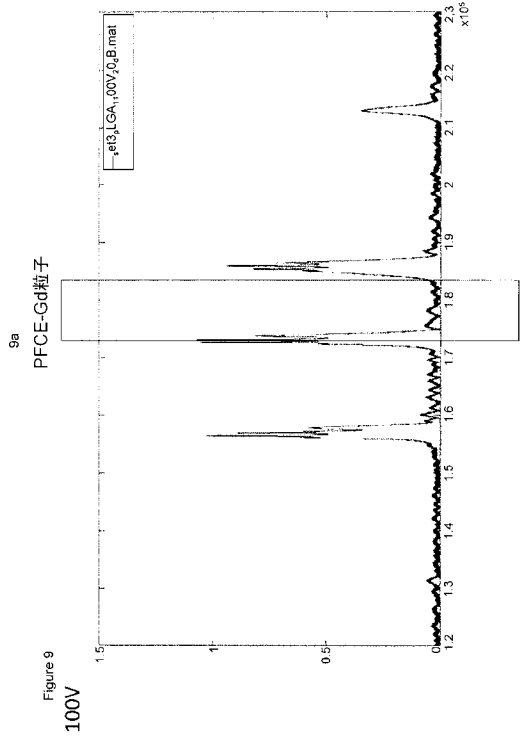
【 8 c 】



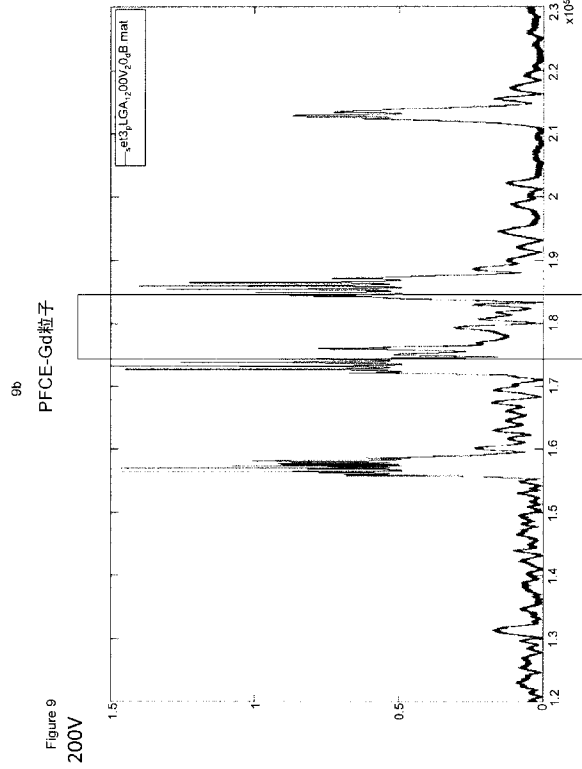
【 8 d 】



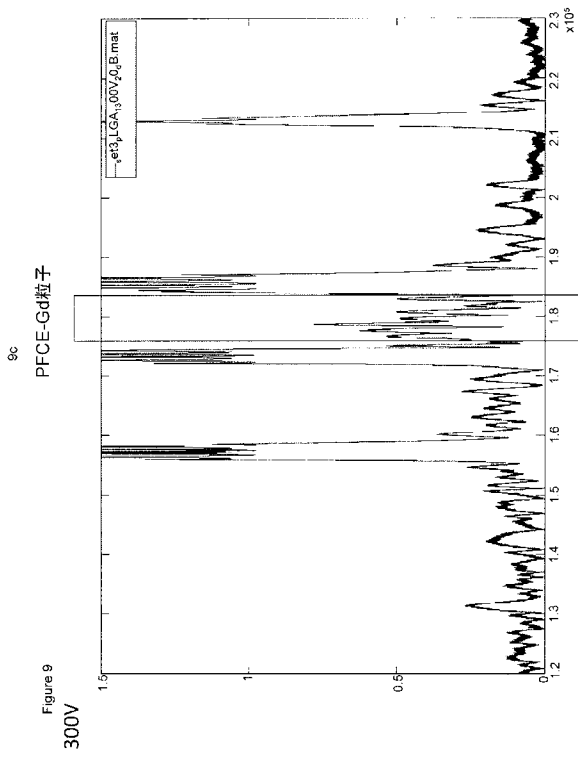
【 図 9 a 】



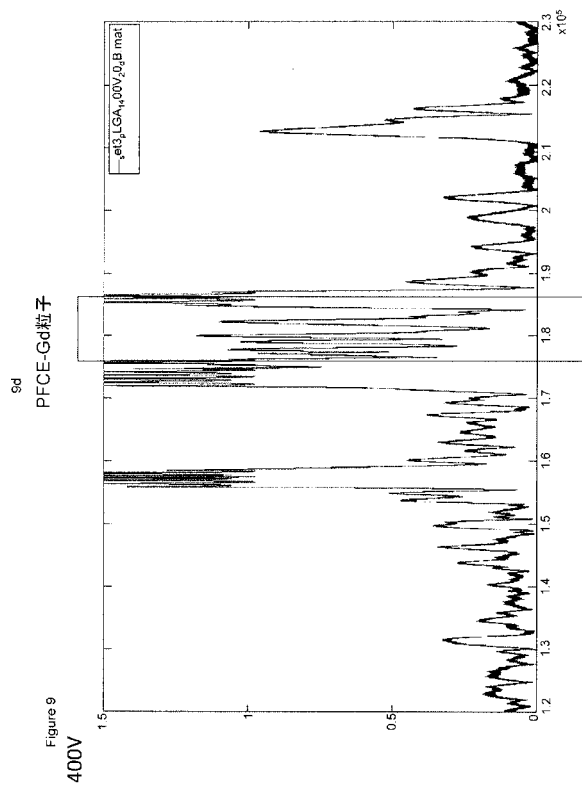
【 図 9 b 】



【 図 9 c 】

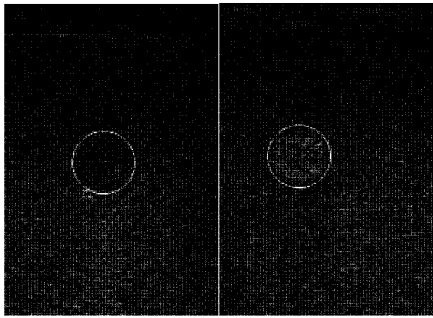


【 図 9 d 】



【 図 1 0 】

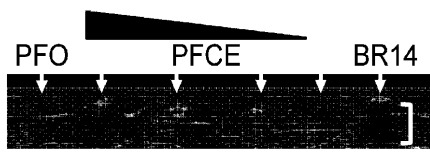
Figure 10



【 図 1 3 C 】

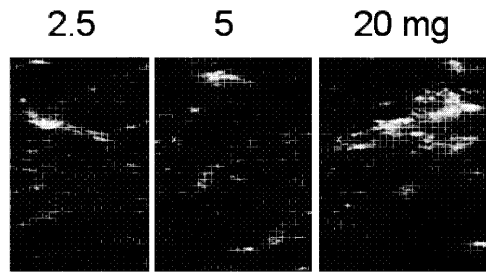
Figure 13C

C



【 図 1 3 E 】

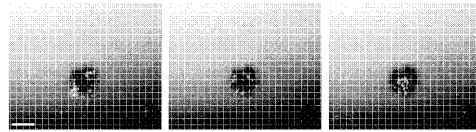
Figure 13E



【 図 1 3 F 】

Figure 13F

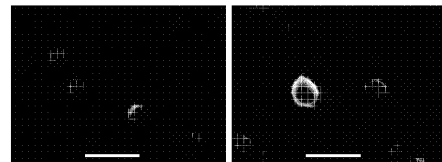
F



【 図 1 4 D 】

Figure 14D

D



【 図 1 5 A 】

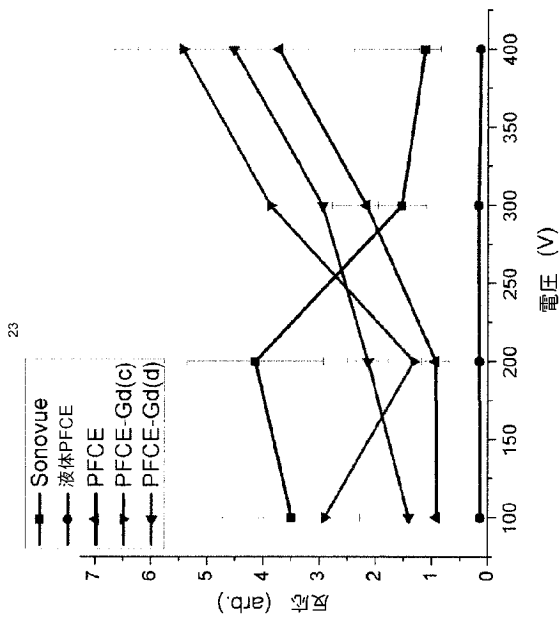


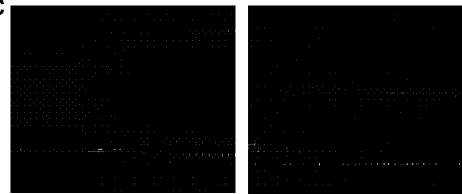
Figure 15A

A

【 図 1 5 C 】

Figure 15C

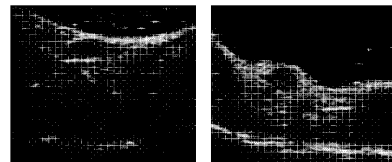
C



【 図 1 7 B 】

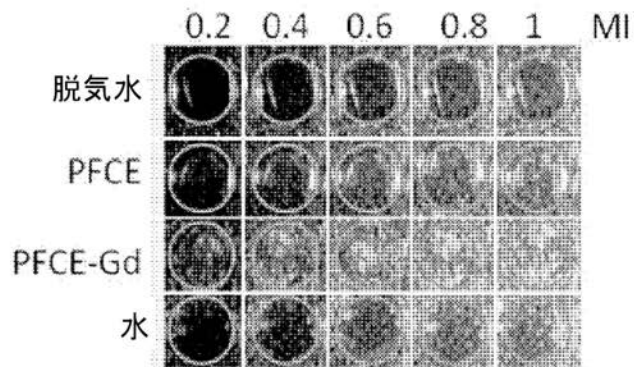
Figure 17B

B



【 図 2 】

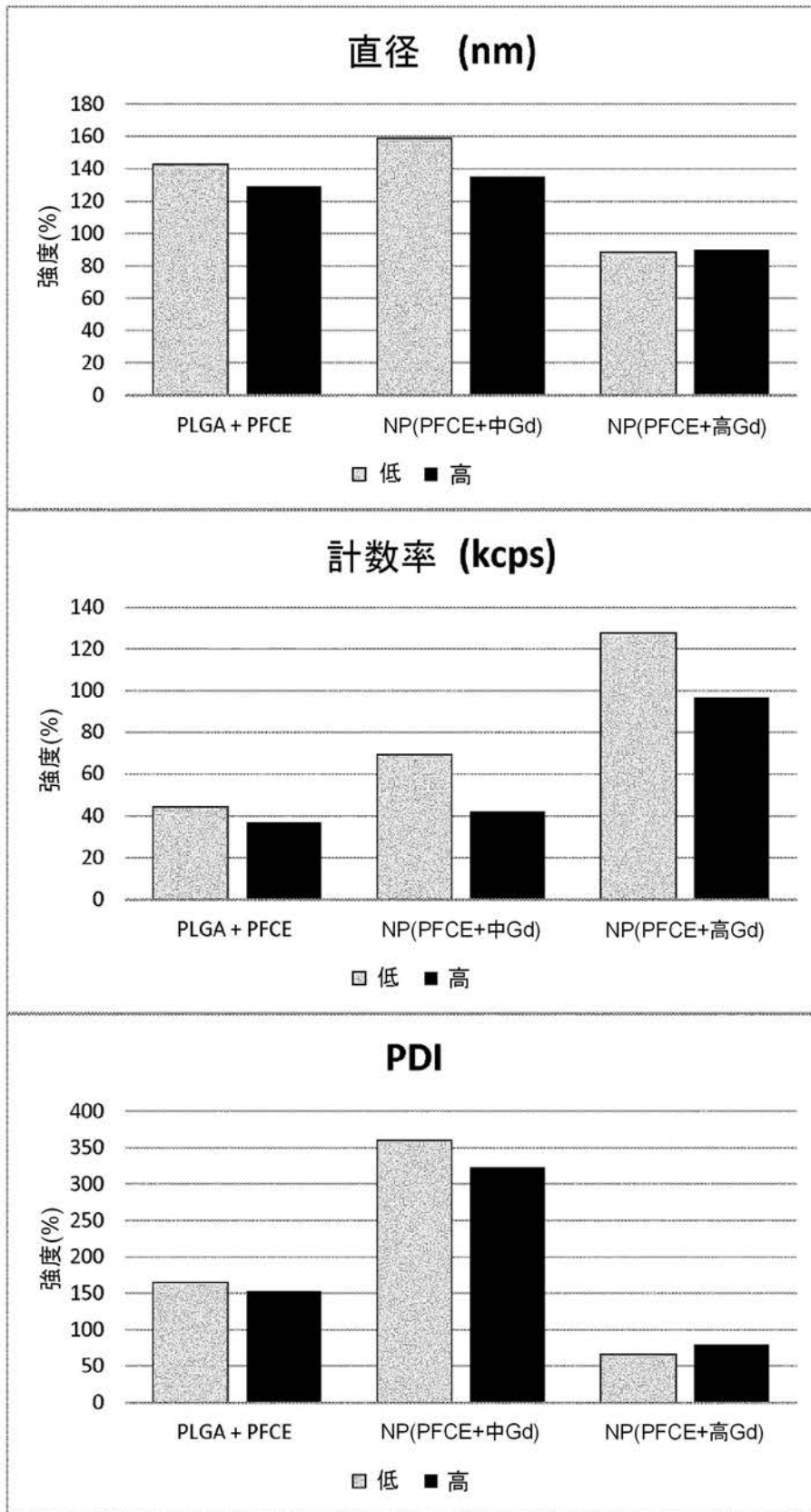
Figure 2



試料	0.2 (MI)	0.4	0.6	0.8	1
脱気水	-	-	-	-	-
PFCE	-	-	-	-	+
PFCE-Gd	+	+	+	+	+
水(気泡あり)	-	-	+	+	+

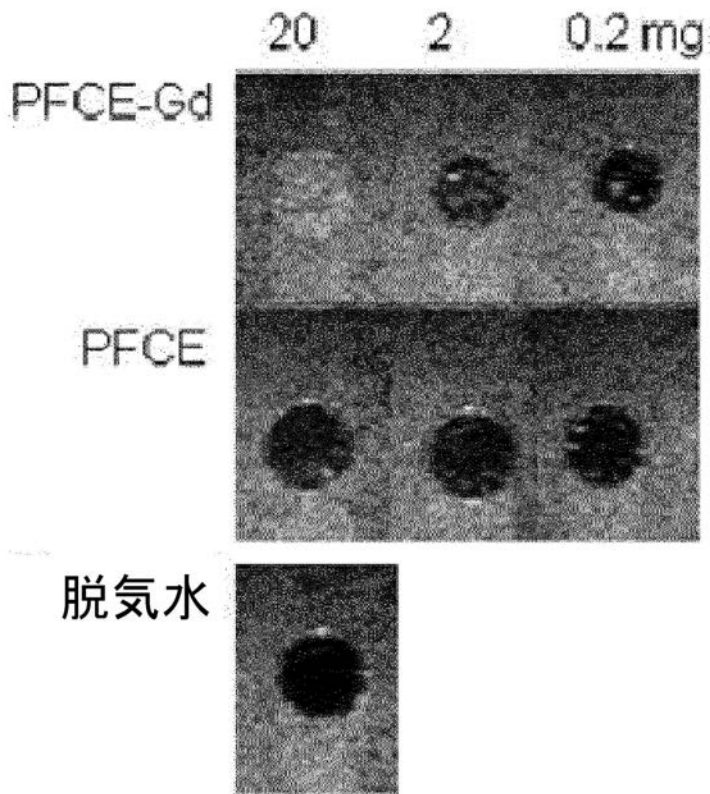
【 図 3 】

Figure 3.



【 図 4 】

Figure 4



【 図 1 1 】

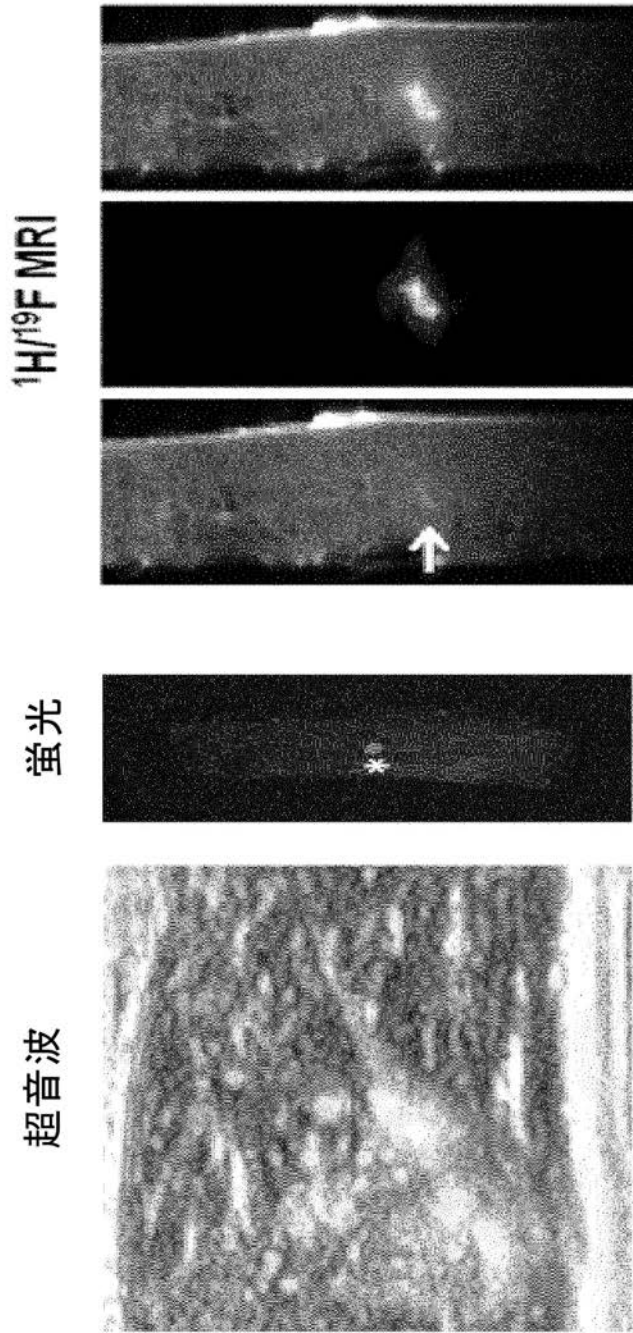


Figure 11

【 図 1 2 】

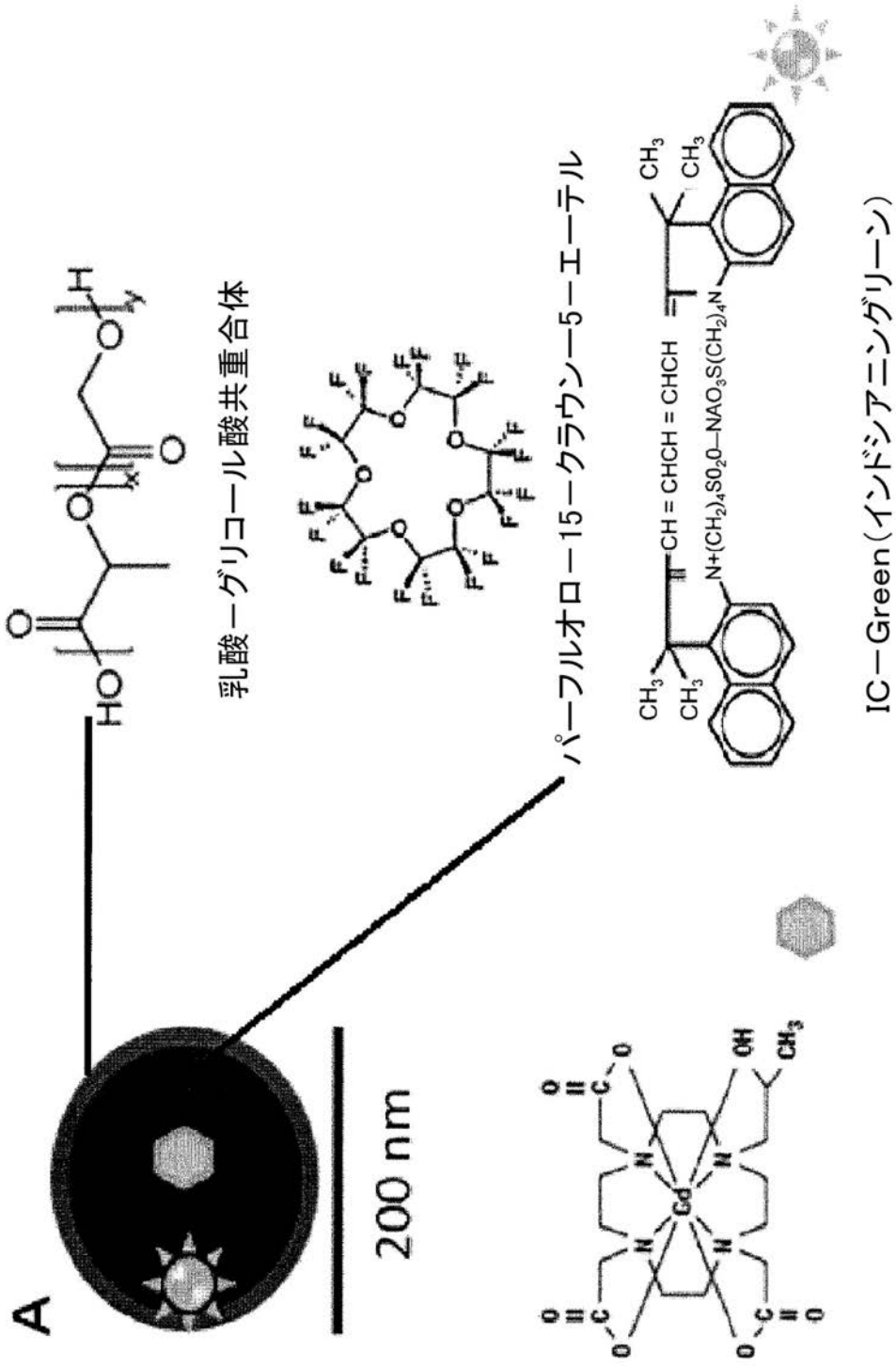


Figure 12

【 図 1 3 A 】

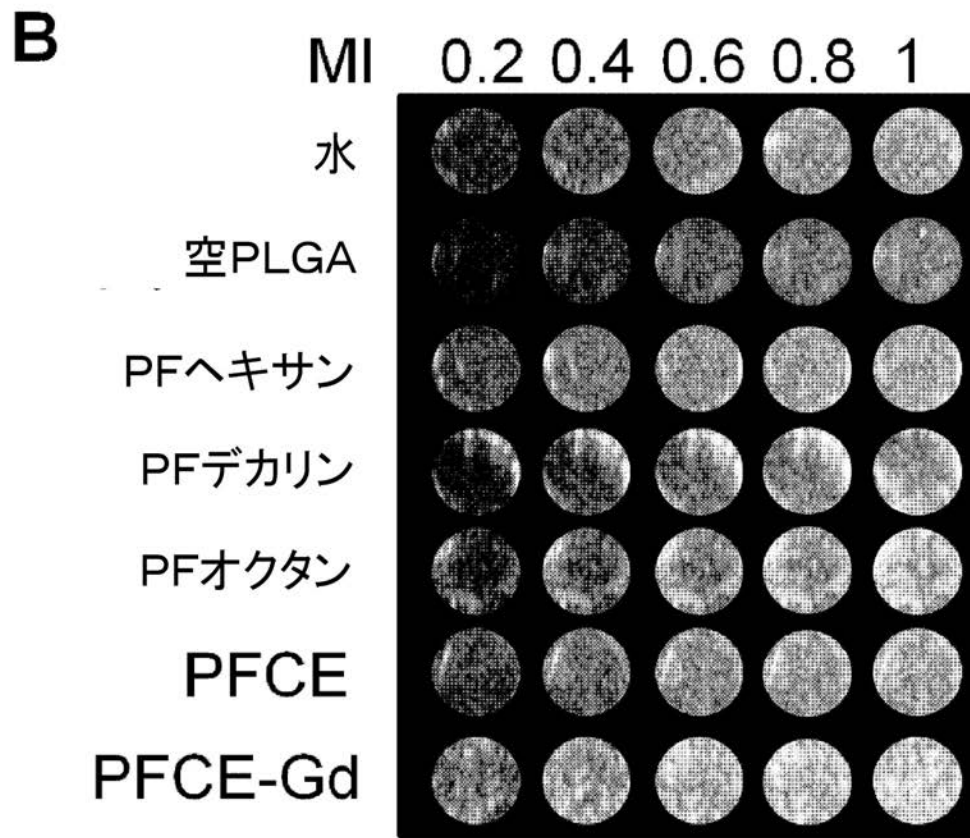
13

Figure 13A



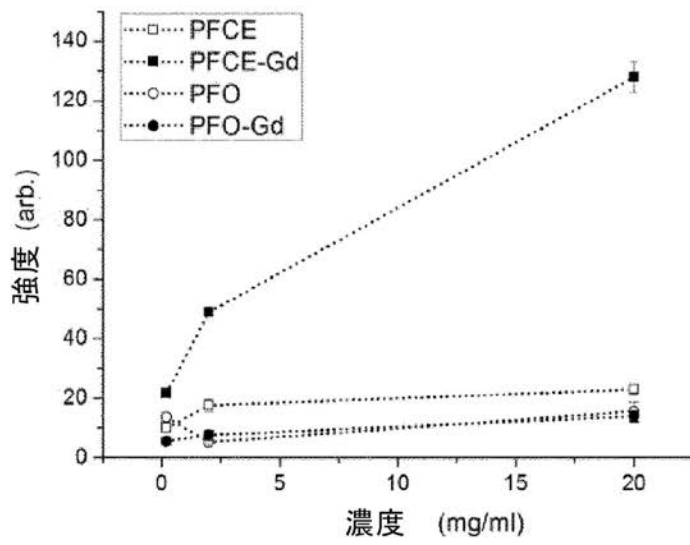
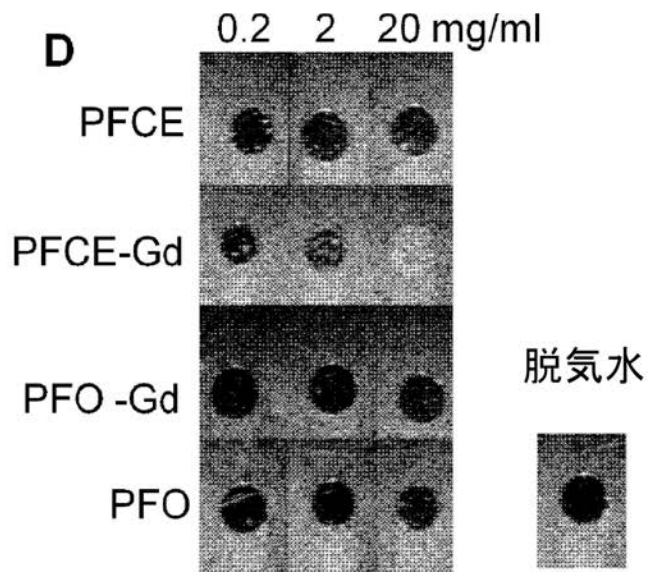
【 図 1 3 B 】

Figure 13B



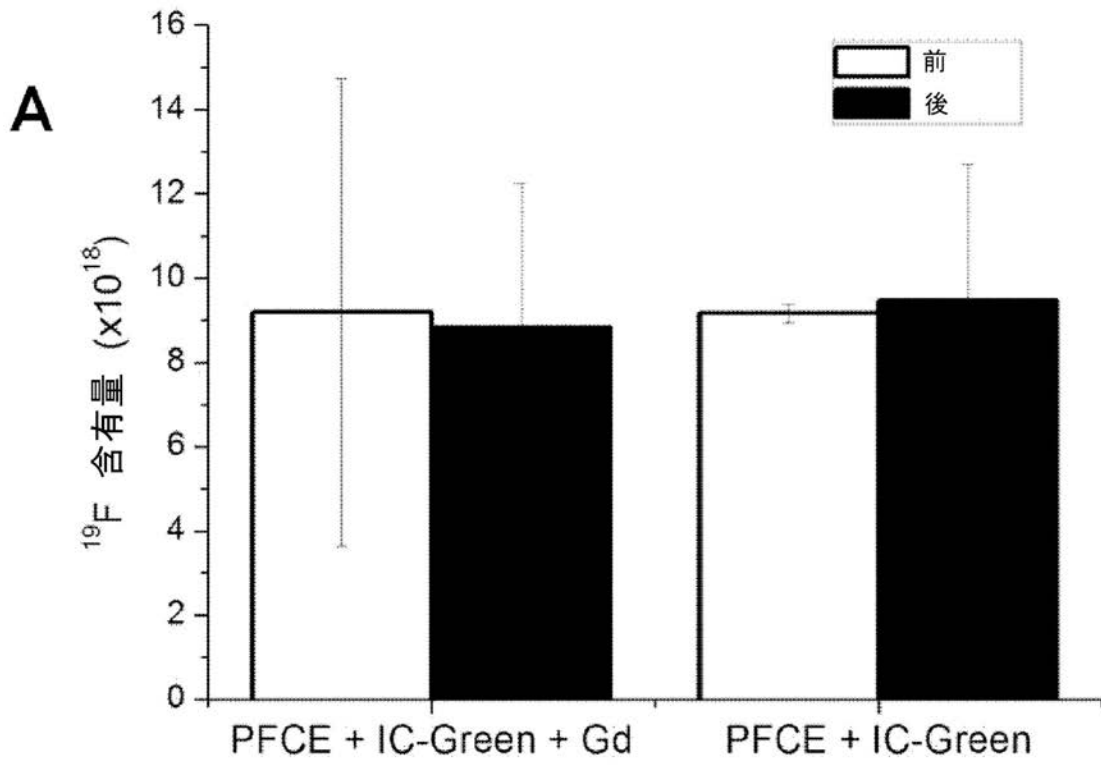
【 図 1 3 D 】

Figure 13D



【 図 1 4 A 】

Figure 14A

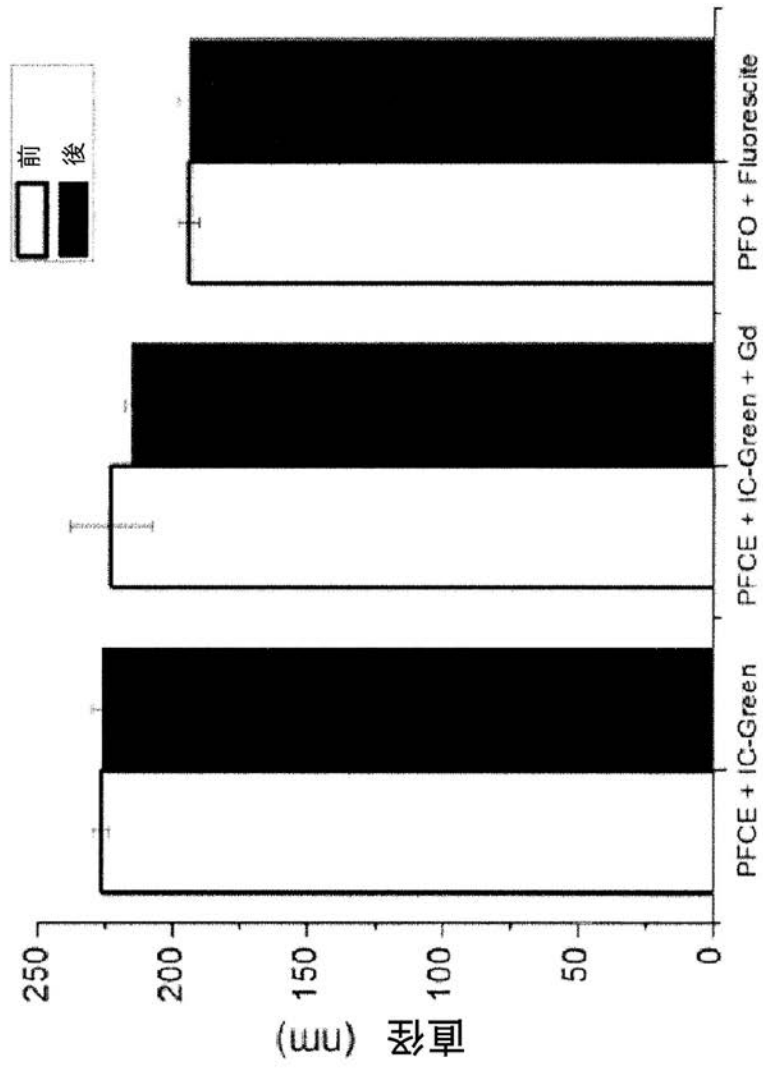


【 図 1 4 B - 1 】

20a

Figure 14B

B

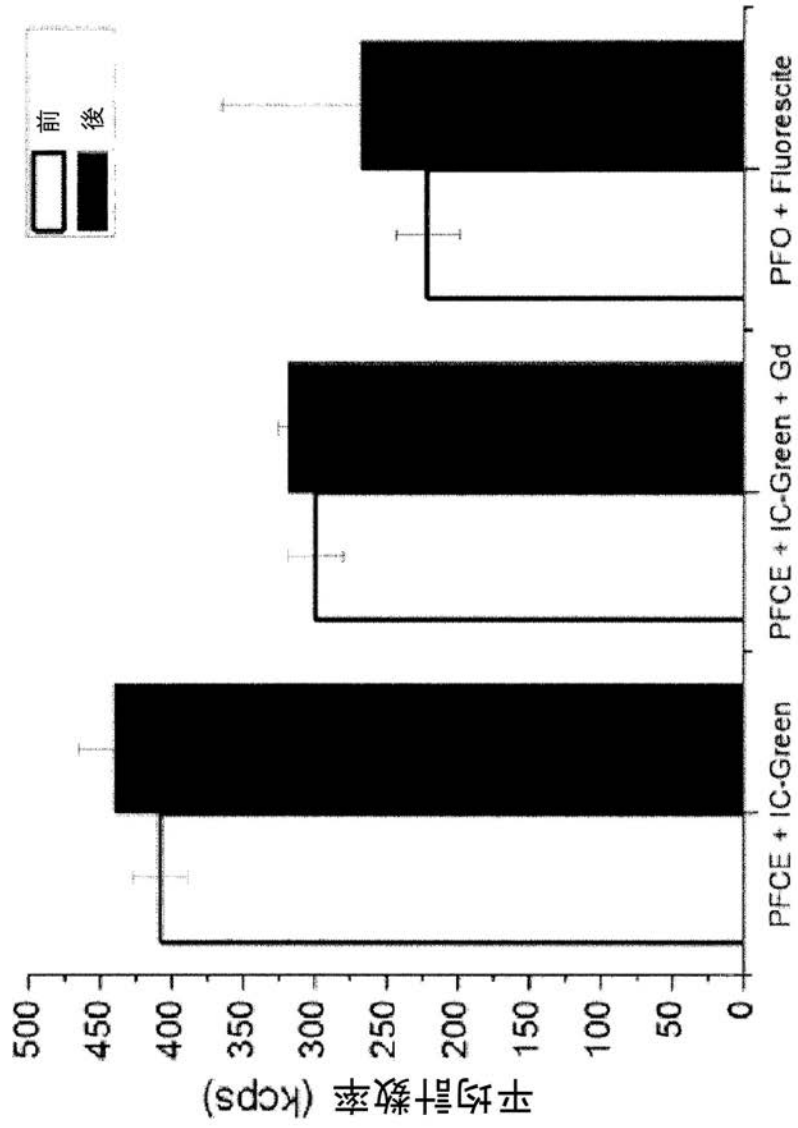


【 図 1 4 B - 2 】

20b

Figure 14B

B

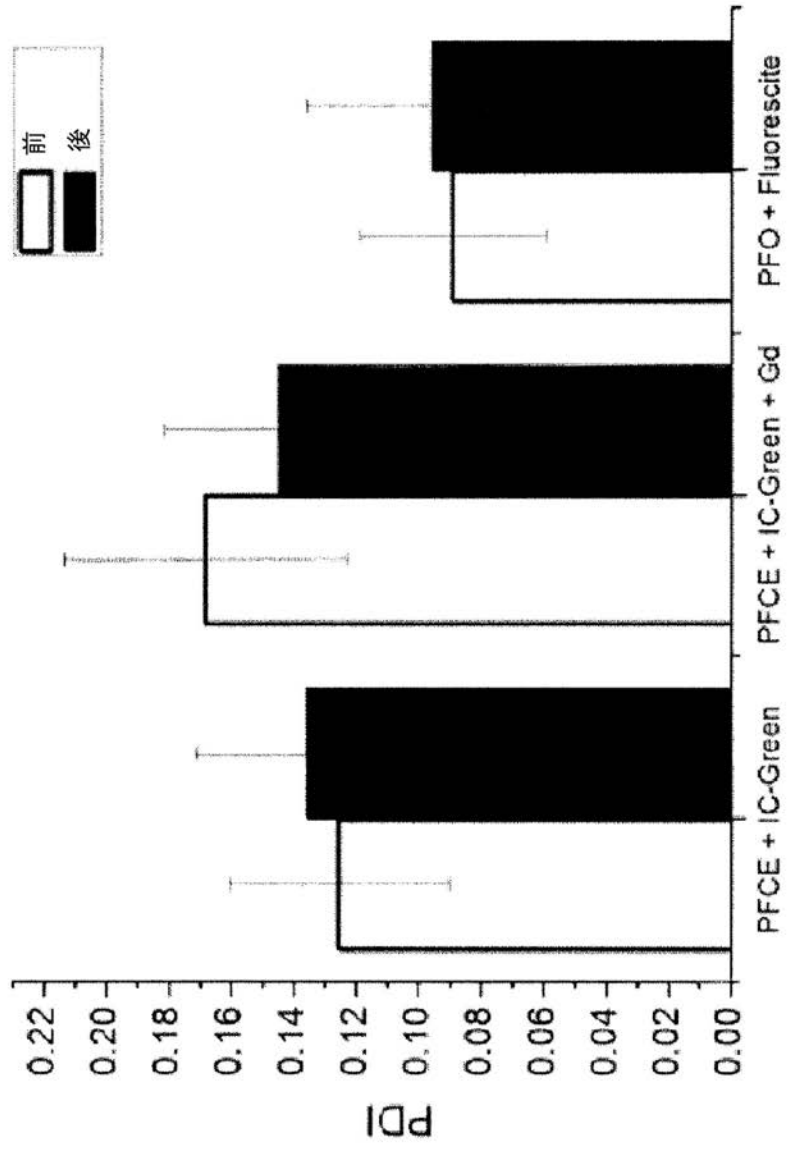


【 図 1 4 B - 3 】

20c

Figure 14B

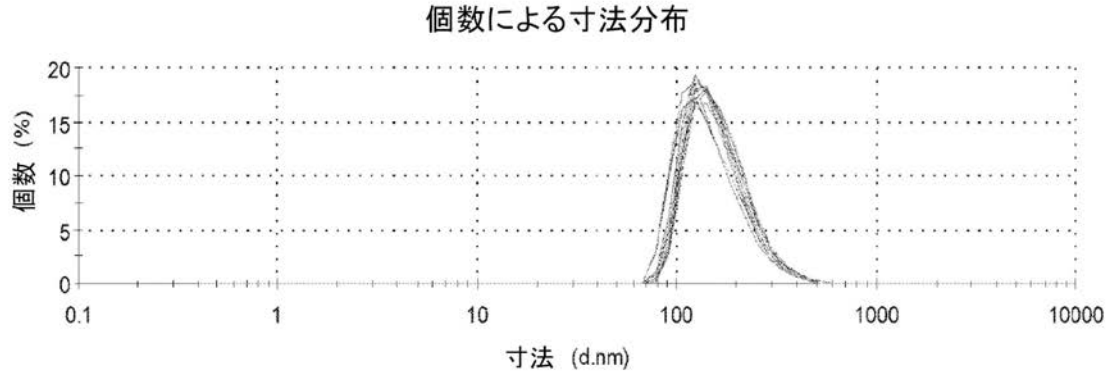
B



【 図 1 4 C 】

Figure 14C

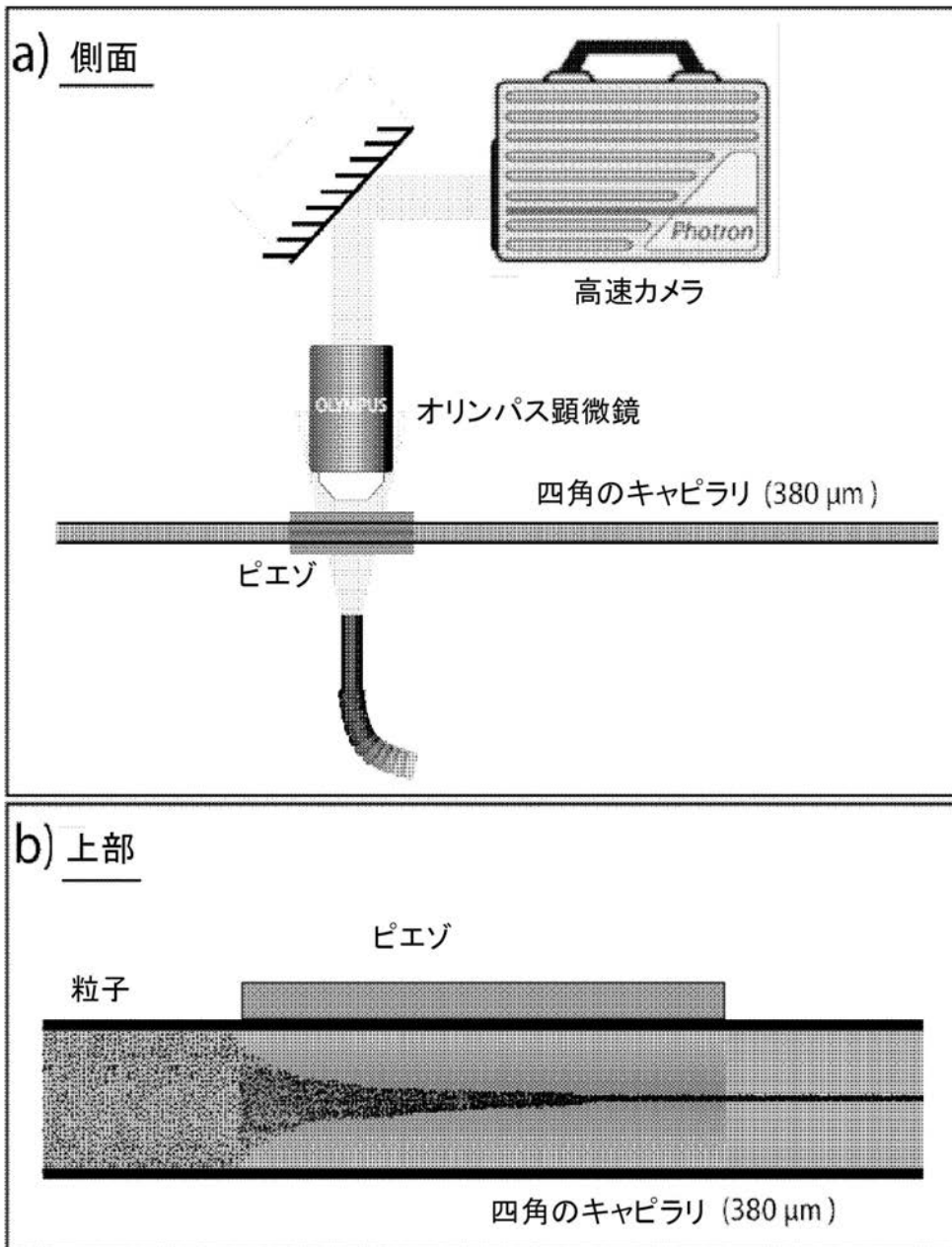
C



【図 15 B】

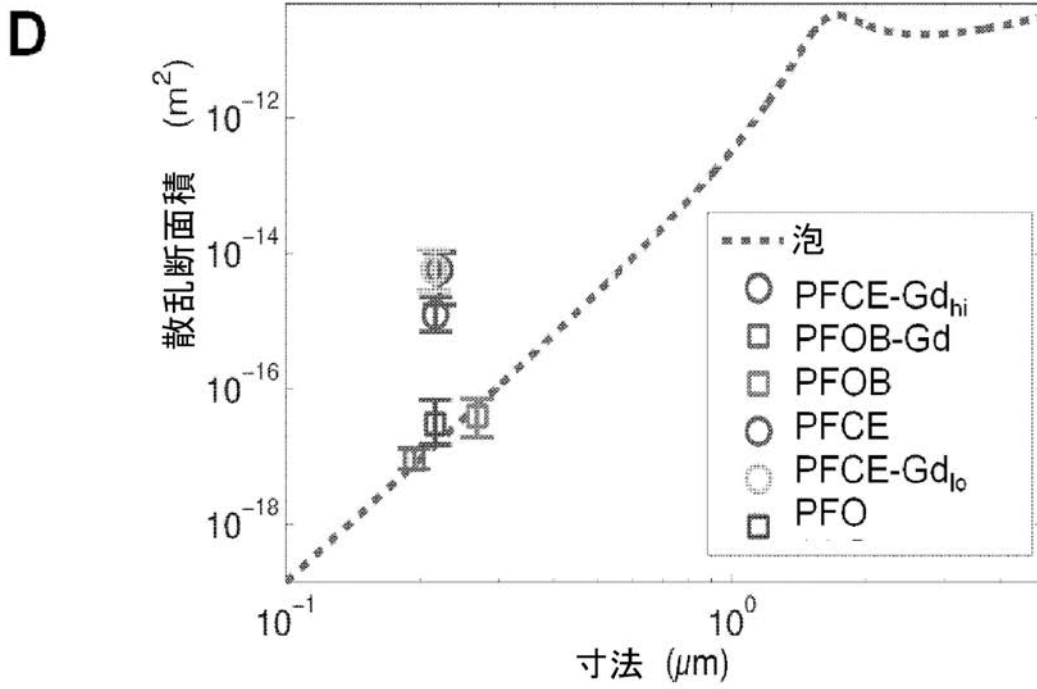
Figure 15B

B



【 図 1 5 D 】

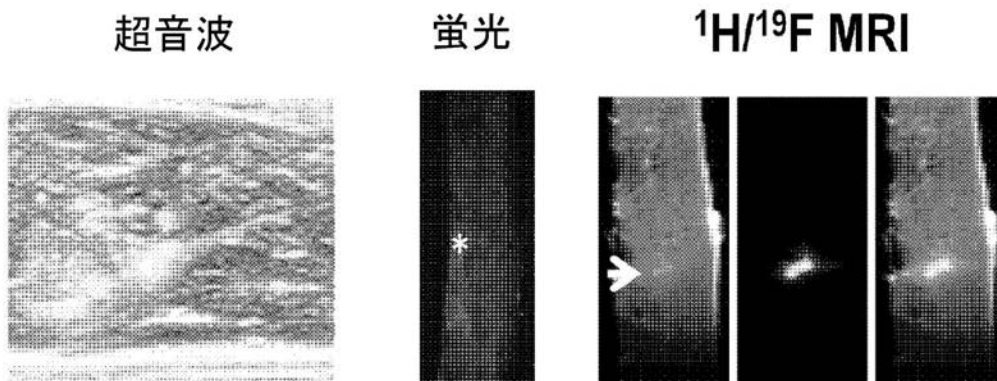
Figure 15D



【 図 1 6 A 】

Figure 16A

A



【図 16 B】

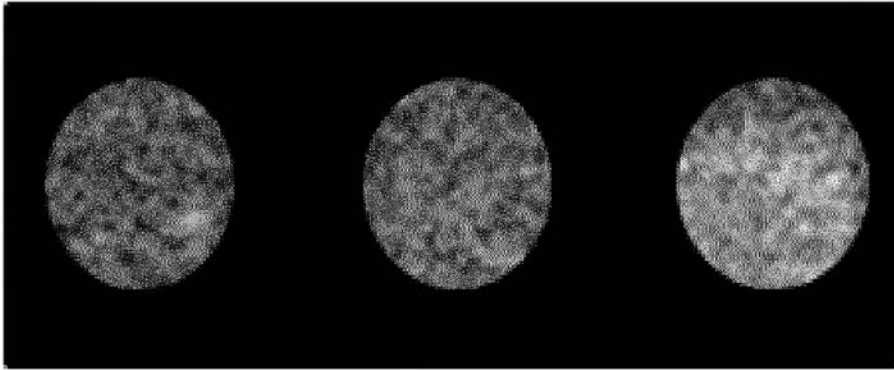
Figure 16B

B

非標識

PFO-標識

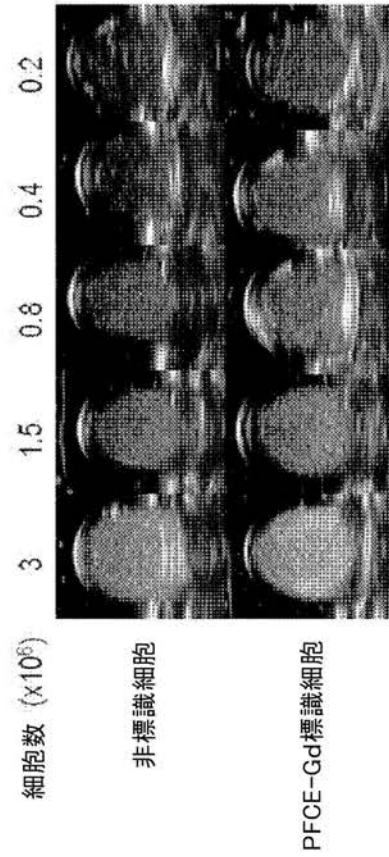
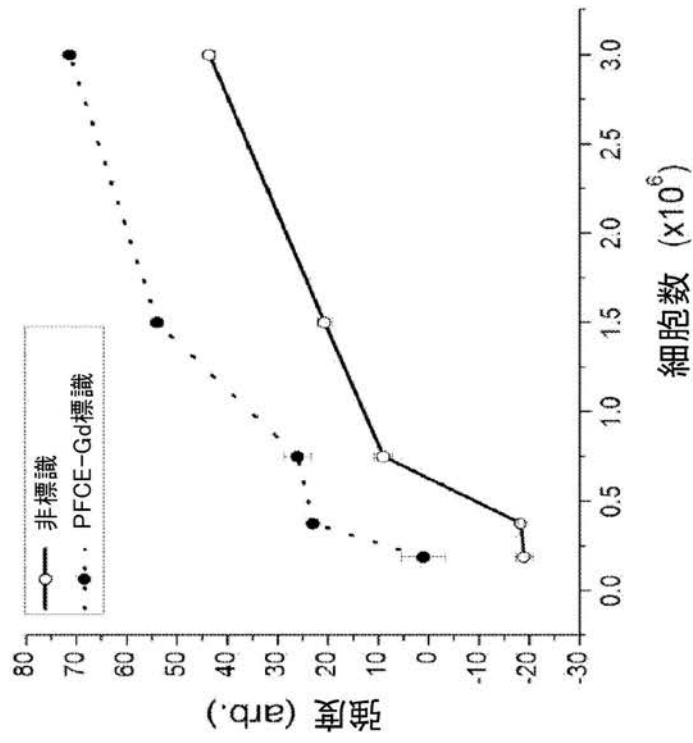
PFCE-Gd標識



【 図 1 6 C 】

Figure 16C

C



【図 17 A】

Figure 17A

A

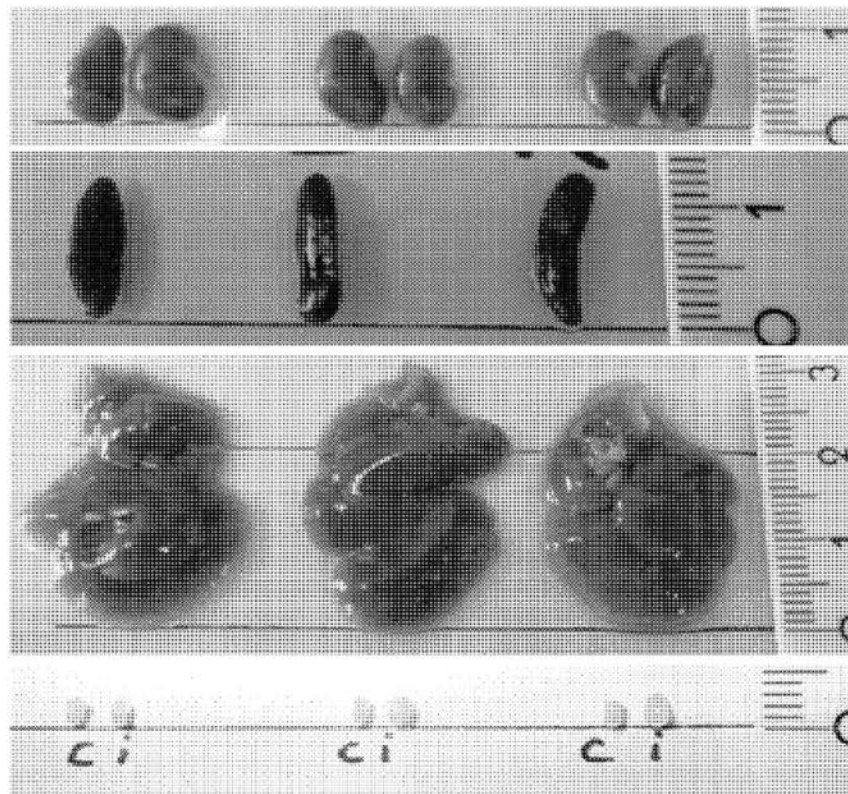


【図 17 C】

Figure 17C

C

コントロール 20mg 皮下注射



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2013/069079

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	A61K49/00	A61K49/22
	A61P37/00	B82Y5/00
		B82Y15/00
	A61K49/18	A61P35/00
		A61P9/00
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	M. SRINIVAS ET AL.: "Non-emulsion clinical gadolinium/perfluorocarbon nanoparticles for 19F MRI", INTERNATIONAL SOCIETY FOR MAGNETIC RESONANCE IN MEDICINE, May 2012 (2012-05), XP040626761, the whole document ----- -/--	1-14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
14 November 2013		21/11/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Monami, Amélie

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/069079

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SRINIVAS M ET AL: "Customizable, multi-functional fluorocarbon nanoparticles for quantitative in vivo imaging using <19>F MRI and optical imaging", BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB, vol. 31, no. 27, 1 September 2010 (2010-09-01), pages 7070-7077, XP027124639, ISSN: 0142-9612 [retrieved on 2010-06-20] abstract page 7071, column 1, paragraph 2 - column 2, paragraph 6</p> <p>-----</p>	1-14
A	<p>WO 2012/113733 A1 (UNIV JW GOETHE FRANKFURT MAIN [DE]; KREUTER JOERG [DE]; ULBRICH KARSTE) 30 August 2012 (2012-08-30) page 7, paragraph 2 examples 1-3</p> <p>-----</p>	1-14
A	<p>WO 00/71172 A1 (BARNES JEWISH HOSPITAL [US]) 30 November 2000 (2000-11-30) examples 13-23 page 15, line 23 - page 16, line 10</p> <p>-----</p>	1-14
A	<p>CARUTHERS SHELTON D ET AL: "In vitro demonstration using F-19 magnetic resonance to augment molecular imaging with paramagnetic perfluorocarbon nanoparticles at 1.5 Tesla", INVESTIGATIVE RADIOLOGY, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, US, vol. 41, no. 3, 1 March 2006 (2006-03-01), pages 305-312, XP009104335, ISSN: 0020-9996, DOI: 10.1097/01.RLI.0000199281.60135.6A abstract page 306, column 1, paragraph 3 - column 2, paragraph 1 figure 1</p> <p>-----</p>	1-14
A	<p>US 2011/020239 A1 (BULTE JEFF [US] ET AL) 27 January 2011 (2011-01-27) cited in the application examples 1-3</p> <p>-----</p>	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/069079

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012113733 A1	30-08-2012	NONE	
WO 0071172 A1	30-11-2000	AU 4097599 A EP 1251877 A1 US 5958371 A WO 0071172 A1	12-12-2000 30-10-2002 28-09-1999 30-11-2000
US 2011020239 A1	27-01-2011	EP 2155065 A1 US 2011020239 A1 WO 2008144028 A1	24-02-2010 27-01-2011 27-11-2008

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 45/00	(2006.01)	A 6 1 K 47/22	
A 6 1 K 39/395	(2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	V
A 6 1 P 9/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 37/02	(2006.01)	A 6 1 P 37/06	
G 0 1 N 33/58	(2006.01)	A 6 1 P 37/02	
G 0 1 N 33/543	(2006.01)	A 6 1 P 37/02	
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	A 6 1 K 49/02	C
G 0 1 N 33/48	(2006.01)	G 0 1 N 33/58	Z
C 0 7 K 16/00	(2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 4 1 Z
		G 0 1 N 33/53	Y
		G 0 1 N 33/48	P
		C 0 7 K 16/00	

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

(72)発明者 フリース, デ, インフリット ヨランダ モニーケ
オランダ国 ナイメーヘン ドロストパト 1 2

(72)発明者 スリニファス, マンハーラ
オランダ国 ロッテルダム ハイデクライト 7 8

(72)発明者 クルズ リコンド, ルイス ヤフィール
オランダ国 ナイメーヘン アウデ モーレンウエフ 2 5 1

Fターム(参考) 2G045 AA24 AA29 AA40 BA13 BA14 BB25 CA18 CB01 CB17 FA16
FA19 FB03 FB12 FB15 GB01 GC11 GC15 JA01
4C076 AA31 CC03 CC07 CC11 CC27 DD59 DD60 EE24 FF34
4C084 AA17 MA41 NA13 ZA361 ZB081 ZB261
4C085 AA13 HH03 HH07 HH11 JJ11 KA03 KA08 KA27 KA28 KA29
KA36 KB12 KB55 KB56 LL07 LL18
4H045 AA10 AA30 DA75 EA20

专利名称(译)	造影剂及其用于成像的用途		
公开(公告)号	JP2015534549A	公开(公告)日	2015-12-03
申请号	JP2015531585	申请日	2013-09-14
[标]申请(专利权)人(译)	保持人类Tinguka保守党柯统一费尔指定 天主教大学基金会		
申请(专利权)人(译)	斯蒂廷Katorike统一下挫指定		
[标]发明人	フィフドルカールフスタフ フリースデインフリットヨランダモニーケ スリニファスマンハーラ クルズリコンドルイスヤフィール		
发明人	フィフドル,カール フスタフ フリース,デ,インフリット ヨランダ モニーケ スリニファス,マンハーラ クルズ リコンド,ルイス ヤフィール		
IPC分类号	A61K9/16 A61K49/00 A61K51/00 A61K47/34 A61K47/22 A61K45/00 A61K39/395 A61P35/00 A61P9/00 A61P37/06 A61P37/02 G01N33/58 G01N33/543 G01N33/53 G01N33/48 C07K16/00		
CPC分类号	A61K49/0002 A61K49/0034 A61K49/0093 A61K49/1818 A61K49/225 A61P9/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 A61K49/221		
FI分类号	A61K9/16 A61K49/00.A A61K49/00.C A61K49/02.A A61K47/34 A61K47/22 A61K45/00 A61K39/395.V A61P35/00 A61P9/00 A61P37/06 A61P37/02 A61K49/02.C G01N33/58.Z G01N33/543.541.Z G01N33/53.Y G01N33/48.P C07K16/00		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BA14 2G045/BB25 2G045/CA18 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/FA16 2G045/FA19 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/FB15 2G045/GB01 2G045/GC11 2G045/GC15 2G045/JA01 4C076/AA31 4C076/CC03 4C076/CC07 4C076/CC11 4C076/CC27 4C076/DD59 4C076/DD60 4C076/EE24 4C076/FF34 4C084/AA17 4C084/MA41 4C084/NA13 4C084/ZA361 4C084/ZB081 4C084/ZB261 4C085/AA13 4C085/HH03 4C085/HH07 4C085/HH11 4C085/JJ11 4C085/KA03 4C085/KA08 4C085/KA27 4C085/KA28 4C085/KA29 4C085/KA36 4C085/KB12 4C085/KB55 4C085/KB56 4C085/LL07 4C085/LL18 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/DA75 4H045/EA20		
优先权	2012184562 2012-09-14 EP		
其他公开文献	JP6293149B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及造影剂增强的医学诊断超声成像。特别地，提供了可用于细胞成像和细胞疗法的造影剂。更特别地，它提供包含氟化有机化合物和金属的颗粒。这种颗粒可有利地用于定性或定量成像，例如声学成像，包括光声和超声成像，MRI成像，例如19F成像，1H成像，包括T1和T2加权成像，SPECT，PET，闪烁成像和荧光成像。然后，这可以用于细胞标记，显微术，组织学或用于体内和体外成像脉管系统或灌注。

(21) 出願番号	特願2015-531585 (P2015-531585)	(71) 出願人	515070044
(86) (22) 出願日	平成25年9月14日 (2013. 9. 14)		ステイヒティング カトリケ ヌニフェ ルシテイト
(85) 翻訳文提出日	平成27年5月13日 (2015. 5. 13)		STICHTING KATHOLIEK E UNIVERSITEIT
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/069079		オランダ国 ナイメーヘン ゲールト フ ローテブライン-ザイト 10
(87) 国際公開番号	W02014/041150		Geert Grooteplein-Z uid 10 Nijmegen the Netherlands
(87) 国際公開日	平成26年3月20日 (2014. 3. 20)		
(31) 優先権主張番号	12184562.2	(74) 代理人	100075557
(32) 優先日	平成24年9月14日 (2012. 9. 14)		弁理士 西教 圭一郎
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(72) 発明者	フィドル, カール フスタフ オランダ国 セルトーヘンボス ウェスト ワル 54
			最終頁に続く