

(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2013-532629

(P2013-532629A)

(43) 公表日 平成25年8月19日 (2013.8.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 51/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/02 A	4 C 0 8 2
A 6 1 N 5/10 (2006.01)	A 6 1 N 5/10 P	4 C 0 8 5
A 6 1 B 19/00 (2006.01)	A 6 1 N 5/10 Z	
A 6 1 K 49/04 (2006.01)	A 6 1 B 19/00 5 O 2	
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/04 A	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 46 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2013-519107 (P2013-519107)
 (86) (22) 出願日 平成23年7月15日 (2011.7.15)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年3月7日 (2013.3.7)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2011/062122
 (87) 国際公開番号 W02012/007567
 (87) 国際公開日 平成24年1月19日 (2012.1.19)
 (31) 優先権主張番号 10169862.9
 (32) 優先日 平成22年7月16日 (2010.7.16)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 61/364, 917
 (32) 優先日 平成22年7月16日 (2010.7.16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

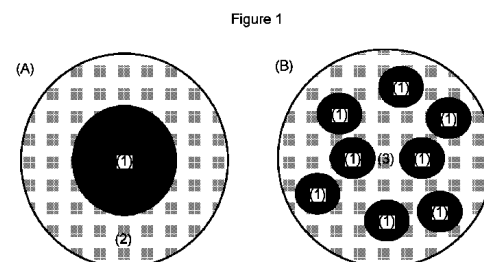
(71) 出願人 504213249
 テクニカル ユニバーシティ オブ デン
 マーク
 デンマーク王国 2800 コーゲーエス
 リュンビュー アンケル エンエルン
 ズバイ 1 ビルディング 101エー
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ナノ粒子誘導放射線治療

(57) 【要約】

本発明は、標的組織の画像誘導放射線治療 (IGRT) のための方法及びナノサイズ粒子に関する。より具体的には、該発明は、X線を遮断する能力を有し、同時の又は統合された体外照射療法及びコンピュータ断層撮影 (CT) を用いるなどのイメージングを可能とする、固体形態のX線イメージング造影剤を含むナノサイズ粒子に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

個体における標的組織の画像誘導放射線治療における使用のための、X線イメージングにより検出可能な固体形態の化合物を含むナノサイズ粒子を含む組成物であって、前記標的組織が望ましくない増殖をする細胞を含む、前記組成物。

【請求項 2】

前記画像誘導放射線治療が、以下のステップ：

a) 前記組成物を前記個体に投与し；

b) 前記標的組織のX線画像を記録して、前記標的組織の定義を得て；そして、

c) ステップb) において得られた前記標的組織の定義を用いて、前記標的組織に放射線治療を方向付ける、
を含み、ここで、ステップb) 及びc) が、連続的又は同時に実施される、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

前記ナノサイズ粒子が、少なくとも1時間の循環半減期を有する、請求項1又は2に記載の組成物。

【請求項 4】

前記ナノサイズ粒子が、10～150nmの個数平均径を有する、請求項1～3のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 5】

前記ナノサイズ粒子が、以下の：リポソーム、ポリマーソーム、デンドリマー、水溶性架橋ポリマー、ハイドロコロイド、ミセル、被覆金属粒子及び、コアが固体塩である被覆粒子、から成る群から選ばれる、請求項1～4のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 6】

前記ナノサイズ粒子がリポソームである、請求項1～5のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 7】

前記ナノサイズ粒子が、コアが固体金属及び／又は固体金属塩を含む被覆粒子である、請求項1～5のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 8】

前記ナノサイズ粒子が、ポリエチレングリコール（PEG）を含むシェル又は表面被覆を含む、請求項1～7のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 9】

前記検出可能な化合物が、水を除いた前記ナノサイズ粒子の少なくとも10重量パーセントである、請求項1～8のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 10】

前記検出可能な化合物が、固体金属又は固体金属塩の形態であり、かつ、以下の：金（Au）、ビスマス（Bi）、鉄（Fe）、バリウム（Ba）、カルシウム（Ca）、及びマグネシウム（Mg）から成る群から選ばれる一種以上の同位体を含む、請求項1～9のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 11】

前記検出可能な化合物が、金（Au）又はビスマス（Bi）、例えば、金（Au）、である、請求項1～10のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 12】

前記標的組織が、腫瘍細胞を含む、請求項1～11のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 13】

ステップa) における前記組成物の投与が、ステップb) におけるX線画像の記録を、ステップa) の後、少なくとも3日間可能とし、ここで場合により、前記ナノサイズ粒子が少なくとも8時間の循環半減期を有する、請求項2～12のいずれか1項に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 14】

請求項 2 におけるステップ b) が、三次元又は多次元座標データセットをもたらし、ここで、第四の次元が時間であり、前記データセットが前記標的組織の定義及び治療ガイドランスのために使用される、請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 15】

前記 X 線イメージングが、コンピュータ断層撮影 (CT) イメージングである、請求項 1～14 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 16】

前記ナノサイズ粒子が、一種以上のイメージングモダリティ、例えば、磁気共鳴イメージング (MRI)、ポジトロン放出断層撮影 (PET) イメージング、単光子放出コンピュータ断層撮影 (SPECT) イメージング又は核シンチグラフィイメージング、のための放射性又は常磁性化合物を含む、請求項 1～15 のいずれか 1 項に記載の組成物。

10

【請求項 17】

前記画像誘導放射線治療が、さらに、以下の：磁気共鳴イメージング (MRI)、ポジトロン放出断層撮影 (PET) イメージング、単光子放出コンピュータ断層撮影 (SPECT) イメージング、核シンチグラフィイメージング、超音波検査イメージング、超音波イメージング、近赤外イメージング又は蛍光イメージングから成る群から選ばれる、一種以上のイメージングモダリティによるイメージングステップを含む、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 18】

20

以下の：

(i) 脂質単層及び／又は脂質二重層などの脂質層を含む、シェル又は表面被覆；及び
(ii) 金 (Au) 及びビスマス (Bi) から成る群から選ばれるコンピュータ断層撮影 (CT) イメージングのための造影剤を含むコア、ここで、上記造影剤は、固体形態である、
を含む、X 線画像記録における使用のためのナノサイズ粒子。

【請求項 19】

前記ナノサイズ粒子が請求項 18 に定義されている、請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 20】

30

治療を必要とする個体における、細胞の望ましくない増殖を伴う状態又は疾患の治療方法であって、以下のステップ：

a) コンピュータ断層撮影 (CT) イメージングによって検出可能な化合物を含むナノサイズ粒子を提供し；

b) 前記ナノサイズ粒子を前記個体に投与し；

c) 前記望ましくない増殖をする細胞を含む標的組織のコンピュータ断層撮影 (CT) 画像を記録し、それによって、前記望ましくない増殖をする細胞の正確な位置及び正常組織からの区別を与える前記標的組織の定義を得て；

d) ステップ c) において得られた前記標的組織の定義を用いて、放射線治療を前記望ましくない増殖細胞に方向付け、かつ、正常組織を保護する、
を含み、ここで、前記化合物が固体形態であり、さらにここで、画像記録及び放射線治療の実行が統合され、そして、連続的又は同時に実施される、前記方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願中に引用された特許及び非特許文献はそれぞれ、参照することによりその全体が本明細書中に援用される。

【0002】

本発明の分野

本発明は、画像誘導放射線治療 (IGRT) のための方法及びナノサイズ粒子に関する

50

。より具体的には、本発明は、コンピュータ断層撮影（ＣＴ）イメージング（画像化）及び体外照射療法を同時にまたは統合して行うことを可能とする、Ｘ線遮断能力を有する固体形態のコンピュータ断層撮影（ＣＴ）イメージング造影剤を含むナノサイズ粒子に関する。

【背景技術】

【０００３】

背景技術

癌は、死亡の主な原因である。現在、世界的に８人中１人が癌により死亡する。癌に関するもう一つの衝撃的な事実は、それがすべての年齢の人を死に至らしめるということである。癌は、細胞の制御されない増殖に起因し、そして、癌の治癒的治療は、これらの悪性かつ増殖性の細胞を除去又は破壊することを目的とする。

10

【０００４】

放射線治療

３つの異なる方法：手術、化学療法及び放射線治療が、癌の治療のために一般的に使用される。放射線治療は、広範囲の異なる癌のタイプの治療のために一般的に用いられる方法であり、最も一般的な癌のタイプが何らかの方法で放射線治療により治療可能である。

【０００５】

非全身性かつ非侵襲性の治療法であることが、化学療法及び手術に対する体外照射療法の主な利点であり、そして、放射線治療は、手術が困難な様々な癌のタイプの治療のためにますます好まれている。癌の最適な治療のために、放射線治療はしばしば上記の他の治療法と併用される。

20

【０００６】

放射線治療の目的は、正常組織を保護しつつ癌組織を破壊することである。この目的を追及することは、正常で健康な組織への照射が重い副作用をもたらす、あるタイプの癌にとって特に重要である。一例は、前立腺癌の放射線治療であり、前立腺は、膀胱の下かつ直腸の前面に位置しており、直腸損傷、失禁及びインポテンスなどの重い副作用を回避するために、体外照射が前立腺に集中することは重要である。もう一つの例は、癌性組織と生命維持機能に関与する健康組織との間の距離が非常に小さい可能性のある、脳腫瘍である。

【０００７】

治療及びイメージング中／それらの合間に動く組織中の腫瘍の照射治療は、放射線治療における主要な課題の一つである。動きは、たとえば、器官の中身の相違により引き起こされるか又は呼吸中の動きであることができる。この問題を解決するために、肺癌にかかった患者は放射線治療の間に呼吸しないよう指示される。しかしながら、他の多くのタイプの癌については、非随意運動の主体である組織に隣接して又はその内部に腫瘍が位置しうするため、治療はさらに複雑である。

30

【０００８】

イメージング

正常組織を保護し、かつ健康組織における放射線の有害な副作用を回避するためには、正常で健康な細胞に対する、悪性細胞の標的体積の明確な定義を得ることが最も重要である。

40

【０００９】

悪性細胞の定義は、様々なイメージングモダリティを使用することにより得られる。したがって、イメージングは、放射線治療の基礎である。今日、主なイメージングモダリティは、コンピュータ断層撮影（ＣＴ）イメージング、磁気共鳴イメージング（ＭＲＩ）、ポジトロン放出断層撮影（ＰＥＴ）イメージング、及び単光子放出コンピュータ断層撮影（ＳＰＥＣＴ）イメージングである。

【００１０】

ＣＴイメージングは、対象の定義が様々なアングルから取得された多数の二次元Ｘ線画像から得られる方法である。Ｘ線を遮断するその能力に基づいて様々な身体構造を明示す

50

るために、C Tイメージングは操作可能な大量のデータを作成する。最新のスキャナーは、この大量のデータを様々な平面にリフォーマットすることを可能とし、構造の立体（3 D）表現を獲得する。C Tイメージングは、利用性、効率性及びコストに関して、今日の病院において最も便利なイメージング／診断ツールの一つである。

【0011】

放射線療法用に三次元で明確に定義された標的体積を測定するために、異なるイメージングモダリティがしばしば併用される。たとえば、C T画像は、ポジトロン放出断層撮影（P E T）及び／又は磁気共鳴（M R）イメージングにより補完される。この組み合わせは、二種以上の異なるイメージングモダリティからの情報が相互に関係付けられ、そしてオーバーレイ画像で読み取られ、標的悪性細胞量についてのより正確な情報とそれによる正確な診断に導くことを可能とする。

10

【0012】

計画、入れ墨及び画像誘導放射線治療

放射線治療による処置の重要な部分は、放射線量の計画である。決定された標的悪性細胞への放射線送達のパターンは、最適化と治療シミュレーション（治療計画）を行うために個々によく応じたコンピューティング・アプリケーションを用いて決定される。線量は、放射線強度を制御又は変調することによって腫瘍の3 D形状と合致する。線量強度は、肉眼的腫瘍体積近くでは高められるが、隣接した正常組織中の放射線は低減されるか又は完全に回避される。個別化された線量は、腫瘍に対する線量を最大化する一方、同時に周囲の正常組織を保護することを目的とする。これは、より良好な腫瘍ターゲティング、低減された副作用、及び改善された治療成果をもたらすことができる。

20

【0013】

一般に、計画の時には、治療の目的領域の輪郭が放射線腫瘍医によって手作業で描かれる。治療域が決定されたら、皮膚上に目印がつけられることができる。インクによるマークの目的は、範囲設定の再現性を改善するために、治療のために毎日患者を位置調整して位置決めすることである。放射線治療室において照射野（又はその表示）と目印を合わせることで、治療域の正確な設定が確認されることができ（D a w s o n & S h a r p e 2006）。

【0014】

時間がたつにつれて、テクノロジーの進歩（十字線付き光照射野、アイソセントリックレーザー）及び「入れ墨」（インクによるマーキングが、皮膚の第一層のすぐ下の示された位置に針を用いてインクを適用することによる永久的なマークに置き換えられた手順）のプラクティスへのシフトにより、患者のセットアップの再現性が改善した。

30

【0015】

「オンラインストラテジー」と呼ばれる他のストラテジー又は画像誘導放射線治療（I G R T）においては、手順全体にわたって持続的に更新される情報に基づいて治療過程の間の患者及びビームの位置が調整される（D a w s o n & S h a r p e 2006）。該オンラインアプローチは、ソフトウェア及びハードウェア両方の高レベルの統合を必要とする。このストラテジーの利点は、体系的及びランダムなエラーの両方が減少することであり、それは、二次元及び三次元イメージング技術が採用されて、標的の位置を測定し、治療の送達の直前又はその間に標的の位置のエラーを補正するからである。I G R Tは、周囲の又は隣接する健康な組織又は器官への露出を低減する一方、腫瘍などの標的への放射線のデリバリーのより正確な制御を可能とする。

40

【0016】

イメージング用マーカー

I G R Tのような新しい技術及び一般的な放射線治療の成功した使用は、イメージング結果の質及びイメージング用マーカーの使用の容易化に大きく依存する。イメージング用マーカーは今日、I G R T及び診断の分野の弱点である。

【0017】

一つの例は、前立腺癌の治療における、マーカーに基づくI G R Tプログラムの使用で

50

ある。金マーカーは、前立腺中に埋め込まれ、腺の代わりに位置を提供する。毎日の治療の前に、ポータルイメージングシステムの結果が記録される。質量中心が3 mmより大きく動いた場合、カウチが再調整され、次の参照イメージが作られる (J a f f r a y e t a l . 1 9 9 9)。かかるストラテジーの欠点は、マーカーが手術によって埋め込まなければならないこと、及び、多数の癌タイプに関して埋め込みが容易に実施されないことである。

【0018】

残念ながら、多くの他の副作用もイメージングに重大な制限をもたらす。たとえば、ヨウ素又はガドリニウムを含む多くの現行のX線又はMRイメージング用造影剤の使用は、短い撮像時間、カテーテル挿入の必要性、時折発生する腎毒性及び大柄の患者における低いコントラストの問題の影響を受ける (H a i n f e l d e t a l . 2 0 0 6)。

10

【0019】

短い撮像時間の問題を克服するために、P C T国際特許出願公開第W O 2 0 0 6 / 0 8 4 3 4 2号及びZ h e n g e t a l . (2 0 0 6)は、より長いインビボ滞留時間を提供する、リポソーム中の溶解した造影剤の製剤を記載する。造影剤は、併用されたC T及びM Rイメージングのための、溶解したイオヘキソールとガドテリドールの製剤である。しかしながら、造影剤は溶解していてリポソーム内で比較的低濃度であるとみられるため、このタイプのリポソームを用いた場合のC T画像の質は比較的低い。

【0020】

P C T国際特許出願公開第W O 2 0 0 7 / 1 2 9 3 1 1号はさらに、C Tイメージングのための溶解したヨウ素標識造影剤の製剤を含むリポソームを記載し、ここで、リポソーム内部の造影剤の脂質質量に対する重量／重量比は、2 0 %と低いものでありうる。該方法は、溶液中にあるか又は脂質膜中に埋め込まれた造影剤に依存するため、このタイプのリポソームを使用した場合のC T画像の質は低い。

20

【0021】

P C T国際特許出願公開第W O 2 0 0 4 / 0 1 7 8 1 4号は、組織中の炎症の検出において使用するためのヨウ素、カルシウム或いは放射性追跡子に基づくナノ粒子造影剤の使用を示唆する。

【0022】

ヨウ素に比した高コントラストにより、最近、新しいX線造影剤として金粒子が示唆されている。H a i n f e l dらは、X線イメージングと併用した直径1 . 9 nmの金ナノ粒子が、血管新生性及び血管過多の組織を検出した試験を記載している (H a i n f e l d e t a l . 2 0 0 6)。しかしながら、かかる小さな金粒子は、患者におけるナノ粒子の速いクリアランス及び低い滞留性の問題と結びついており、低コントラスト及び画質の低さをもたらす。

30

【0023】

P C T国際特許出願公開第W O 2 0 0 7 / 1 2 9 7 9 1号は、X線造影剤としての使用のためのポリエチレングリコール (P E G) 被覆金ナノ粒子を記載する。この出願は、該ナノ粒子を非毒性で血管中に長時間留まるものとして記載する。この出願中には、健康組織が放射線から保護される治療方法についての特別な言及はない。

40

【0024】

C h i t h r a n iらは、リポソーム中に含まれる金粒子の細胞内取り込みを研究したが、提案されたその用途は放射線治療促進剤としてであった (C h i t h r a n i e t a l . , 2 0 1 0)。

【0025】

現在、画像誘導放射線治療のための改善された方法及び造影剤に対する強い必要性がある。

【発明の概要】

【0026】

発明の要約

50

本発明は、画像誘導放射線治療のための方法及びナノサイズ粒子に関する。より具体的には、本発明は、固体形態のコンピュータ断層撮影（C T）イメージング造影剤を含むナノサイズ粒子に関し、それは、併用されたコンピュータ断層撮影（C T）イメージングと放射線治療による、標的組織のより安全な治療を可能とする。

【0027】

本発明は、個体における、細胞の望ましくない増殖を伴う状態又は疾患の治療方法を提供し、ここで、該方法は、以下のステップ：

a) コンピュータ断層撮影（C T）イメージングなどのX線に基づくイメージングにより検出可能な化合物を含むナノサイズ粒子を提供し、

b) 上記ナノサイズ粒子を上記個体に投与し、

c) 上記望ましくない増殖細胞の正確な位置及び正常組織からの区別を与える標的組織の決定をそれによって獲得する、望ましくない増殖細胞のX線に基づく画像、例えば、コンピュータ断層撮影（C T）画像、を記録し、

d) ステップc)において得られた標的組織の決定を用いて、体外照射療法を上記望ましくない増殖細胞に方向付け、かつ、正常組織を保護する、を含み、ここで、上記化合物が固体形態であり、さらにここで、画像記録及び放射線治療の実行が統合され、そして、連続的又は同時に実施される。

【0028】

本発明の方法は、三次元又は多次元、例えば、三次元又は四次元の座標データセット、例えば、四次元座標データセットとして、イメージング結果を提供することができ、ここで、第四の次元は時間であり、該データセットは標的組織の正確な決定のために使用される。

【0029】

ナノサイズ粒子は、例えば、リボソーム、ポリマーソーム（polymerosome）、デンドリマー、水溶性架橋ポリマー、ハイドロコロイド、ミセル、被覆金属粒子及びコアが固体塩である被覆粒子から成る群から選ばれることができる。この群の各メンバーは、別個の特異的な実施態様を表す。

【0030】

さらに、検出可能な化合物は、以下の：金（Au）、ヨウ素（I）、ガドリニウム（Gd）、ビスマス（Bi）、鉄（Fe）、バリウム（Ba）、カルシウム（Ca）、マグネシウム（Mg）から成る群から選ばれる一種以上の同位体を含むことができる。一実施態様において、検出可能な化合物は、金（Au）又はビスマス（Bi）である。他の実施態様において、検出可能な化合物は、金（Au）である。

【0031】

一実施態様において、ナノサイズ粒子は、粒子内の水を除いた該ナノサイズ粒子の総重量に対して少なくとも10%、例えば、少なくとも20%、例えば、少なくとも30%、例えば、少なくとも40%、例えば、少なくとも50%、例えば、少なくとも60%、例えば、少なくとも70%、例えば、少なくとも80%、例えば、少なくとも90%、例えば、少なくとも95%、例えば、90~100%、例えば、95%~99%、の重量パーセントの検出可能な化合物を含む。

【0032】

本発明の方法は、さらに、コンピュータ断層撮影（C T）イメージングなどのX線に基づくイメージングが、以下の：磁気共鳴イメージング（MRI）、ポジトロン放出断層撮影（PET）イメージング、単光子放出コンピュータ断層撮影（SPECT）イメージング、核シンチグラフィイメージング、超音波イメージング、近赤外イメージング又は蛍光イメージングから成る群からの一種以上のイメージングモダリティと併用される、イメージングステップを含んでよい。

【0033】

本発明の方法は、さらに、投与後3日以上、例えば、3~30日間、例えば、30~100日間、又は例えば、100~200日間、又は例えば、200~300日間、又は例

10

20

30

40

50

えば、300～400日間、コンピュータ断層撮影（CT）イメージングを可能とすることができる。

【0034】

本発明の好ましい実施態様において、該方法は、投与後3～120日間、コンピュータ断層撮影（CT）イメージングを可能とする。

【0035】

本発明はまた、X線イメージングによって検出可能な固体形態の化合物を含むナノサイズ粒子を含む、個体における標的組織の画像誘導放射線治療における使用のための組成物も提供し、該標的組織は望ましくない増殖細胞を含む。本発明はまた、望ましくない増殖細胞を含む標的組織の画像誘導放射線治療のための方法を提供し、ここで、該方法は、そのような組成物を投与することを含む。

10

【0036】

組成物又は方法の一実施態様において、画像誘導放射線治療は、以下のステップ：a) 上記組成物を上記個体に投与して、；b) 標的組織のX線画像を記録して、標的組織を決定し；そして、c) ステップb) において得られた上記標的組織の決定を使用して、上記標的組織に放射線治療を方向付ける、を含む。ステップb) とc) は、連続的又は同時に実施されることができる。

【0037】

一実施態様において、本発明は、癌性疾患の画像誘導治療のための方法及びナノサイズ粒子を提供する。

20

【0038】

本発明の方法又は組成物の任意の実施態様のナノサイズ粒子は、少なくとも1時間、例えば、2～4時間、好ましくは、少なくとも4～6時間、例えば、少なくとも6時間、例えば、少なくとも8時間、例えば、少なくとも10時間、例えば、少なくとも12時間、例えば、少なくとも14時間、例えば、少なくとも24時間、例えば、少なくとも36時間、例えば、少なくとも48時間、例えば、少なくとも72時間、例えば、少なくとも120時間、の循環中での半減期を有することができる。さらに又はその代わりに、該半減期は、1～72時間、12～36時間、1～24時間、10～24時間、5～15時間、24～36時間、24～72時間、36～96時間、48～96時間、48～120時間、72～120時間、又は72～168時間であることができる。

30

【0039】

さらに又はその代わりに、ナノサイズ粒子は、10～150nmのサイズ、例えば、10～150nmの個数平均径、10～50nmの個数平均径、10～20nmの個数平均径を有することができる。

【0040】

例示的なナノサイズ粒子は、リボソーム、ポリマーソーム、デンドリマー、水溶性架橋ポリマー、ハイドロコロイド、ミセル及び被覆金属粒子から成る群から選ばれるか、又はコアが固体塩である被覆粒子である。

【0041】

特別な実施態様において、ナノサイズ粒子はリボソームである。任意の先の実施態様の他の特別な実施態様において、ナノサイズ粒子は、固体、例えば、コアが金属及び／又は固体塩を含む被覆粒子である。

40

【0042】

任意の先の実施態様の検出可能な化合物は、水を除いたナノサイズ粒子の少なくとも10重量%、例えば、少なくとも20重量%、例えば、少なくとも30重量%、例えば、少なくとも50重量%、例えば、少なくとも60重量%、例えば、少なくとも70重量%、例えば、少なくとも80重量%、例えば、少なくとも90重量%、例えば、少なくとも95重量%、例えば、90重量%～100重量%、例えば、95重量%～99重量%であってよい。

【0043】

50

検出可能な化合物は、さらに、固体金属又は固体金属塩の形態であってよく、かつ、金（Au）、ビスマス（Bi）、鉄（Fe）、バリウム（Ba）、カルシウム（Ca）、及びマグネシウム（Mg）から成る群から選ばれる一種以上の同位体を含んでよい。一実施態様において、検出可能な化合物は、金（Au）又はビスマス（Bi）である。他の実施態様において、検出可能な化合物は、金（Au）である。

【0044】

一実施態様において、ナノサイズ粒子は、実施例に記載の方法によって、例えば、実施例 I. a、I. b、I. c、I. d、I. e；II. a、II. b、II. c、II. d、II. e、II. f、II. g、II. h、II. i 及び III. のうちの少なくとも一つの方法によって得られることができる。

10

【0045】

本発明の組成物又は方法の任意の実施態様において、標的組織は腫瘍細胞を含んでよい。

【0046】

ステップ a) における組成物の投与は、ステップ a) の後少なくとも 3 日間、例えば、ステップ a) の後、3～120 日間、ステップ b) における X 線画像の記録を可能とし、ここで場合により、ナノサイズ粒子は、少なくとも 8 時間、例えば、少なくとも 10 時間、例えば、少なくとも 12 時間、例えば、少なくとも 24 時間、例えば、少なくとも 36 時間、例えば、少なくとも 120 時間の循環半減期を有する。

20

【0047】

さらに、ステップ b) は、三次元又は多次元、例えば、三次元又は四次元の座標データセット、例えば、四次元座標データセットを提供することができ、ここで、第四の次元は時間であり、該データセットは標的組織の決定及び治療ガイダンスのために使用される。

【0048】

好ましくは、任意の先の実施態様の X 線イメージングは、コンピュータ断層撮影（CT）イメージングである。

【0049】

特別な実施態様において、ナノサイズ粒子は、さらに、一種以上のイメージングモダリティ、例えば、磁気共鳴イメージング（MRI）、ポジトロン放出断層撮影（PET）イメージング、単光子放出コンピュータ断層撮影（SPECT）イメージング又は核シンチグラフィイメージング、のための放射性又は常磁性化合物を含んでよい。かかる実施態様において、画像誘導放射線治療は、さらに、一種以上の好適なイメージングモダリティ、例えば、磁気共鳴イメージング（MRI）、ポジトロン放出断層撮影（PET）イメージング、単光子放出コンピュータ断層撮影（SPECT）イメージング、核シンチグラフィイメージング、超音波検査イメージング（ultrasonography imaging）、超音波イメージング、近赤外イメージング及び／又は蛍光イメージング、によるイメージングステップを含んでよい。

30

【0050】

本発明はさらに、画像記録及び／又は体外照射療法における使用のためのナノサイズ粒子であって、以下の：

40

（i）脂質単層及び／又は脂質二重層などの脂質層を含む、シェル又は表面被覆、

（ii）金（Au）、ビスマス（Bi）、カルシウム（Ca）、バリウム（Ba）及び鉄（Fe）の群から選ばれる、コンピュータ断層撮影（CT）などの X 線に基づくイメージングのための造影剤を含むコア、
を含み、ここで、該造影剤は固体形態である、上記ナノサイズ粒子を提供する。

【0051】

一実施態様において、造影剤は、金（Au）及びビスマス（Bi）から選ばれる。他の実施態様において、造影剤は、金（Au）である。

【0052】

本発明は、さらに、本発明のナノサイズ粒子の調製方法を提供する。

50

【0053】

本発明のさらなる目的は、本発明の方法における使用のためのシステムであって、標的組織の決定を得るための統合されたコンピュータ断層撮影（CT）イメージング装置、統合された体外照射装置及び該装置のデータを処理するための統合されたコンピュータを含み、ここで、該システムは、コンピュータ断層撮影（CT）イメージング装置により得られた決定に基づいて体外照射療法を方向付けることができる、上記システムを提供することである。

【図面の簡単な説明】

【0054】

【図1】図1は、例示的なナノサイズ粒子CT造影剤を図示する。ナノサイズ粒子造影剤は、例えば、構造（A）又は（B）の形態であることができる。構造（A）は、粒子に循環特性（*circulating properties*）を与える材料、例えば、PEG又は脂質などのポリマー系、からなり、単層などの層構造又はPEGによりさらに機能付加されうるリポソーム形態のいずれかとしてのシェル（2）により取り囲まれた、金属又は固体塩の造影剤を含む内部コア（1）により構成される。構造（A）の内部コア（1）はさらに、沈殿した塩又は金ナノ粒子などのより小さなナノ構造を含む水相、或いは、金ナノ粒子などのナノ構造を含むポリマーマトリックスであることができる。構造（B）は、ナノサイズ粒子に循環特性を与え、さらにCT造影剤として作用する封入された塩又は金属を含む、マトリックス（3）から成る。構造（A）及び（B）はどちらも、非共有結合又は共有結合で結合した、本発明に記載される他のイメージングモダリティによって可視である剤を含むことができる。

【0055】

発明の詳細な説明

現在、治療の前又はその間の照射標的体積の決定を容易化する、ハイコントラストマーカーが必要とされている。本発明の目的は、ナノ粒子、これらのナノ粒子の使用法、及びそれらを必要とする個体の、より安全でより痛みが少なく、かつ、より安価なイメージング及び放射線治療を可能とする、統合されたイメージング及び放射線治療のためのシステムを提供することである。

【0056】

本発明のナノサイズ粒子は、造影マーカーを標的悪性細胞に位置づけるために十分に長い間、循環中に留まる。望ましくない増殖をする組織中のこの直接的なマーカーの局在化は、治療のための標的組織の正確な決定を可能とする。さらに、本発明によれば、造影剤は長時間検出可能であり、複数回投与の必要性と毒性リスクを低減させる。

【0057】

ナノサイズ粒子

本発明のナノサイズ粒子は、コンピュータ断層撮影（CT）イメージングにより検出可能な造影剤を含む。

【0058】

さらに、本発明のナノサイズ粒子は、コンピュータ断層撮影（CT）イメージング及び一種以上の追加のイメージングモダリティにより検出可能な造影剤を含んでよい。

【0059】

造影剤又は検出可能な化合物

本明細書において、「検出可能な化合物」及び「造影剤」という表現は交換可能に使用される。本発明の目的は、X線及びCTイメージングのための固体形態の検出可能な化合物又は造影剤を含むナノサイズ粒子を提供することである。かかる検出可能な化合物は、X線を遮断するか又は減弱することができ、周期表に定義された遷移金属、希土類金属、アルカリ金属、アルカリ土類金属、他の金属を含む。かかる検出可能な化合物は、金（Au）、ガドリニウム（Gd）、ビスマス（Bi）、鉄（Fe）、バリウム（Ba）、カルシウム（Ca）又はマグネシウム（Mg）の群から選ばれる一種以上の化合物を含み、ここで、上記金属又はアルカリ金属は、非酸化状態又は金属に関する既存の酸化状態のい

れかであってよい。これらの酸化状態は、一価の陽イオン、二価の陽イオン、三価の陽イオン、四価の陽イオン、五価の陽イオン、六価の陽イオン及び七価の陽イオンを含む。

【0060】

本発明の好ましい実施態様において、検出可能な化合物は、金（Au）、ビスマス（Bi）、ガドリニウム（Gd）、鉄（Fe）、バリウム（Ba）及びカルシウム（Ca）の群から選ばれる一種以上の化合物を含む。

【0061】

本発明のさらに好ましい実施態様において、検出可能な化合物は、金（Au）及びビスマス（Bi）の群から選ばれる一種以上の化合物を含む。

【0062】

本発明のX線及びCTイメージングのための造影剤は、ナノサイズ粒子内に含まれ、該粒子のシェルに非共有結合又は共有結合しうる。

【0063】

本発明の目的は、固体金属形態、固体塩形態、固体アルカリ金属形態、凝集形態、結晶化形態又は沈殿形態などの固体形態の検出可能な化合物を含むナノサイズ粒子を提供することである。

【0064】

好ましくは、検出可能な化合物は、固体金属形態、固体塩形態又は固体アルカリ金属形態である。

【0065】

本発明のナノサイズ粒子内に含まれる造影剤の量は、ナノサイズ粒子のシェルの重量に対する造影剤の重量パーセントを定めること、又は調製されたナノサイズ粒子内の造影剤のサイズを定量することによって、ナノサイズ粒子に含まれる水を除いたナノサイズ粒子の総重量に対する造影剤の重量パーセントで定量化されることができる。

【0066】

本発明の好ましい実施態様において、検出可能な化合物は、水を除いたナノサイズ粒子の総重量に対して少なくとも10%の重量パーセント、例えば、少なくとも20%、例えば、少なくとも30%、例えば、少なくとも40%、例えば、少なくとも50%、例えば、少なくとも60%、例えば、少なくとも70%、例えば、少なくとも80%、例えば、少なくとも90%、例えば、少なくとも95%、例えば、少なくとも99%、例えば、90%～100%、例えば、95%～99%の重量パーセントを水を除いたナノサイズ粒子の総重量に対して有する。

【0067】

本発明の他の好ましい実施態様において、検出可能な化合物は、ナノサイズ粒子中に含まれる脂質の総重量に対して少なくとも10%の重量パーセント、例えば、少なくとも10%、例えば、少なくとも20%、例えば、少なくとも30%、例えば、少なくとも40%、例えば、少なくとも50%、例えば、少なくとも60%、例えば、少なくとも70%、例えば、少なくとも80%、例えば、少なくとも90%、例えば、少なくとも95%、例えば、少なくとも99%、例えば、90%～100%、例えば、95%～99%の重量パーセントをナノサイズ粒子中に含まれる脂質の総重量に対して有する。

【0068】

ナノサイズ粒子又はナノサイズ粒子内に含まれる造影剤のサイズは、クライオ透過型電子顕微鏡又は動的光散乱などの本分野における慣用方法により測定されうる。

【0069】

本発明のナノサイズ粒子内に含まれる造影剤は、ナノスケールの固体形態であってよい。本発明の一実施態様において、かかるナノスケールの固体形態は、2～148nmの範囲、例えば、2～5nm、例えば、5～80nm、例えば、5～50nm、例えば、5～20nm、例えば、5～15nm、例えば、5～10nmの直径、又は、例えば、10～15nm、又は、例えば、15～20nm、又は、例えば、20～30nm、又は、例えば、30～40nm、又は、例えば、40～50nm、又は、例えば、50～60nm、

10

20

30

40

50

又は、例えば、60～70 nm、又は、例えば、70～80 nm、又は、例えば、80～90 nm、又は、例えば、90～100 nm、又は、例えば、100～110 nm、又は、例えば、110～120 nm、又は、例えば、120～130 nm、又は、例えば、130～140 nm、又は、例えば、140～150 nmの個数平均径 (number average diameter) を有する。

【0070】

本発明のナノサイズ粒子は、数種の異なるイメージングモダリティにより検出可能な一種以上の化合物を含んでよい。かかる化合物は、コンピュータ断層撮影 (CT) イメージング、磁気共鳴イメージング (MRI)、ポジトロン放出断層撮影 (PET) イメージング、単光子放出コンピュータ断層撮影 (SPECT) イメージング又は核シンチグラフィ イメージング、近赤外蛍光イメージング、超音波検査又は蛍光イメージングの使用による検出のための化合物を含む。

【0071】

本発明の一実施態様において、ナノサイズ粒子はさらに、磁気共鳴イメージング (MRI)、ポジトロン放出断層撮影 (PET) イメージング、単光子放出コンピュータ断層撮影 (SPECT) イメージング、核シンチグラフィ イメージングなどの一種以上のイメージングモダリティのための一種以上の放射性、常磁性又は強磁性化合物を含む。上記化合物は、以下の：銅 (^{61}Cu , ^{64}Cu 及び ^{67}Cu)、インジウム (^{111}In)、テクネチウム ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)、レニウム (^{186}Re , ^{188}Re)、ガリウム (^{67}Ga , ^{68}Ga)、ストロンチウム (^{89}Sr)、サマリウム (^{153}Sm)、イッテルビウム (^{169}Yb)、タリウム (^{201}Tl)、アスタチン (^{211}At)、ルテチウム (^{177}Lu)、アクチニウム (^{225}Ac)、イットリウム (^{90}Y)、アンチモニー (^{119}Sb)、スズ (^{117}Sn , ^{113}Sn)、ジスプロシウム (^{159}Dy)、コバルト (^{56}Co)、鉄 (^{59}Fe)、ルテニウム (^{97}Ru , ^{103}Ru)、パラジウム (^{103}Pd)、カドミウム (^{115}Cd)、テルリウム (^{118}Te , ^{123}Te)、バリウム (^{131}Ba , ^{140}Ba)、ガドリニウム (^{149}Gd , ^{151}Gd)、テルビウム (^{160}Tb)、金 (^{198}Au , ^{199}Au)、ランタン (^{140}La) 及びラジウム (^{223}Ra , ^{224}Ra) の同位体を含んでよく、ここで、上記金属放射性核種の同位体は、該金属に関する既存の酸化状態のいずれで現れてもよい。これらの酸化状態は、一価陽イオン、二価陽イオン、三価陽イオン、四価陽イオン、五価陽イオン、六価陽イオン、及び七価陽イオンを含む。

【0072】

上記常磁性又は強磁性化合物も、以下の：スカンジウム (Sc)、イットリウム (Y)、ランタン (La)、チタニウム (Ti)、ジルコニウム (Zr)、ハフニウム (Hf)、バナジウム (V)、ニオブium (Nb)、タンタラム (Ta)、クロミウム (Cr)、モリブデン (Mo)、タングステン (W)、マンガン (Mn)、テクネチウム (Tc)、レニウム (Re)、鉄 (Fe)、ルテニウム (Ru)、オスミウム (Os)、コバルト (Co)、ロジウム (Rh)、イリジウム (Ir)、ニッケル (Ni)、パラジウム (Pd)、プラチナ (Pt)、銅 (Cu)、銀 (Ag)、金 (Au)、亜鉛 (Zn)、カドミウム (Cd)、水銀 (Hg)、ランタノイド、例えば、ランタン (La)、セリウム (Ce)、プラセオジミウム (Pr)、ネオジミウム (Nd)、プロメシウム (Pm)、サマリウム (Sm)、ユーロピウム (Eu)、ガドリニウム (Gd)、テルビウム (Tb)、ジスプロシウム (Dy)、ホルミウム (Ho)、エルビウム (Er)、ツリウム (Tm)、イッテルビウム (Yb)、ルテチウム (Lu)、及びアクチニド、例えば、アクチニウム (Ac)、トリウム (Th)、プロトアクチニウム (Pa)、ウラニウム (U)、ネプツニウム (Np)、プルトニウム (Pu)、アメリシウム (Am)、キュリウム (Cm)、バークリウム (Bk)、カリホルニウム (Cf)、アインスタイニウム (Es)、フェルミウム (Fm)、メンデルビウム (Md)、ノベリウム (No)、及びローレンシウム (Lr) の群から選ばれてよく、ここで、上記常磁性又は強磁性化合物は、上記金属に関する既存の酸化状態のいずれで現れてもよい。これらの酸化状態は、一価陽イオン、二価陽イオン、三価陽イオン、四価陽イオン、五価陽イオン、六価陽イオン、及び七価陽イオン

を含む。

【0073】

上記一種以上の放射性、常磁性又は強磁性化合物は、ナノサイズ粒子と共有結合又は非共有結合しうる。

【0074】

本発明の一実施態様において、ナノサイズ粒子はさらに、近赤外蛍光イメージングのための一種以上のフルオロフォア化合物を含む。該化合物は、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750、Cy7、Cy5.5、IRDye 800CW、IRDye 680LT、Qdot 800ナノクリスタル、Qdot 705ナノクリスタル又はポルフィラジン化合物を含んでよい。

10

【0075】

ナノサイズ粒子のさらなる成分

本発明のナノサイズ粒子は、リポソーム、ポリマーソーム、デンドリマー、水溶性架橋ポリマー、ハイドロゲル、ミセル及び被覆金属粒子又は被覆固体塩を含む。

【0076】

したがって、本治療方法によれば、ナノサイズ粒子は、様々な成分から成ることができる。かかるナノサイズ粒子は、本分野で知られていてもいなくてもよい。治療方法に有用なナノサイズ粒子のタイプの例として、例えば、PEG被覆と一緒に合成された金ナノサイズ粒子又はPCT国際特許出願公開第WO2007129791号及びKim et al. 2007に記載のペグ化金ナノロッド、Rabin 2006に記載のポリマー被覆ビスマススルフィドナノサイズ粒子、Chuet al. 2006に記載のリン酸カルシウムリポソームコアシェルナノ複合体、Haba et al. 2007及びKojima et al. 2010に記載のCTイメージングのための金ナノサイズ粒子を封入したPAMAMデンドリマー及び本分野で知られたCT造影剤を含む他のナノサイズ粒子がある。

20

【0077】

本発明のナノサイズ粒子は、造影マーカーを標的組織に位置付けるのに十分に長い時間、循環中に留まり、それは、ヒトにおいて、投与量の0.001%超、例えば、0.01%、0.05%、0.1%、0.3%、0.5%、1%、1.5%、2%、3%、5%又は10%が標的組織に到達することを意味する。望ましくない増殖組織へのこの直接的なマーカーの局在化は、治療のための正確な標的組織の決定を可能とする。さらに、本発明によれば、造影剤は長時間検出可能であり、これは、複数回投与の必要性和毒性リスクを低減させる。

30

【0078】

ナノサイズ粒子製剤の循環特性は、ヒト又は動物、例えば、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、サル又はブタ（ヒトにおいて決定されることが好ましい）における半減期（ $T_{1/2}$ ）としても表されることができ、これは、循環中のナノサイズ粒子の半分が血漿から除去されるのに必要な時間である。この値は、（分配効果を考慮する）「真の」値及び「みかけの」排出半減期として計算されることができる。本明細書で意味する半減期は、「真の」値である。

40

【0079】

半減期は、少なくとも1時間、例えば、少なくとも2～4時間、好ましくは、少なくとも4～6時間、例えば、少なくとも6時間、例えば、少なくとも8時間、例えば、少なくとも10時間、例えば、少なくとも12時間、例えば、少なくとも14時間、例えば、少なくとも24時間、例えば、少なくとも48時間、そして、例えば、少なくとも72時間であることができる。さらに、又はその代わりに、半減期は、1～72時間、12～36時間、1～24時間、10～24時間、5～15時間、24～36時間、24～72時間、36～96時間、48～96時間、48～120時間、72～120時間又は72～168時間であることができる。

【0080】

50

本発明は、さらに以下の：

(i) 脂質単層及び／又は一つ以上の脂質二重層などの脂質層を含む、シェル又は表面被覆、

(ii) 以下の：金 (Au)、ビスマス (Bi)、カルシウム (Ca)、バリウム (Ba) 及び鉄 (Fe) の群から選ばれる、コンピュータ断層撮影 (CT) イメージングのための造影剤を含むコア、

を含む、画像記録における使用のための他のタイプのナノサイズ粒子に関し、ここで、上記造影剤は、固体形態であり、本明細書に記載の検出可能な化合物群から選ばれる。

【0081】

本発明によれば、リポソーム、脂質単層又は一つ以上の脂質二重層は、本発明のナノサイズ粒子のシェル又は表面被覆としての役割を果たす。

10

【0082】

リポソームは通常、一つ以上の二重層の膜によって外部環境から分離された内部コアから成るナノスケールの小胞として特徴付けられる。二重層膜又は小胞は、両親媒性分子、例えば、疎水性及び親水性ドメインを含む合成又は天然の脂質、によって形成可能である。二重層膜は、粒子（例えば、ポリマーソーム）を構成する両親媒性ポリマーによっても形成可能である。

【0083】

リポソームは、有用な特性を有するか又は有用な活性を提供することのできる、非限定的な化合物、金属、塩又は放射核種などの実体のキャリアーとしての役割を果たすことができる。この目的のために、リポソームは、所望の実体をリポソームに取り込まれた形態で含むように調製される。リポソームに取り込まれた実体は、リポソーム膜の外部表面と結合するか、リポソームの内部コア中又はリポソームの二重層内に位置することができる。リポソーム中への金属の取り込み方法は、例えば、リポソーム調製後の表面ラベリング、あらかじめ形成されたリポソームの脂質二重層中へのラベル取り込み、調製中に脂質キレーターコンジュゲートを取り込ませることによる、あらかじめ形成されたリポソームの表面ラベリング、及びあらかじめ形成されたリポソームへの水相負荷、金属とともに沈殿を形成する塩の取り込みなどである。水相によるリポソーム中への実体の取り込みも、実体の「カプセル化」又は「封入」と呼ばれる。

20

【0084】

理想的には、かかるリポソーム組成物は、化合物、金属又は放射核種などの所望の実体を、(i) 高い負荷効率で、すなわち、カプセル化プロセスで使用される実体の総量に対するカプセル化された実体のパーセンテージが高いこと、及び(ii) 安定な形態で、すなわち、貯蔵にあたって、又は一般にリポソームに封入された実体とその目的の活性を適用することが期待される部位若しくは環境にリポソームが到達する前に、封入された実体の放出（すなわち、漏出）が最小限であること、含むように調製されることができる。

30

【0085】

ナノサイズ粒子の単層表面被覆は、被覆材料と粒子表面の間の高親和性相互作用、例えば、疎水性相互作用、を有する脂質により、又は共有結合を介して、例えば、脂質チオールの使用により、理想的に達成される。単層被覆は、例えば、チオール脂質コンジュゲーションとその後のリン脂質などの脂質による単層被覆の工程において達成可能である。

40

【0086】

ナノサイズ粒子の二重層表面被覆又は複数の二重層による表面被覆は、被覆材料と粒子表面の間の高親和性相互作用、例えば、疎水性相互作用、静電性相互作用、により又はエントロピー源の疎水性作用により、理想的に達成される。

【0087】

小胞を形成する成分は、親水性部分及び疎水性部分を含む合成又は天然の両親媒性化合物である。小胞を形成する成分は、本発明の目的のための表面被覆用脂質として使用可能であり、例えば、脂肪酸、中性脂肪、ホスファチド、糖脂質、セラミド、スフィンゴリピド、脂肪族アルコール及びステロイドを含む。

50

【0088】

本発明又は本発明の方法において有用な、好適な小胞形成脂質又は表面被覆脂質は、以下の：ホスファチジルコリン、例えば、1，2-ジオレオイル-ホスファチジルコリン、1，2-ジパルミトイル-ホスファチジルコリン、1，2-ジミリストイル-ホスファチジルコリン、1，2-ジステアロイル-ホスファチジルコリン、1-オレオイル-2-パルミトイル-ホスファチジルコリン、1-オレオイル-2-ステアロイル-ホスファチジルコリン、1-パルミトイル-2-オレオイル-ホスファチジルコリン及び1-ステアロイル-2-オレオイル-ホスファチジルコリン；ホスファチジルエタノールアミン、例えば、1，2-ジオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン、1，2-ジパルミトイル-ホスファチジルエタノールアミン、1，2-ジミリストイル-ホスファチジルエタノールアミン、1，2-ジステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン、1-オレオイル-2-パルミトイル-ホスファチジルエタノールアミン、1-オレオイル-2-ステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン、1-パルミトイル-2-オレオイル-ホスファチジルエタノールアミン、1-ステアロイル-2-オレオイル-ホスファチジルエタノールアミン、及びN-スクシニル-ジオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン；ホスファチジルセリン、例えば、1，2-ジオレオイル-ホスファチジルセリン、1，2-ジパルミトイル-ホスファチジルセリン、1，2-ジミリストイル-ホスファチジルセリン、1，2-ジステアロイル-ホスファチジルセリン、1-オレオイル-2-パルミトイル-ホスファチジルセリン、1-オレオイル-2-ステアロイル-ホスファチジルセリン、1-パルミトイル-2-オレオイル-ホスファチジルセリン、及び1-ステアロイル-2-オレオイル-ホスファチジルセリン；ホスファチジルグリセロール、例えば、1，2-ジオレオイル-ホスファチジルグリセロール、1，2-ジパルミトイル-ホスファチジルグリセロール、1，2-ジミリストイル-ホスファチジルグリセロール、1，2-ジステアロイル-ホスファチジルグリセロール、1-オレオイル-2-パルミトイル-ホスファチジルグリセロール、1-オレオイル-2-ステアロイル-ホスファチジルグリセロール、1-パルミトイル-2-オレオイル-ホスファチジルグリセロール、及び1-ステアロイル-2-オレオイル-ホスファチジルグリセロール；ペグ化脂質；ペグ化リン脂質、例えば、ホスファチジルエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-1000]、ホスファチジルエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000]、ホスファチジルエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-3000]、ホスファチジルエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-5000]；ペグ化セラミド、例えば、N-オクタノイル-スフィンゴシン-1-{スクシニル[メトキシ(ポリエチレングリコール)1000]}、N-オクタノイル-スフィンゴシン-1-{スクシニル[メトキシ(ポリエチレングリコール)2000]}、N-オクタノイル-スフィンゴシン-1-{スクシニル[メトキシ(ポリエチレングリコール)3000]}、N-オクタノイル-スフィンゴシン-1-{スクシニル[メトキシ(ポリエチレングリコール)5000]}；リゾ-ホスファチジルコリン、リゾ-ホスファチジルエタノールアミン、リゾ-ホスファチジルグリセロール、リゾ-ホスファチジルセリン、セラミド；スフィンゴリピド；糖脂質、例えば、ガングリオシドGMI；グルコリピド；スルファチド；ホスファチジン酸、例えば、ジ-パルミトイル-グリセロホスファチジン酸；パルミチン酸；ステアリン酸；アラキドン酸；ラウリン酸；ミリスチン酸；ラウロレイン酸；フィセチリン酸(physeteric fatty acid)；ミリストレイン酸；パルミトレイン酸；ペトロセリン酸；オレイン酸；イソラウリン酸；イソミリスチン酸；イソステアリン酸；ステロール及びステロール誘導体、例えば、コレステロール、コレステロールヘミスクシナート(cholesterol hemisuccinate)、コレステロールスルファート及びコレステリル-(4-トリメチルアンモニオ)-ブタノアート(cholesteryl-(4-trimethylammonio)-butanoate)、エルゴステロール、ラノステロール；ポリオキシエチレン脂肪酸エステル及びポリオキシエチレン脂肪酸アルコール；ポリオキシエチレン脂肪酸アルコールエーテル；ポリオキシエチル化ソルビタン脂肪酸エステル

、グリセロールポリエチレングリコールオキシーステアレート；グリセロールポリエチレングリコールリシノリエート；エトキシシ化ソイビーンステロール；エトキシシ化カストールオイル；ポリオキシエチレンポリオキシプロピレン脂肪酸ポリマー；ポリオキシエチレン脂肪酸ステアレート；ジオレオイル-s n-グリセロール；ジパルミトイルスクシニルグリセロール；1, 3-ジパルミトイル-2-スクシニルグリセロール；1-アルキル-2-アシル-ホスファチジルコリン、例えば、1-ヘキサデシル-2-パルミトイル-ホスファチジルコリン；1-アルキル-2-アシル-ホスファチジルエタノールアミン、例えば、1-ヘキサデシル-2-パルミトイル-ホスファチジルエタノールアミン；1-アルキル-2-アシル-ホスファチジルセリン、例えば、1-ヘキサデシル-2-パルミトイル-ホスファチジルセリン；1-アルキル-2-アシル-ホスファチジルグリセロール、例えば、1-ヘキサデシル-2-パルミトイル-ホスファチジルグリセロール；1-アルキル-2-アルキル-ホスファチジルコリン、例えば、1-ヘキサデシル-2-ヘキサデシル-ホスファチジルコリン；1-アルキル-2-アルキル-ホスファチジルエタノールアミン、例えば、1-ヘキサデシル-2-ヘキサデシル-ホスファチジルエタノールアミン；1-アルキル-2-アルキルホスファチジルセリン、例えば、1-ヘキサデシル-2-ヘキサデシル-ホスファチジルセリン；1-アルキル-2-アルキル-ホスファチジルグリセロール、例えば、1-ヘキサデシル-2-ヘキサデシル-ホスファチジルグリセロール；N-スクシニル-ジオクタデシルアミン；パルミトイルホモシステイン；ラウリルトリメチル-アンモニウムブロミド；セチルトリメチル-アンモニウムブロミド；ミリスチルトリメチルアンモニウムブロミド；N-[1, 2, 3-ジオレオイルオキシ)-プロピル]-N, N, Nトリメチルアンモニウムクロライド (DOTMA)；1, 2-ジオレオイルオキシ-3 (トリメチル-アンモニウム) プロパン (DOTAP)；及び1, 2-ジオレオイル-c-(4'-トリメチル-アンモニウム)-ブタノイル-s n-グリセロール (DOTB)；ヘシルチオール (he cyl thiol)；オクチルチオール；デシルチオール；ドデシルチオール；テトラデシルチオール；ヘキサデシルチオール；及びオクタデシルチオールを含むが、これらに限定されない。

【0089】

本発明の他の実施態様において、ナノサイズ粒子のシェルは、以下の：1, 2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン (DSPC)、コレステロール及び1, 2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ (ポリエチレングリコール)-2000] (DSPE-PEG-2000) から成る群から選ばれる両親媒性化合物を55：40：5のモル比で含む。

【0090】

本発明の他の実施態様において、ナノサイズ粒子のシェルは、以下の：1, 2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン (DSPC) “A”、コレステロール “B” 及び1, 2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ (ポリエチレングリコール)-2000] (DSPE-PEG-2000) “C” から成る群から選ばれる両親媒性化合物を、A：B：Cのモル比で含み、ここで、Aは、45～65の範囲から選ばれ、Bは、35～45の範囲から選ばれ、そして、Cは、2～12の範囲から選ばれ、さらにここで、A+B+C=100である。

【0091】

本発明の一つの好ましい実施態様において、ナノサイズ粒子のシェルは、DSPC (1, 2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン)、CHOL (コレステロール)、DSPE-PEG-2000 (1, 2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ (ポリエチレングリコール)-2000]) を、50：40：10のモル比で含む。

【0092】

本発明の他の実施態様において、ナノサイズ粒子のシェルは、以下の：1, 2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン (DSPC) “A”、コレステロール “B”、及び (1, 2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N

ー [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 2000]) (DSPE-PEG-2000) “C” 及び 1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ (ポリエチレングリコール) - 2000] -TATE (DSPE-PEG-2000-RGD) “D” から成る群から選ばれる両親媒性化合物を、A : B : C : D のモル比で含み、ここで、A は、45 ~ 65 の範囲から選ばれ、B は、35 ~ 45 の範囲から選ばれ、C は、5 ~ 13 の範囲から選ばれ、D は、0 ~ 3 の範囲から選ばれ、さらにここで、 $A + B + C + D = 100$ である。

【0093】

本発明の他の実施態様において、ナノサイズ粒子のシェルは、DSPC (1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン)、CHOL (コレステロール)、DSPE-PEG-2000 (1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ (ポリエチレングリコール) - 2000]) 及び (1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ (ポリエチレングリコール) - 2000] -TATE (DSPE-PEG-2000-RGD)) を、50 : 40 : 9 : 1 のモル比で含む。

【0094】

本発明のナノサイズ粒子は、複合化 (conjugated) ポリエチレングリコール (PEG) 成分若しくはその誘導体又はポリサッカライドなどの親水性ポリマーを含んでよい。

【0095】

一実施態様において、ナノサイズ粒子の少なくとも 1 つの成分は、タンパク質又は他の受容体親和性分子の、ポリマーにより誘導体化された小胞形成成分へのコンジュゲーションを可能とする。

【0096】

他の実施態様において、PEG のようなポリマー、GM1 及び GM3 のようなオリゴサッカライド又は他の親水性ポリマーの、本発明の組成物のナノ粒子へのコンジュゲーションは、血流内での延長された循環時間を可能とする。その表面上に複合化 PEG 鎖を含むナノサイズ粒子は、出血性の血管を溢血させる。

【0097】

本発明の他の実施態様において、ポリマー表面被覆は、ポリマー被覆とナノサイズ粒子表面の間の高親和性相互作用、例えば、疎水性相互作用、静電性相互作用又はエントロピー源の疎水性作用、によってナノサイズ粒子表面に非共有結合する。この被覆は、ポリマー単層又は複数のポリマー層に基づき、交互積層法を用いて設置可能である。ポリマーは、単一ポリマー又はジブロックコポリマー若しくはトリブロックコポリマー若しくはその混合物などのブロックコポリマーであってよい。該ポリマーブロックの一つは、典型的に、ポリエチレングリコール (PEG)、典型的には、分子量 2000 ~ 70000 ダルトンの PEG、又は典型的に分子量 2000 ~ 10000000 ダルトンのデキストラン、又は典型的に分子量 2000 ~ 10000000 ダルトンのヒアルロン酸から選ばれる。ポリマーは、典型的に、ポリマー構造全体が陰性荷電したブロックコポリマーとして結合され、陽性荷電したナノサイズ粒子表面との静電的相互作用を可能として効率的な被覆を達成する。

【0098】

本発明の好ましい実施態様において、ナノサイズ粒子は、PEG のコンジュゲーション、例えば、複合化 PEG 1000、PEG 2000、PEG 3000、PEG 5000 又は PEG 10000、すなわち、それぞれ約 1000、2000、3000、5000、又は 10000 ダルトンの平均分子量を有する PEG 調製物、を含む。

【0099】

形状及びサイズ

本発明のナノサイズ粒子は、準球形、球形又はロッド形状のような非球形であることができる。

【0100】

本発明のナノサイズ粒子は、粒子の、最適化された循環及び血管新生領域、望ましくない細胞増殖領域又は炎症部位における蓄積を可能とするサイズを有する。そのサイズは、本発明によれば、クライオ透過型電子顕微鏡又は動的光散乱などの本分野における慣用方法を用いて、直径、長さ又は幅に関して測定されうる。

【0101】

したがって、本発明のナノサイズ粒子は、2～500 nm、例えば、2～10 nm、又は例えば、10～100 nm、例えば、10～80 nm、例えば、10～50 nm、例えば、10～20 nm、例えば、10～15 nm、又は例えば、15～20 nm、又は例えば、20～50 nm、又は例えば、50～80 nm、又は例えば、80～110 nm、又は例えば、110～140 nm、又は例えば、140～170 nm、又は例えば、170～200 nm、又は例えば、200～220 nm、又は例えば、220～250 nm、又は例えば、250～280 nm、又は例えば、280～310 nm、又は例えば、310～340 nm、又は例えば、340～370 nm、又は例えば、370～400 nm、又は例えば、400～420 nm、又は例えば、420～450 nm、又は例えば、450～480 nm、又は例えば、480～500 nmのサイズである。該サイズは、本発明によれば、個数平均の直径、長さ又は幅を含む、直径、長さ又は幅に関して測定されることができる。

10

【0102】

好ましい実施態様において、本発明の組成物中のナノサイズ粒子は、10 nm～150 nm、例えば、10～100 nm、例えば、10～80 nm、例えば、10～50 nm、例えば、10 nm～30 nm、例えば、10～20 nm、又は例えば、30 nm～40 nm、又は例えば、40 nm～50 nm、又は例えば、50 nm～60 nm、又は例えば、60 nm～70 nm、又は例えば、70 nm～80 nm、又は例えば、90 nm～100 nm、又は例えば、100 nm～110 nm、又は例えば、110 nm～120 nm、又は例えば、120 nm～130 nm、又は例えば、130 nm～140 nm、又は例えば、140 nm～150 nmの範囲内の個数平均径を有する。

20

【0103】

本発明のナノサイズ粒子中に含まれる造影剤は、ナノスケールの固体形態であることができる。本発明の一実施態様において、かかるナノスケールの固体形態は、2～148 nm、例えば、2～5 nm、例えば、5～10 nm、例えば、5～80 nm、例えば、5～50 nm、例えば、5～20 nm、例えば、5～15 nm、例えば、10～15 nm、例えば、15～20 nm、又は例えば、20～30 nm、又は例えば、30～40 nm、又は例えば、40～50 nm、又は例えば、50～60 nm、又は例えば、60～70 nm、又は例えば、70～80 nm、又は例えば、80～90 nm、又は例えば、90～100 nm、又は例えば、又は100～110 nm、又は例えば、又は110～120 nm、又は例えば、120～130 nm、又は例えば、130～140 nm、又は例えば、140～150 nmの個数平均径を有する。

30

【0104】

pH

本発明のナノサイズ粒子の内部 pH は、最適の効果を確実にするために、粒子の合成中、又は合成後に、制御されてよい。本発明又は本発明の方法の一実施態様において、ナノサイズ粒子の内部 pH が制御され、こうして所望のプロトン化状態が達成される。したがって、本発明によれば、ナノサイズ粒子の内部 pH は、1～10、例えば、1～2、例えば、2～3、例えば、3～4、例えば、4～5、例えば、5～6、例えば、6～7、例えば、7～8、例えば、8～9、例えば、9～10の範囲内にある。

40

【0105】

イメージング

標的組織の正確な決定に導く、ナノ粒子及び標的組織のイメージング方法を提供することが本発明の目的である。

50

【0106】

本発明によれば、標的組織の決定は、三次元又はマルチ次元の座標データセット、例えば、三次元又は四次元、例えば、第四の次元が時間である、四次元座標データセットで表されうる。

【0107】

本発明の方法及びナノサイズ粒子は、健康な組織に対する標的組織又は望ましくない増殖細胞のより正確な決定に導く、高品質のイメージング結果を可能とすることによって、健康な組織から標的組織を区別することを可能とする。

【0108】

本発明のナノサイズ粒子は、多数の異なるイメージングモダリティのために使用されてよい。かかるイメージングモダリティは、コンピュータ断層撮影（C T）イメージング、磁気共鳴イメージング（M R I）、ポジトロン放出断層撮影（P E T）イメージング、単光子放出コンピュータ断層撮影（S P E C T）イメージング、又は核シンチグラフィイメージング、光音響イメージング、超音波検査イメージング、近赤外蛍光イメージング、蛍光イメージング又は光干渉断層撮影法を含む。

10

【0109】

好ましくは、本発明のナノサイズ粒子は、コンピュータ断層撮影（C T）イメージングのために使用される。

【0110】

より好ましい実施態様において、本発明のナノサイズ粒子は、統合された、連続的又は同時のX線イメージング及び放射線治療、例えば、統合された、連続的又は同時のコンピュータ断層撮影（C T）及び放射線治療、のために使用される。

20

【0111】

一実施態様において、X線イメージング及び放射線治療は、同じ照射源からのX線又はガンマ線照射を同時に使用することによって達成される。こうして、放射線治療のために使用されるX線又はガンマ線に基づく照射も、X線画像を生成するために使用可能である。

【0112】

本発明の他の実施態様において、ナノサイズ粒子は、統合された、連続的又は同時の磁気共鳴イメージング（M R I）及び放射線治療、ポジトロン放出断層撮影（P E T）イメージング及び放射線治療、又は単光子放出コンピュータ断層撮影（S P E C T）イメージング及び放射線治療のためであり、したがって、本明細書に記載の上記タイプのイメージングのための検出可能な化合物を含む。

30

【0113】

異なるタイプのイメージングモダリティの組み合わせも、本発明のナノサイズ粒子とともに使用されてよい。本発明のナノサイズ粒子は、2つのイメージングモダリティ、例えば、コンピュータ断層撮影（C T）イメージング及び磁気共鳴イメージング（M R I）、コンピュータ断層撮影（C T）イメージング及びポジトロン放出断層撮影（P E T）イメージング、コンピュータ断層撮影（C T）イメージング及び単光子放出コンピュータ断層撮影（S P E C T）イメージング、コンピュータ断層撮影（C T）イメージング及び核シンチグラフィイメージング、コンピュータ断層撮影（C T）イメージング及び光音響イメージング、コンピュータ断層撮影（C T）イメージング及び近赤外蛍光イメージング、コンピュータ断層撮影（C T）イメージング及び超音波検査イメージング、コンピュータ断層撮影（C T）イメージング及び蛍光イメージング、又はコンピュータ断層撮影（C T）イメージング及び光干渉断層撮影法、と組み合わせて使用されてよい。

40

【0114】

本発明のナノサイズ粒子は、3つのイメージングモダリティ、例えば、コンピュータ断層撮影（C T）イメージング、磁気共鳴イメージング（M R I）及びポジトロン放出断層撮影（P E T）イメージング、又は例えば、コンピュータ断層撮影（C T）イメージング、磁気共鳴イメージング（M R I）及び単光子放出コンピュータ断層撮影（S P E C T）

50

イメージング、又は例えば、コンピュータ断層撮影（ＣＴ）イメージング、磁気共鳴イメージング（ＭＲＩ）及び核シンチグラフィイメージング、又は例えば、コンピュータ断層撮影（ＣＴ）イメージング、磁気共鳴イメージング（ＭＲＩ）及び超音波検査イメージング、又は例えば、コンピュータ断層撮影（ＣＴ）イメージング、磁気共鳴イメージング（ＭＲＩ）及び近赤外蛍光イメージング、又は例えば、コンピュータ断層撮影（ＣＴ）イメージング、磁気共鳴イメージング（ＭＲＩ）及び蛍光イメージング、又は例えば、コンピュータ断層撮影（ＣＴ）イメージング、磁気共鳴イメージング（ＭＲＩ）及び超音波検査イメージング、又は例えば、コンピュータ断層撮影（ＣＴ）イメージング、磁気共鳴イメージング（ＭＲＩ）及び光干渉断層撮影法、又は例えば、コンピュータ断層撮影（ＣＴ）イメージング、ポジトロン放出断層撮影（ＰＥＴ）イメージング及び単光子放出コンピュータ断層撮影（ＳＰＥＣＴ）イメージング、又は例えば、コンピュータ断層撮影（ＣＴ）イメージング、ポジトロン放出断層撮影（ＰＥＴ）イメージング及び核シンチグラフィイメージング、又は例えば、コンピュータ断層撮影（ＣＴ）イメージング、ポジトロン放出断層撮影（ＰＥＴ）イメージング及び光音響イメージング、又は例えば、コンピュータ断層撮影（ＣＴ）イメージング、ポジトロン放出断層撮影（ＰＥＴ）イメージング及び近赤外蛍光イメージング、又は例えば、コンピュータ断層撮影（ＣＴ）イメージング、ポジトロン放出断層撮影（ＰＥＴ）イメージング及び超音波検査イメージング、又は例えば、コンピュータ断層撮影（ＣＴ）イメージング、ポジトロン放出断層撮影（ＰＥＴ）イメージング及び光干渉断層撮影法、又は例えば、コンピュータ断層撮影（ＣＴ）イメージング、単光子放出コンピュータ断層撮影（ＳＰＥＣＴ）イメージング及び核シンチグラフィイメージング、又は例えば、コンピュータ断層撮影（ＣＴ）イメージング、単光子放出コンピュータ断層撮影（ＳＰＥＣＴ）イメージング及び光音響イメージング、又は例えば、コンピュータ断層撮影（ＣＴ）イメージング、単光子放出コンピュータ断層撮影（ＳＰＥＣＴ）イメージング及び近赤外蛍光イメージング、又は例えば、コンピュータ断層撮影（ＣＴ）イメージング、単光子放出コンピュータ断層撮影（ＳＰＥＣＴ）イメージング及び超音波検査イメージング、又は例えば、コンピュータ断層撮影（ＣＴ）イメージング、単光子放出コンピュータ断層撮影（ＳＰＥＣＴ）イメージング及び光干渉断層撮影法、又は例えば、コンピュータ断層撮影（ＣＴ）イメージング、と組み合わせて使用されてよい。

【０１１５】

本発明のナノサイズ粒子は、上記のイメージングモダリティのうちの一種以上、例えば、上記のすべてのイメージングモダリティ、と併用されてもよい。

【０１１６】

計画ステップが本発明の治療方法の一部であってよいことが認識される。かかる計画ステップは、照射治療のシミュレーション、標的組織を明確に決定するための上記のイメージングモダリティの一種以上を用いる画像記録及び照射前の装置の調整、標的組織の３Ｄ形状の最適化、照射ビーム強度の制御又は変調を可能とする。かかる計画ステップにおいて、放射線量強度はさらに最適化されて、隣接する正常組織中の照射が低減されるか又は完全に回避される一方、肉眼的腫瘍体積近くでは高められることができる。

【０１１７】

放射線療法による治療

「放射線治療」、「放射線療法」、「放射線療法による治療」及び「照射治療」という用語は、本明細書において交換可能に使用され、望ましくない増殖細胞を制御又は死滅させるために、Ｘ線、ガンマ線、プロトン又はイオンに基づく照射を含む、電離照射が使用される治療を意味する。本発明の放射線治療に基づく処置は、放射線治療のいくつかの技術の使用により送達される。放射線は、線型加速器、円形加速器（シンクロトロン又はサイクロトロンなど）及び／又は当業者に知られた他の粒子加速器又は放射線源などの、放

射線の生成源から提供されてよい。かかる技術はさらに、慣用の体外照射療法（２ＤＸＲＴ）及び定位放射線治療などの、一般的な体外照射療法及び体外照射療法の特別な技術を含む。かかる技術はさらに、以下の：三次元原体照射療法（３ＤＲＴ）、四次元（４Ｄ）原体照射療法（ＣＲＴ）及び強度変調放射線治療（ＩＭＲＴ）などの画像誘導放射線治療（ＩＧＲＴ）を含む。

【０１１８】

本発明によれば、必要とされる放射線量、分割回数、送達される放射線の形状、及び放射線治療の頻度は、本分野における慣用方法によって決定される。

【０１１９】

現在の標準的な照射治療の間、可能な限り確実に癌細胞を死滅させつつ、健康な細胞を合理的に保護するために、標的組織の周囲に安全マージンが付加される。現在の標準による安全マージンは、典型的に、２０ｍｍ未満、例えば、約１５ｍｍ以下、約１０ｍｍ以下、又は約５ｍｍ以下である。マージンは、非限定的に、画像、器官の動き、描写における手動の不正確性、経験及び訓練などのすべての不確実性の説明となる。本発明の目的は、すべての癌細胞が死滅させられることを確実にしつつ正常組織を保護するために、マージンをできるだけ少なくすることである。

【０１２０】

標的組織の領域がより正確に決定されることを可能とする、方法及びナノサイズ粒子を提供することは、本発明の目的であり、ここで、健康な組織を保護するために、健康な組織のマージンが低減される。本発明の一実施態様において、現在の標準に比べてマージンは少なくとも０．２５ｍｍ、例えば、少なくとも０．５０ｍｍ、例えば、少なくとも１ｍｍ、例えば、少なくとも２ｍｍ、例えば、少なくとも３ｍｍ、例えば、少なくとも４ｍｍ、例えば、少なくとも５ｍｍ、例えば、少なくとも８ｍｍ、例えば、少なくとも１０ｍｍ、例えば、２０ｍｍ以上、低減されることができる。他の実施態様において、マージンは、２０ｍｍ未満、例えば、１０ｍｍ未満、例えば、８ｍｍ未満、例えば、５ｍｍ未満、例えば、４ｍｍ未満、例えば、３ｍｍ未満、例えば、２ｍｍ未満、例えば、１ｍｍ未満、例えば、０．５０ｍｍ未満、例えば、０．２５ｍｍ未満まで低減されることができる。

【０１２１】

本発明によれば、画像記録及び放射線治療の実行が統合され、連続的又は同時に実施されることができる。

【０１２２】

本発明の方法及びナノサイズ粒子は、統合された画像記録と放射線治療を可能とし、ここで、イメージングは、放射線を標的組織に方向付けるために使用される。本発明によれば、放射線の位置及び形状は、標的組織のイメージングに続いて調整されることができる。いくつかのイメージングステップが標的組織の決定のために使用される場合、標的組織の食い違いを補正するために、本発明による放射線ビームは本発明による放射線ビームは、各イメージングステップに続いて調整されることができる。イメージングと照射ステップの時間間隔は、１マイクロ秒～５秒などの短時間の遅延であってよい。

【０１２３】

本発明の他の実施態様において、イメージングステップは、同時に行われてよい。他の実施態様において、イメージングステップは、その後の放射線治療の少なくとも１秒、例えば、少なくとも５秒、例えば、５秒～３０日前に行われる。

【０１２４】

いくつかの場合、標的組織は、各照射ステップの前にいくつかの画像記録を使用することによって決定される必要がある。他の場合には、照射に有用な標的組織の決定のために１回の画像記録で十分である。したがって、本発明によれば、イメージングステップと放射線治療の連鎖が、健康な組織を保護しつつ標的組織の効率的な治療を可能とするやり方で調整されることができる。かかる連鎖は、イメージングと放射線治療の異なる順序と反復を可能とする。

【０１２５】

本発明の一実施態様において、標的組織のイメージングは、放射線治療と同時に実施されてよい。かかる同時のイメージングと放射線治療は、イメージングのための治療的照射の利用によって実施されることができる。

【0126】

健康な組織に対する標的組織のより正確な決定は、標的組織のより集中的な照射と、それによるより少ない治療分割分 (fractions of treatment) を可能とする。本発明の一実施態様において、放射線治療は少分割され、より少ない分割分 (fractions) にわたって大用量で投与される。

【0127】

放射線治療は、数日の期間にわたって分散されうる、数個の線量又は分割分で実施されることができる。かかる治療の間、ナノサイズ粒子の投与は、望ましくない増殖細胞のイメージングを可能とするために、1回以上行われてよい。本発明の放射線治療は、1～100分割分、例えば、1～5分割分、又は例えば、5～10分割分、又は例えば、10～20分割分、又は例えば、20～30分割分、又は例えば、30～40分割分、又は例えば、40～50分割分、又は例えば、50～60分割分、又は例えば、60～70分割分、又は例えば、70～80分割分、又は例えば、80～90分割分、又は例えば、90～100分割分で送達されてよい。

【0128】

本発明によれば、放射線治療の1つ以上の分割分は、さらに1～100日、例えば、1～10日、又は例えば、10～20日、又は例えば、20～30日、又は例えば、30～40日、又は例えば、50～60日、又は例えば、60～70日、又は例えば、70～80日、又は例えば、90～100日の期間にわたって送達される。

【0129】

本発明のさらなる目的は、標的組織を決定するための統合されたコンピュータ断層撮影 (CT) イメージング装置、統合された体外照射装置及び上記装置のデータを処理するための統合されたコンピュータを含む、本明細書に記載の方法において使用されるシステムを提供することであり、ここで、該システムは、コンピュータ断層撮影 (CT) イメージング装置により得られた決定に基づいて、体外照射療法を方向付けることができる。

【0130】

細胞の望ましくない増殖を伴う疾患

本発明の方法及びナノ粒子は、細胞の望ましくない増殖を伴う疾患又は状態の治療に関する。

【0131】

本明細書中で使用される用語「治療すること」、「治療」及び「治療法」は、等しく、治癒的治療法、予防的又は予防のための治療法及び改善的又は緩和的治療法を意味する。この用語は、臨床的に確立されることのできる有益な又は所望の生理学的結果を得るためのアプローチを含む。本発明の目的の場合、有益な又は所望の臨床的結果は、検出可能であるか又は検出不可能であるかにかかわらず、以下の：症状の緩和、疾患の範囲の消失、安定化した（すなわち、悪化していない）状態、状態／症状の進行又は悪化が遅れること又は遅くなること、状態又は症状の改善又は緩和、及び（部分的又は全体的な）寛解を含むが、これらに限定されない。本明細書中で使用される用語「緩和」及びその変形は、本発明の組成物を投与しない場合に比べて、生理学的状態又は症状の範囲及び／又は望ましくない兆候が低減され及び／又は進行の時間的経過が遅くさせられるか又は引き伸ばされることを意味する。

【0132】

用語「望ましくない増殖」は、新生物（すなわち、腫瘍）をもたらしうる組織中の細胞の腫瘍性の増殖であって、しばしば増加した血管新生を特徴とするものを含む。用語「望ましくない」によって、良性、潜在的に悪性又は悪性でありうる細胞の増殖が意味される。悪性の細胞増殖は、有害で、害を及ぼし、害を与え、悪影響を及ぼし、及び／又は個体に対する致死的结果を有しうる。

【0133】

癌は、細胞の望ましくない増殖を特徴とし、本発明は、悪性の新生物を伴う癌性疾患のモニタリング及び治療に関し、上記悪性の新生物は、例えば、唇、口又は喉の悪性新生物、例えば、舌、舌根、歯茎、口腔底、口蓋、耳下腺、大唾液腺、扁桃腺、中咽頭、鼻咽頭、梨状陥凹、下咽頭、又は唇、口若しくは喉の他の部分の悪性新生物、或いは、消化器官の悪性新生物、例えば、食道、胃、小腸、結腸、直腸S字結腸移行部、直腸、肛門、及び肛門管、肝臓及び肝内胆管、胆嚢、胆管の他の部分、すい臓及び脾臓の悪性新生物、呼吸器官及び胸郭内器官の悪性新生物、例えば、鼻腔及び中耳、副鼻腔、咽頭、気管、気管支及び肺、胸腺、心臓、隔膜及び胸膜の悪性新生物、骨及び軟骨の悪性新生物、例えば、肋骨の骨及び関節軟骨、骨並びに軟骨の悪性新生物、皮膚、皮脂腺及び汗腺の悪性新生物、中皮組織及び柔組織の悪性新生物、例えば、中皮腫、カポシ肉腫の悪性新生物、末梢神経および自律神経系の悪性新生物、後腹膜腔及び腹膜腔の悪性新生物、結合組織及び柔組織の悪性新生物、例えば、血管、滑液嚢、軟骨、筋膜、脂肪、靱帯、リンパ管、筋肉、滑膜、腱、頭部、顔及び首、腹部、骨盤又は結合組織及び柔組織の重複病変部位の悪性新生物、乳房又は女性生殖器の悪性新生物、例えば、外陰、膺、子宮頸部、子宮体部、子宮、卵巣、卵管、胎盤の悪性新生物、或いは、男性生殖器の悪性新生物、例えば、陰茎、前立腺、睾丸の悪性新生物、尿路の悪性新生物、例えば、腎臓、腎盂、尿管、膀胱、尿道又は他の泌尿器官の悪性新生物、目、脳及び中枢神経系の他の部分の悪性新生物、例えば、目及び付属器、髄膜、脳、脊髄、脳神経及び中枢神経系の他の部分の悪性新生物、甲状腺及び他の内分泌腺の悪性新生物、例えば、甲状腺、副腎、副甲状腺、脳下垂体、頭咽頭管、松果腺、頸動脈小体、大動脈体及び他の傍神経節の悪性新生物、頭部、顔及び首、胸部、腹部及び骨盤の悪性新生物、リンパ管、呼吸器官及び消化器官、腎臓及び腎盤、膀胱及び他の泌尿器官の続発性悪性新生物、皮膚、脳、脳脊髄膜、又は神経系の他の部分、骨及び骨髓、卵巣、副腎の続発性悪性新生物、リンパ組織、造血組織及び関連組織の悪性新生物、例えば、ホジキンリンパ腫、濾胞性非ホジキン病、びまん性非ホジキンリンパ腫、末梢及び皮膚T細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、リンパ肉腫、悪性免疫増殖性疾患、例えば、ワルデンストレームマクログロブリン血症、アルファ鎖病、ガンマ鎖病、免疫増殖性小腸疾患、多発性骨髄腫、悪性形質細胞腫、例えば、形質細胞性白血病、形質細胞腫及び孤立性骨髄腫、リンパ性白血病、例えば、急性リンパ芽球性白血病、骨髄性白血病、単球性白血病、芽細胞性白血病、幹細胞性白血病、及びリンパ組織、造血組織及び関連組織の他の詳細不明の悪性新生物、例えば、レットラーージーベ病、悪性組織球増殖症、悪性マスト細胞腫瘍、組織球性リンパ腫又は他のタイプの悪性新生物である。

10

20

30

【0134】

上皮内癌も、望ましくない細胞増殖を伴う疾患と考えられる。本発明によれば、望ましくない細胞増殖を伴う疾患は、口腔、食道、胃、消化器官、中耳及び呼吸系の上皮内癌、上皮内黒色腫、皮膚の上皮内癌、乳房の上皮内癌、女性又は男性生殖器の上皮内癌、膀胱、泌尿器官又は目、甲状腺及び他の内分泌腺の上皮内癌、或いは他のタイプの上皮内癌であってよい。

【0135】

好ましい実施態様において、本発明は、肺癌、前立腺癌、頸部又は卵巣の癌に伴う望ましくない細胞増殖に関する。

40

【0136】

より好ましい実施態様において、本発明は、肺癌又は前立腺癌に伴う望ましくない細胞増殖に関する。

【0137】

望ましくない細胞増殖を伴う他のタイプの状態又は疾患は、子宮外（異所性）妊娠、脳内の良性腫瘍、例えば、視神経に近い良性腫瘍、ホルモン産生過剰の小腺、例えば、視床下部、神経圧迫に関係する骨及び軟骨、移植前に殺滅されてよい血液細胞、大きな扁桃腺に関連した状態、例えば、急性扁桃腺炎又は咽頭炎、閉塞性睡眠時無呼吸、鼻気道の閉塞、いびき又は扁桃周囲膿瘍又は過形成性若しくは血管新生性の眼疾患を含む。

50

【0138】

個体

本発明による個体は、動物個体である。ヒト個体などの哺乳動物個体は、動物個体の一部であるとみなされる。

【0139】

妊娠した女性個体も、本発明の個体であるとみなされる。

【0140】

循環

本発明によれば、ナノサイズ粒子は、血液、リンパ又は脳脊髄液中の循環を可能とするやり方で投与されてよい。上記ナノサイズ粒子のかかる循環は、血管系又はリンパ系のイメージングを可能としうる。

10

【0141】

本発明の検出可能な化合物は、ナノサイズ粒子内部の実体の保護された位置によって循環時間の増加を可能とする、ナノサイズ粒子中に含まれる。かかる保護は、インビボでの破壊及び迅速な排出を減少させる。循環時間を増加させることによって、ナノサイズ粒子内に含まれる化合物が標的組織に到達することが確実にする。長時間循環するナノサイズ粒子内に封入された検出可能な化合物は、受動的ターゲティングによって対象内の病変部位に送達されることができる。

【0142】

本発明のナノサイズ粒子は、血流中の延長された循環時間を可能とする、外表面に結合した化合物を含んでよい。延長された循環時間は、投与直後の免疫系の攻撃を減少させることによって得ることができ、それによって、ナノサイズ粒子のクリアランスを延期し、その破裂を予防する。ナノ粒子の外表面に結合したこのような化合物は、PEG、GM1及びGM3のようなオリゴサッカライド並びに親水性ポリマーを含む。

20

【0143】

本発明の好ましい実施態様において、ナノサイズ粒子は、PEG並びに／又は脂質層、例えば、脂質単層及び／若しくは一つ以上の脂質二重層、を含む、シェル又は表面被覆を有する。

【0144】

本発明の他の好ましい実施態様において、ナノサイズ粒子は、PEG又はブロックコポリマー、ここで、一方のブロックがPEGであり、他方が粒子コアへの安定な結合／付着を確実にする、を含むシェル又は表面被覆を有する。この実施態様において、PEG分子は例えば、2～70 kDの分子量を有してよい。

30

【0145】

ナノサイズ粒子は、少なくとも1時間、例えば、2～4時間、好ましくは、少なくとも4～6時間、例えば少なくとも6時間、例えば少なくとも8時間、例えば、少なくとも10時間、例えば少なくとも12時間、例えば少なくとも14時間、例えば少なくとも24時間、例えば少なくとも36時間、例えば少なくとも48時間、例えば少なくとも72時間、例えば少なくとも120時間の循環半減期を有することができる。

【0146】

標的組織中での保持

本発明の目的は、望ましくない細胞増殖を特徴とする組織中に受動的ターゲティングデリバリーによって蓄積することができるナノサイズ粒子を提供することである。かかる蓄積は、ナノサイズ粒子の長い循環時間、並びに出血性の脈管及び／又は非効率的なリンパ排液系の領域における蓄積のための最適のサイズによって可能である。

40

【0147】

例示的な標的組織は、腫瘍などの癌性組織；癌細胞を含みうるリンパ節などの正常組織；異所性妊娠などにおける胎児組織；及び炎症性組織を含む。一実施態様において、標的組織は腫瘍のように癌に関連している。

【0148】

50

本発明のナノサイズ粒子の標的組織中での直接的な保持は、標的組織のより正確なイメージングを可能とする。標的組織が治療中に動きうるため、ナノサイズ粒子の標的組織内での直接的な保持は、標的組織の正確な位置の持続的イメージングを可能とする。これは次に、治療される領域のより良好な決定及びさらなる健康な組織の放射線からの保護をもたらす。

【0149】

本発明のさらなる目的は、該粒子の投与後の標的組織の長期のイメージングを可能とする、ナノサイズ粒子を提供することである。したがって、本発明によれば、個体へのナノサイズ粒子の投与は、標的組織のコンピュータ断層撮影（CT）イメージングを、投与後3日以上、例えば、投与後3～300日以上、例えば、3～100日間、例えば、100～200日間、又は例えば、200～300日間、又は例えば、300～400日間、又は例えば、3～200日間、又は例えば、3～300日間、又は例えば、3～400日間、可能とする。

10

【0150】

本発明の好ましい実施態様は、ナノサイズ粒子の投与後、3～120日間、コンピュータ断層撮影（CT）イメージングを可能とする。

【0151】

能動的又はリガンドターゲティングデリバリーシステムは、細胞表面抗原又は受容体を標的とする、表面に結合したリガンドを含むナノサイズ粒子組成物を意味する。造影化合物を含む一つの製剤中で、標的化され、かつ、長期に循環するリボソームの性質を組み合わせることは、腫瘍などの標的部位中の造影化合物の局在化の特異性及び強度を顕著に亢進する。

20

【0152】

ナノサイズ粒子に含まれるターゲティング（標的化）部位は、標的組織又は標的細胞中へのナノサイズ粒子のより高度なデリバリー及び保持を可能とする。これは次に、腫瘍などの標的部位中の検出可能な化合物の局在化の特異性及び強度の亢進をもたらす。したがって、本発明により提供されるナノサイズ粒子は、さらに、サッカライド、オリゴサッカライド、ビタミン、ペプチド、タンパク質、抗体及びアフイボディ（*affibodies*）並びに他の受容体結合リガンドなどの、炎症性組織又は望ましくない増殖細胞を含む組織に対する特異的親和性を有するターゲティング部分を含んでよい。

30

【0153】

本発明による「抗体」は、抗原のエピトープに特異的に結合するタンパク質として定義される。本発明において有用なかかる抗体は、単一特異性、二重特異性、三重特異性又はより大きな多重特異性であってよい。例えば、多重特異性抗体は、正常組織よりも多量で標的部位に存在しうるサイトカイン、細胞又は酵素の異なるエピトープに対して特異的であることができる。抗体という用語は、ナノボディとしても知られる単ドメイン抗体も含むべきである。

【0154】

抗体は、ポリクローナル又はモノクローナルであってよい。本発明において有用なモノクローナル抗体の例は、以下の：リツキシマブ、トラスツズマブ、セツキシマブ、*LymphoCide*、*Vitaxin*、*Lym-1* 及びベバシズマブから成る群から選ばれるが、これらに限定されない。

40

【0155】

好ましい実施態様において、モノクローナル抗体は、以下の：リツキシマブ、トラスツズマブ、セツキシマブ、*LymphoCide*、*Vitaxin*、*Lym-1* 及びベバシズマブから成る群から選ばれる。

【0156】

「アフイボディ」は、多数の標的タンパク質に特異的に結合するように遺伝子組換え可能な、小さく安定な抗原結合分子として定義される。本発明によるアフイボディ分子は、抗-*ErbB2* アフイボディ分子及び抗-フィブリノーゲンアフイボディ分子及び他のア

50

フィボディを含む。

【0157】

本発明において有用なペプチドは、ターゲティング部分として作用して、ナノサイズ粒子が望ましくない増殖をする標的組織に特異的に結合することを可能とし、ここで、該ペプチドは、以下の：RGD、ソマトスタチン及びその類似体、並びに膜透過性ペプチド又は細胞インターナリゼーションを可能とするペプチドから成る群から選ばれるが、これらに限定されない。

【0158】

一実施態様において、ペプチドは、以下の：RGD、ソマトスタチン及びその類似体、並びに膜透過性ペプチドから成る群から選ばれる。

10

【0159】

投与

本発明は、ナノ粒子の循環を可能とする任意の好適な経路による投与を提供する。好ましい経路が治療対象の全身状態および年齢、治療される状態の性質、並びに選ばれたナノ粒子製剤に依存することは認識されるだろう。かかる投与のための適切な剤形は、慣用技術によって調製可能である。

【0160】

本発明のナノ粒子は、局所的に、例えば、標的組織中又は標的組織の隣接組織中へ直接的に投与されてもよい。かかる局所投与は、腫瘍内投与であってよい。

【0161】

本発明のナノ粒子は、腸管外に投与され投与されてよく、すなわち、静脈内、筋肉内、脊髄内、皮下、動脈内、心内、骨内、皮内、嚢内、髄腔内、脳内、経皮、経粘膜、吸入、硬膜外、舌下、硝子体内、鼻腔内、直腸内、腔内又は腹腔内投与により投与されてよい。さらに、腸管外投与は、本発明によれば、輸注又は注射により実施されてよい。

20

【0162】

本発明の好ましい実施態様において、ナノ粒子は輸注又は腸管外投与により投与される。

【0163】

本発明のさらに他の好ましい実施態様において、ナノサイズ粒子は、静脈内、動脈内、髄腔内、皮下、筋肉内又は腹腔内注射により投与される。

30

【0164】

本発明のナノ粒子は、経口、直腸内、鼻腔内、肺内、頬側又は舌下投与などの、本発明のナノ粒子の循環を可能とする任意の好適な経路によって腸内投与されてもよい。

【0165】

さらに、本発明のナノ粒子は、個々の治療対象の鼻、腔、目、口、生殖管、肺、胃腸管又は直腸の中などの粘膜、好ましくは、鼻、口又は直腸の粘膜、に投与されてよい。

【0166】

本発明によれば、ナノ粒子は、吸入、すなわち、鼻腔内及び経口吸入投与によって投与されてもよい。エアロゾル製剤又は定量吸入器などの、かかる投与に適した剤形が慣用技術によって調製可能である。

40

【0167】

本発明の一実施態様において、ナノサイズ粒子は局部投与される。

【0168】

ナノ粒子は、ボーラス、或いは、1分以上、5分以上、10分以上、又は約1時間などの特定の時間にわたって与えられる輸注として投与されてよい。

【0169】

本発明のナノ粒子は、少なくとも一種の他の活性化合物とともに投与されてよい。該ナノ粒子と化合物は、別個の製剤として又は単位剤形中に併合されて同時投与されても、或いは、連続的に投与されてもよい。

【0170】

50

本発明の一実施態様において、ナノサイズ粒子を含む部品のキットは、同時の、連続的な、又は個別投与のためのものである。

【0171】

本発明のナノサイズ粒子の投与は、望ましくない増殖細胞に送達される検出可能な造影剤の毒性及び程度によって調整されてよい。したがって、本発明の一実施態様においては、ナノサイズ粒子は、同じ一つながりの治療内で個体に1回以上、例えば、1回、2回、3回、4回、又はそれより多く、例えば、約10回、約20回、約30回、約40回、又は約50回投与される。

【0172】

特定の対象に投与されるナノ粒子の用量は、治療対象の体重又は相当する体表面積、対象の年齢及び状態、並びにイメージングされ、照射される標的組織のサイズと位置に基づいて、担当医師によって決定されることができる。一実施態様において、組織のグラム又は cm^3 (mL) あたり注射されたナノ粒子の用量の少なくとも0.001%、例えば、0.01%超、0.05%超、0.1%超、0.3%超、0.5%超、1%超、1.5%超、2%超、3%超、5%超又は10%超が、ヒト中の標的組織に到達する。一実施態様において、罹患組織に送達される用量は、少なくとも0.01mg/mL、例えば、少なくとも0.01mg/mL、少なくとも0.1mg/mL、少なくとも0.5mg/mL、少なくとも1mg/mL、少なくとも5mg/mL、少なくとも10mg/mL、又は少なくとも50mg/mLである。特に好ましい実施態様においては、罹患組織に送達される用量は、0.1mg/mL～1mg/mL又は1mg/mL～10mg/mLである。

【0173】

調製及び合成

本発明は、本明細書に記載のナノサイズ粒子の合成又は調製方法を提供する。

【0174】

検出可能な化合物は、検出可能な化合物の沈殿又は凝集を可能とする種結晶又は低溶解性の塩を使用することによってナノサイズ粒子内に輸送されてよい。かかる結晶は、周期表に定義された、遷移金属、希土類金属、アルカリ金属、アルカリ土類金属、他の金属の結晶、例えば、金(Au)、ビスマス(Bi)、鉄(Fe)、バリウム(Ba)及びカルシウム(Ca)、ガドリニウム(Gd)の結晶、又は上記金属の不溶性又は低溶解性の任意の塩を含む。

【0175】

本発明のナノサイズ粒子の合成又は調製のために、検出可能な化合物の沈殿又は凝集の容易化のための還元剤も使用されてよい。かかる還元剤は、アルコールビン酸、アクリル酸ナトリウム、グルコース、フルクトース、グリセルアルデヒド、ラクトース、アラビノース、マルトース、クエン酸及びアセトールを含む。

【0176】

本発明の好ましい実施態様において、ナノサイズ粒子は、アクリル酸ナトリウム、アスコルビン酸、又はクエン酸を還元剤として使用して調製される。

【0177】

本発明の一つの好ましい実施態様において、ナノサイズ粒子の調製方法は、以下のステップ：

- a) 金ナノ粒子が、システアミンなどの陽イオン荷電した分子種で被覆される。
- b) 70:25:5の比率のDSPC/DSPG/DSPG-2000などの脂質が、有機溶液中で、以下のステップ：
 - a) 最初にそれらをクロロホルムに溶解し、
 - b) 窒素流を用いてそれらを乾燥させ、
 - c) オイルポンプを用いて有機溶媒の微量残渣を一夜除去する、によって混合されて、脂質の薄膜を得る。
- c) 上記脂質膜が、ステップaからの陽イオン性金ナノ粒子、例えば、陽イオン性の5

10

20

30

40

50

0 nm金粒子、を含む緩衝溶液中で60分間、水和される。

d) 100 nmのポリカーボネートフィルターを通してリボソームが押し出され、その大部分が、クライオ透過型電子顕微鏡法により評価して60～120 nmのサイズ範囲にあるリボソームを与える。

e) 空のリボソームが、遠心分離によって金ナノ粒子リボソームから分離される。
の一つ以上を含む。

【0178】

本発明の他の好ましい実施態様において、ナノサイズ粒子の調製方法は、以下のステップ：

a) 金ナノ粒子が、システアミンなどの陽イオン荷電した分子種で被覆される。

b) 上記得られた陽イオン性金ナノ粒子が、少なくとも10000ダルトンの陰性荷電したポリマー、例えば、ヒアルロン酸、を含む溶液に添加され、1時間攪拌される。

c) 上記粒子が、3回遠心分離し、各サイクルの後に緩衝溶液を交換することによって、洗浄される。

の一つ以上を含む。

【0179】

本発明の他の実施態様において、一種以上のイオノフォアが、ナノサイズ粒子の内部に造影剤又は検出可能な化合物を輸送するために使用される。本明細書中で使用される用語「イオノフォア」は、金属などの検出可能な化合物と複合体を形成し、その後、この複合体をナノ粒子の内部へ、例えば、リボソームの二重層を横切って、輸送することのできる任意の化合物を意味する。

【0180】

本発明のイオノフォアは、2-ヒドロキシキノリン（カルボスチリル）、8-ヒドロキシキノリン（オキシシ）；8-ヒドロキシキノリンβ-D-ガラクトピラノシド；8-ヒドロキシキノリンβ-D-グルコピラノシド；8-ヒドロキシキノリングルクロニド；8-ヒドロキシキノリン-5-スルホン酸；8-ヒドロキシキノリンβ-D-グルクロニドナトリウム塩；8-キノリノールヘミ硫酸塩；8-キノリノールN-オキシド；2-アミノ-8-キノリノール；5, 7-ジブromo-8-ヒドロキシキノリン；5, 7-ジクロロ-8-ヒドロキシキノリン；5, 7-ジヨード-8-ヒドロキシキノリン；5, 7-ジメチル-8-キノリノール；5-アミノ-8-ヒドロキシキノリンジヒドロクロライド；5-クロロ-8-キノリノール；5-ニトロ-8-ヒドロキシキノリン；7-bromo-5-クロロ-8-キノリノール；N-ブチル-2, 2'-イミノジ（8-キノリノール）；8-ヒドロキシキノリンベンゾアート；2-ベンジル-8-ヒドロキシキノリン；5-クロロ-8-ヒドロキシキノリンヒドロクロライド；2-メチル-8-キノリノール；5-クロロ-7-ヨード-8-キノリノール；8-ヒドロキシ-5-ニトロキノリン；8-ヒドロキシ-7-ヨード-5-キノリンスルホン酸；5, 7-ジクロロ-8-ヒドロキシ-2-メチルキノリン、キノリンを構成する他の化合物及びその誘導体、並びに他のイオノフォアを含んでよい。

【0181】

本発明の好ましい実施態様において、イオノフォアは、以下の：8-ヒドロキシキノリン（オキシシ）及びその誘導体、2-ヒドロキシキノリン及びその誘導体、A23187、ヘキサメチルプロピレンアミンオキシム（HMPAO）及びその誘導体、ジイソプロピルイミノ二酢酸（DISIDA）及びその誘導体を含む群から選ばれる。

【0182】

イオノフォアが使用されるステップを含む、CT造影剤を含むリボソームの調製のための本発明の方法は、以下のステップ：

a) 例えば、最初に脂質をクロロホルム中に溶解し、続いて、乾燥させて脂質の薄膜を得ることにより、脂質を混合する。

b) 金属塩をゼロの酸化状態の金属に還元するか、又はゼロより高い酸化状態の金属化合物と不溶性の塩を形成するか、又は上記還元と低溶解性の塩の生成の組み合わせのい

10

20

30

40

50

れかが可能な化合物を含む緩衝溶液で、上記脂質膜を水和する。

- c) 20～150nmの好ましいサイズのリポソームを得る。
- d) 外部緩衝液を交換して、金属塩が高い溶解度を有する緩衝液とする。
- e) 水中での溶解度の高い金属塩及びイオノフォアを含む溶液を添加する。
- f) 上記溶液を攪拌して、効率的な負荷を確実にする。

の一つ以上を含んでよい。

【0183】

本発明の他の実施態様において、ナノサイズ粒子の調製方法は、CT造影剤とMR、SPECT又はPETによって可視化可能な溶液中の剤を含むリポソームの調製のためであり、かつ、イオノフォアの使用を含み、以下のステップ：

a) 例えば、最初に脂質をクロロホルムに溶解し、続いて乾燥させて脂質の薄膜を得ることによって、脂質を混合する。

b) 金属塩をゼロの酸化状態の金属に還元するか、又はゼロより高い酸化状態の金属化合物と不溶性の塩を形成するか、又は上記還元と低溶解度の塩の生成の組み合わせのいずれかが可能な化合物を含む緩衝溶液で上記脂質膜を水和する。このステップにおける上記緩衝液はさらに、MR、SPECT又はPETによって可視である剤に強力に結合するキレート剤を含む。

c) 20～150nmの好ましいサイズのリポソームを得る。

d) 好適な方法によって、外部緩衝液を、CTイメージングのために使用する金属塩及びMR、SPECT又はPETのために使用する金属塩が高い溶解度を有する緩衝液に交換する。

e) 水中での高い溶解度を有する、CTイメージングのための金属塩及びMR、SPECT又はPETのための金属塩及びイオノフォアを含む溶液を、溶液中のリポソームに添加する。

f) 上記溶液を少なくとも30分間攪拌して、効率的な負荷を確実にするステップ。の一つ以上を含む。

【0184】

本発明の他の実施態様において、ナノサイズ粒子の調製方法は、イオノフォア及びリポソーム膜に共有結合したMR、SPECT又はPETによって可視化可能な剤を用いる、CT造影剤を含むリポソームの調製のためであり、以下のステップ：

a) 例えば、最初にクロロホルム又はクロロホルムとメタノール若しくは他の有機溶媒との混合物に脂質を溶解し、続いて乾燥させて脂質の薄膜を得ることによって、脂質を混合する。脂質成分の一つは、共有結合した剤又は該剤を封入することのできるキレート剤のいずれかによりMR、SPECT又はPETによって可視化可能な剤を含み、ここで、該剤は、このステップ中に存在するか又は後のステップに導入されることができる。

b) 金属塩をゼロの酸化状態の金属に還元するか、又はゼロより高い酸化状態の金属化合物と不溶性の塩を形成させるか、又は上記還元と低溶解度の塩の生成の使用の組み合わせのいずれかをする化合物を含む緩衝溶液で上記脂質膜を水和する。

c) 20～150nmの好ましいサイズのリポソームを得る。

d) 外部緩衝液を交換する。

e) 水中での高い溶解度を有する金属塩及びイオノフォアを含む溶液を添加する。

f) 上記溶液を少なくとも30分間攪拌して、効率的な負荷を確実にする。の一つ以上を含む。

【0185】

調製方法はさらに、セファデックスG50を用いるサイズ排除クロマトグラフィーなどの精製ステップを含んでよい。

【0186】

本発明によれば、ゼロより高い酸化状態は、一価陽イオン、二価陽イオン、三価陽イオン、四価陽イオン、五価陽イオン、六価陽イオン及び七価陽イオンを含む。

【0187】

本発明によれば、好ましいサイズを有するリボソームを得ることは、クライオ透過型電子顕微鏡法によるサイズの評価と均一化及び／又はポリカーボネートフィルターを用いる押し出しによって行われてよい。

【0188】

上記方法による、外部緩衝液の交換は、透析、カラムクロマトグラフィー又は遠心分離などの好適な方法を用いることによって行われることができる。

【0189】

MR、SPECT又はPETにより可視であり、調製方法において使用される剤は、本明細書において定義される放射性、常磁性又は強磁性化合物、例えば、ガドリニウム、インジウム、テクネチウム又は銅の同位体である。

10

【0190】

本発明又は本発明の方法のキレート剤は、MR、SPECT及びPET剤とキレート錯体を形成するキレート剤であることができる。キレート剤の例は、1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 4, 7, 10-四酢酸(DOTA)及びその誘導体; 1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン(シクラム)及びその誘導体; 1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン(シクレン)及びその誘導体; 1, 4-エタノ-1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン(et-シクラム)及びその誘導体; 1, 4, 7, 11-テトラアザシクロテトラデカン(イソシクラム)及びその誘導体; 1, 4, 7, 10-テトラアザシクロトリデカン([13]aneN₄)及びその誘導体; 1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 7-二酢酸(DO2A)及びその誘導体; 1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 4, 7-三酢酸(DO3A)及びその誘導体; 1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 7-ジ(メタンホスホン酸)(DO2P)及びその誘導体; 1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 4, 7-トリ(メタンホスホン酸)(DO3P)及びその誘導体; 1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 4, 7, 10-テトラ(メタンホスホン酸)(DOTP)及びその誘導体; エチレンジアミン四酢酸(EDTA)及びその誘導体; ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)及びその誘導体; 1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン-1, 4, 8, 11-四酢酸(TETA)及びその誘導体; 又は他のアダマンザン及びその誘導体を含むが、これらに限定されない。

20

【0191】

本発明によれば、リボソーム、金属塩及びイオノフォアを含む溶液の攪拌は、少なくとも30分間、例えば、少なくとも3時間、例えば、少なくとも12時間、行われることができる。

30

【0192】

さらに、本発明によれば、リボソーム、金属塩及びイオノフォアを含む溶液の攪拌は、効率的な負荷のために好適な温度で行われる。かかる温度は、少なくとも10℃、例えば、少なくとも20℃、例えば、少なくとも30℃、例えば、少なくとも40℃、例えば、少なくとも50℃、例えば、少なくとも60℃、かつ、95℃未満を含む。

【0193】

本明細書中で使用される用語「負荷」、「カプセル化」又は「封入」は、検出可能な化合物のナノサイズ粒子組成物内部への取り込みを意味する。本明細書中で交換可能に使用される用語「負荷効率」、「封入効率」又は「カプセル化効率」は、調製において使用される、水を除いた検出可能な化合物の重量による総量に対するパーセントとして表される、ナノサイズ粒子組成物内部への検出可能な化合物の取り込みの割合を意味する。用語「カプセル化安定性」、「貯蔵安定性」又は「血清安定性」は、ナノサイズ粒子組成物内部に封入された検出可能な化合物の漏出及び／又は放出の程度を測定するための、ナノサイズ粒子組成物の安定性試験に関連する。

40

【0194】

負荷効率の決定は、重量によるか、或いはICP-MS、ICP-AES又はAASなどのMS法を用いるか、或いはUV又は本分野で知られた他の方法などの分光学的方法に

50

ることができる。

【0195】

本発明による調製方法において、脂質に対する造影剤の重量パーセントで測定した負荷効率は、少なくとも50重量／重量％、例えば、少なくとも60重量／重量％、又は例えば、少なくとも70重量／重量％、又は例えば、少なくとも80重量／重量％、又は例えば、少なくとも90重量／重量％、又は例えば、少なくとも95重量／重量％、又は例えば、少なくとも97重量／重量％、又は例えば、少なくとも98重量／重量％、又は例えば、少なくとも99重量／重量％、又は例えば、少なくとも99.9重量／重量％である。

【0196】

本発明によれば、ナノ粒子の調製に使用される金属は、周期表により定義される遷移金属、希土類金属、アルカリ金属、アルカリ土類金属、他の金属を含む。金属は、CT造影剤の形態で用いられなければならない。

【0197】

本発明の好ましい実施態様において、金粒子を含むリボソームの調製方法は、以下のステップ：

a) 50：40；10の割合のDSPC／Chol／DSPE－PEG2000などの脂質が、最初にそれらをクロロホルム中に溶解し、続いて、窒素流を用いて乾燥させ、続いて、オイルポンプを用いて一夜、有機溶媒の微量残渣を除去して脂質の薄膜を得ることにより、有機溶液中で混合される。

b) 上記脂質膜が、クエン酸ナトリウム及び少量の直径2～4nmのクエン酸安定化金ナノ粒子を含む緩衝溶液中で60分間水和される。これらの金ナノ粒子は、リボソーム内部で種結晶として作用する。

c) 上記リボソームが、100nmポリカーボネートフィルターを通して押し出され、その大部分が、クライオ透過型電子顕微鏡法によって評価した60～140nmのサイズ範囲にあるリボソームを与える。

d) 外部緩衝液が、セファデックスG50を用いるサイズ排除クロマトグラフィーによってクエン酸を含まない緩衝系に交換される。

e) HAcの緩衝溶液が、オキシシンとともに上記リボソーム溶液に添加される。

f) 上記溶液が少なくとも3時間、50℃で攪拌される。

g) リボソームが、セファデックスG50を用いるサイズ排除クロマトグラフィーによって精製される。
の一つ以上を含む。

【0198】

ハイドロキシアパタイトは骨において発生し、そして、十分に機能するCT造影剤であるカルシウムアパタイトの天然形態である。

【0199】

本発明の他の好ましい実施態様において、ナノサイズ粒子の調製方法は、以下のステップ：

d) 50：40；10の割合のDSPC／Chol／DSPE－PEG2000などの脂質が、

a) 最初にそれらをクロロホルム中に溶解し、

b) 窒素流を用いてそれらを乾燥させ、

c) オイルポンプを用いて一夜、有機溶媒の微量残渣を除去して脂質の薄膜を得ることにより、有機溶液中で混合される。

e) 高濃度のリン酸アンモニウムを含み、7より高い、好ましくは、7.1、又は7.4、又は8.0、又は9.0の、pHに調整された緩衝溶液中で、上記脂質膜が60分間、水和される。

f) 上記リボソームが100nmのポリカーボネートフィルターを通して押し出され、その大部分がクライオ透過型電子顕微鏡法によって評価した60～140nmのサイズ範

10

20

30

40

50

囲内にあるリボソームを与える。

g) 外部緩衝液が、セファデックス G 50 を用いるサイズ排除クロマトグラフィーによって、リン酸アンモニウムを含まない緩衝系に交換される。

h) 硝酸カルシウムの緩衝溶液が、オキシシンとともに上記リボソーム溶液に添加される。

i) 上記溶液が、少なくとも 3 時間、50℃で攪拌される。

j) 上記リボソームが、セファデックス G 50 を用いるサイズ排除カラムクロマトグラフィーによって精製される。

の一つ以上を含む。

【0200】

本発明の好ましい実施態様において、上記のように生成されたナノサイズ粒子は、本発明のイメージングと放射線治療を含む治療方法の一部として個体に投与される。

【実施例】

【0201】

実施例 1—本発明のリボソームの調製

a. イオノフォアを用いるリボソームの調製方法の一般例

CT造影剤を、イオノフォアの助けによってリボソーム中に負荷する場合、好ましい調製プロセスは以下のステップ：

a) 最適の脂質を、例えば、最初にそれらをクロロホルムに溶解し、続いて、乾燥させて、脂質の薄膜を得ることによって混合する。

b) 金属塩をゼロの酸化状態の金属に還元するか、又はゼロより高い、例えば、+1、+2、+3などの酸化状態の金属化合物と不溶性の塩を形成するか、又は上記還元と低溶解性の塩の生成の使用の組み合わせのいずれかが可能な化合物を含む緩衝溶液で、上記脂質膜を水和する。

c) クライオ透過型電子顕微鏡法により評価した 20～150 nm の好ましいサイズのリボソームを得るための方法、例えば、均一化及び／又は押し出し、を用いる。

d) 好適な方法、例えば、透析、カラムクロマトグラフィー、又は遠心分離、によって、外部緩衝液を交換して、金属塩が高い溶解度を有する緩衝液とする。

e) 水中での高い溶解度を有する金属塩及びイオノフォアを含む溶液を添加する。

f) 効率的な負荷のための好適な温度、例えば、10、又は20、又は30、又は40、又は50、又は60超、かつ95℃未満で、少なくとも30分、又は、少なくとも3時間、又は少なくとも12時間、溶液を攪拌する。

を含む。

【0202】

場合により、セファデックス G 50 を用いるサイズ排除クロマトグラフィーなどの精製ステップを使用することができる。

【0203】

負荷効率は、脂質に対して造影剤が、少なくとも50重量／重量％でなければならない。負荷効率の決定は、重量によるか、或いはICP-MS、ICP-AES又はAASなどのMS法を用いるか、或いは、UVなどの分光学的方法によることができる。

【0204】

金属は、以下の：周期表により定義された遷移金属、希土類金属、アルカリ金属、アルカリ土類金属、他の金属を含む。金属は、CT造影剤の形態で用いられなければならない。

【0205】

イオノフォアは、8-ヒドロキシキノリン（オキシシン）及びその誘導体、2-ヒドロキシキノリン及びその誘導体、A23187、ヘキサメチルプロピレンアミノオキシム（HMPAO）及びその誘導体、ジイソプロピルイミノ二酢酸（DISIDA）及びその誘導体を含むが、これらに限定されない。

【0206】

10

20

30

40

50

b. イオノフォア及び還元剤としてのシトラートを用いる、金の遠隔負荷 (remote loading) の特別な実施例

以下の方法を用いることにより、イオノフォアの助けによってAu(0)CT造影剤をリポソーム内に形成する。

【0207】

上記プロセスは以下のステップ：

a) 50：40；10の割合のDSPC／Chol／DSPE-PEG2000などの脂質を、最初にそれらをクロロホルム中に溶解し、続いて、窒素流を用いて乾燥させ、続いて、オイルポンプを用いて一夜、有機溶媒の微量残渣を除去して脂質の薄膜を得ることにより、有機溶液中で混合する。

b) 上記脂質膜を、クエン酸ナトリウム及び少量の直径2～4nmのクエン酸安定化金ナノ粒子を含む緩衝溶液中で、60分間水和する。これらの金ナノ粒子は、リポソーム中で種結晶として作用する。

c) 上記リポソームを、100nmポリカーボネートフィルターを通して押し出し、その大部分がクライオ透過型電子顕微鏡法によって評価した60～140nmのサイズ範囲にあるリポソームを与える。

d) 外部緩衝液を、セファデックスG50を用いるサイズ排除クロマトグラフィーによって、シトラートを含まない緩衝系に交換する。

e) HAuCl₄の緩衝溶液を、オキシシンとともに上記リポソーム溶液に添加する。

f) 上記溶液を少なくとも3時間、50℃で攪拌する。

g) 上記リポソームを、セファデックスG50を用いるサイズ排除クロマトグラフィーによって精製する。

【0208】

c. 低溶解性のハイドロキシアパタイトの沈殿を与える、イオノフォアを用いるカルシウムの遠隔負荷の実施例

ハイドロキシアパタイトは骨において発生し、そして、十分に機能するCT造影剤であるカルシウムアパタイトの天然形態である。イオノフォアの助けによって、カルシウムをリポソーム中に負荷することができる。

【0209】

上記プロセスは、以下のステップ：

a) 50：40；10の割合のDSPC／Chol／DSPE-PEG2000などの脂質を、最初にそれらをクロロホルム中に溶解し、続いて、窒素流を用いて乾燥させ、続いて、オイルポンプを用いて一夜、有機溶媒の微量残渣を除去して脂質の薄膜を得ることにより、有機溶液中で混合する。

b) 上記脂質膜を、高濃度のリン酸アンモニウムを含み、7より高い、好ましくは、7.1、又は7.4、又は8.0、又は9.0の、pHに調整された緩衝溶液中で60分間、水和する。

c) 上記リポソームを100nmのポリカーボネートフィルターを通して押し出し、その大部分がクライオ透過型電子顕微鏡法によって評価した60～140nmのサイズ範囲にあるリポソームを与える。

d) 外部緩衝液を、セファデックスG50を用いるサイズ排除クロマトグラフィーによって、リン酸アンモニウムを含まない緩衝系に交換する。

e) 硝酸カルシウムの緩衝溶液を、オキシシンとともに上記リポソーム溶液に添加する。

f) 上記溶液を少なくとも3時間、50℃で攪拌する。

g) 上記リポソームを、セファデックスG50を用いるサイズ排除カラムクロマトグラフィーによって精製する。

【0210】

d. CT造影剤及びMR、SPECT又はPETによって可視化可能な溶液中の剤を含

10

20

30

40

50

むリポソームの、イオノフォアの使用による調製方法の実施例

C T造影剤を、イオノフォアの助けによってリポソーム中に負荷する。該方法は、以下のステップ：

a) 最適の脂質を、例えば、最初にそれらをクロロホルムに溶解し、続いて、乾燥させて、脂質の薄膜を得ることによって混合する。

b) 上記脂質膜を、金属塩をゼロの酸化状態の金属に還元するか、又はゼロより高い、例えば、+1、+2、+3などの酸化状態の金属化合物と不溶性の塩を形成するか、又は上記還元と低溶解性の塩の生成の使用の組み合わせのいずれかが可能な化合物を含む緩衝溶液で水和する。上記緩衝溶液は、さらに、MR、S P E C T又はP E Tにより可視である剤、例えば、ガドリニウム、テクネチウム、例えば、テクネチウム-99m、又は銅、例えば、 ^{64}Cu 、を強力に結合するキレート剤を含む。

c) クライオ透過型電子顕微鏡法により評価した20~150nmの好ましいサイズのリポソームを得るための方法、例えば、均一化及び／又は押し出し、を用いる。

d) 好適な方法、例えば、透析、カラムクロマトグラフィー、又は遠心分離、によって外部緩衝液を交換して、C Tイメージングのために使用する金属塩及びMR、S P E C T又はP E Tのために使用する金属塩が高い溶解度を有する緩衝液とする。

e) 水中での高い溶解度を有する、C Tのための金属塩及びMR、S P E C T又はP E Tのための金属塩及びイオノフォアを含む溶液を添加する。

f) 効率的な負荷のための好適な温度、例えば、10、又は20、又は30、又は40、又は50、又は60超、かつ95℃未満で、少なくとも30分、又は少なくとも3時間、又は少なくとも12時間、溶液を攪拌する。

g) セファデックスG50を用いるサイズ排除クロマトグラフィーなどの精製ステップを、場合により、使用することができる。

h) 負荷効率は、脂質に対する造影剤が、少なくとも50重量／重量％であると測定される。負荷効率の決定は、重量によるか、或いはI C P-M S、I C P-A E S又はA A SなどのM S法を用いるか、或いは、U Vなどの分光学的方法による。

【0211】

金属は、以下の：周期表により定義された遷移金属、希土類金属、アルカリ金属、アルカリ土類金属、他の金属を含む。金属は、C T造影剤の形態で用いられなければならない。

【0212】

イオノフォアは、以下の：8-ヒドロキシキノリン（オキシシン）及びその誘導体、2-ヒドロキシキノリン及びその誘導体、A23187、ヘキサメチルプロピレンアミノオキシム（HMPAO）及びその誘導体、ジイソプロピルイミノ二酢酸（DISIDA）及びその誘導体を含むが、これらに限定されない。

【0213】

キレート剤成分は、MR、S P E C T及びP E T剤とキレート錯体を形成するキレート剤である。キレート剤の例は、1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 4, 7, 10-四酢酸（DOTA）及びその誘導体；1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン（シクラム）及びその誘導体；1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン（シクレン）及びその誘導体；1, 4-エタノ-1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン（e t-シクラム）及びその誘導体；1, 4, 7, 11-テトラアザシクロテトラデカン（イソシクラム）及びその誘導体；1, 4, 7, 10-テトラアザシクロトリデカン（[13]aneN₄）及びその誘導体；1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 7-二酢酸（DO2A）及びその誘導体；1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 4, 7-三酢酸（DO3A）及びその誘導体；1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 7-ジ（メタンホスホン酸）（DO2P）及びその誘導体；1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 4, 7-トリ（メタンホスホン酸）（DO3P）及びその誘導体；1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1,

4, 7, 10-テトラ(メタンホスホン酸)(DOTP)及びその誘導体; エチレンジアミン四酢酸(EDTA)及びその誘導体; ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)及びその誘導体; 1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン-1, 4, 8, 11-四酢酸(TETA)及びその誘導体; 又は他のアダマンザン及びその誘導体を含むが、これらに限定されない。

【0214】

e. イオノフォア及びMR、SPECT又はPETにより可視化可能な、リポソーム膜と共有結合する剤の使用による、CT造影剤を含むリポソームの調製方法の実施例

CT造影剤を、イオノフォアの助けにより、リポソーム中に負荷し、そのプロセスは、以下のステップ:

a) 最初にクロロホルム又はクロロホルムとメタノール若しくは他の有機溶媒との混合物に脂質を溶解し、続いて乾燥させて脂質の薄膜を得ることによって、脂質を混合する。脂質成分の一つは、共有結合する剤又は該剤を封入可能なキレート剤のいずれかにより、MR、SPECT、又はPETによって可視化可能な剤を含む。該剤は、このステップに存在しても、後のステップに導入されることもできる。

b) 金属塩をゼロの酸化状態の金属に還元するか、又はゼロより高い、例えば、+1、+2、+3などの酸化状態の金属化合物と不溶性の塩を形成するか、又は上記還元と低溶解性の塩の生成の使用の組み合わせのいずれかが可能な化合物を含む緩衝溶液で、上記脂質膜を水和する。

c) クライオ透過型電子顕微鏡法により評価した20~150nmの好ましいサイズのリポソームを得るための方法、例えば、均一化及び/又は押し出し、を用いる。

d) 好適な方法、例えば、透析、カラムクロマトグラフィー、又は遠心分離、によって、外部緩衝液を交換して、金属塩が高い溶解度を有する緩衝液とする。

e) 水中での高い溶解度を有する金属塩及びイオノフォアを含む溶液を添加する。

f) 効率的な負荷のための好適な温度、例えば、10、又は20、又は30、又は40、又は50、又は60超、かつ95℃未満で、少なくとも30分、又は、少なくとも3時間、又は少なくとも12時間、溶液を攪拌する。

g) セファデックスG50を用いるサイズ排除クロマトグラフィーなどの精製ステップを、場合により、使用することができる。

h) 負荷効率は、脂質に対する造影剤が、少なくとも50重量/重量%でなければならない。負荷効率の決定は、重量によるか、或いは、ICP-MS、ICP-AES又はAASなどのMS法を用いるか、或いは、UVなどの分光学的方法によることができる。を含む。

【0215】

金属は、以下の: 周期表により定義された遷移金属、希土類金属、アルカリ金属、アルカリ土類金属、他の金属を含む。金属は、CT造影剤の形態で用いられなければならない。

【0216】

イオノフォアは、8-ヒドロキシキノリン(オキシシン)及びその誘導体、2-ヒドロキシキノリン及びその誘導体、A23187、ヘキサメチルプロピレンアミノオキシム(HMPAO)及びその誘導体、ジイソプロピルイミノ二酢酸(DISIDA)及びその誘導体を含むが、これらに限定されない。

【0217】

キレート剤成分は、脂質への共有結合に好適な官能基(functional handle)を有する誘導体であることができ、以下の: 1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 4, 7, 10-四酢酸(DOTA)及びその誘導体; 1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン(シクラム)及びその誘導体; 1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン(シクレン)及びその誘導体; 1, 4-エタノ-1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン(ete-シクラム)及びその誘導体; 1, 4, 7, 11-テトラアザシクロテトラデカン(イソシクラム)及びその誘導体; 1, 4, 7, 10

ーテトラアザシクロトリデカン（ $[13]aneN_4$ ）及びその誘導体；1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 7-二酢酸（DO2A）及びその誘導体；1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 4, 7-三酢酸（DO3A）及びその誘導体；1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 7-ジ（メタンホスホン酸）（DO2P）及びその誘導体；1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 4, 7-トリ（メタンホスホン酸）（DO3P）及びその誘導体；1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 4, 7, 10-テトラ（メタンホスホン酸）（DOTP）及びその誘導体；エチレンジアミン四酢酸（EDTA）及びその誘導体；ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）及びその誘導体；1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン-1, 4, 8, 11-四酢酸（TETA）及びその誘導体；又は他のアダマンザン及びその誘導体を含むが、これらに限定されない。

10

【0218】

実施例 I I—本発明の方法において有用なナノサイズ粒子の調製

a. 16~80 nmの異なるサイズの高純度金ナノ粒子（AuNP）を得るための手順

材料：

テトラクロロ金（III）酸四水和物をWako Pure Chemical Industries Ltd. から購入し、アクリル酸ナトリウム、水酸化ナトリウム、硝酸及び塩酸をSigma-Aldrichから購入した。MilliQ水を高純度金ナノ粒子の調製の間を通して使用した（Millipore, Bedford, MA）。すべての材料をさらに精製することなく使用した。

20

【0219】

特徴づけ：

粒子を、動的光散乱及びゼータ電位測定（Zetasizer Nano; Malvern Instruments, Malvern, UK）により、並びにそれらの紫外可視スペクトル（Unicam Helios Uni-9423）により特徴付けた。粒子のサイズと均一性を可視化するために、Tecnai T20 G2（FEI Company, USA）透過型電子顕微鏡及び原子間力顕微鏡（PSIA XE 150 Park Systems, Korea）を用いた。

【0220】

合成：

16 nm AuNP

ガラス器具とマグネットを王水（HCl : HNO₃ 3 : 1）で洗浄し、さらにMilliQ水ですすいだ。HAuCl₄ × 3H₂O（156.8 mg）をMilliQ水（380.8 mL）に溶解し、濃縮器に取り付けてオイルバス中で還流温度まで加熱した。予熱した（約70℃）アクリル酸ナトリウム（859 mg、80 mM、114.2 mL）の溶液を添加し、そして、還流温度まで1時間反応させた。反応は、透明から紫色、そして最後にワインレッドの色変化を経た。反応を室温まで冷却した。

30

【0221】

DLS : 27.6 nm、PDI : 0.096 ; Zeta : -25, 85 mV ± 1, 43 mV ; UV-vis : λ_{max} 526 nm ; TEM 16~20 nm ; AFM 16~20 nm.

40

【0222】

30 nm AuNP

ガラス器具を王水（HCl : HNO₃ 3 : 1）で洗浄し、さらにMilliQ水ですすいだ。

【0223】

HAuCl₄ × 3H₂O（125.2 mg）をMilliQ水（1.34 L）に溶解し、0.1 M水酸化ナトリウム溶液を用いてpHを7に調整した。MilliQ水中アクリル酸ナトリウム（1.72 g、446.7 mL、41 mM）をpH調整した溶液に添加し、フラスコを短時間回転させて、室温に3~4日おいた。これらの日々の間にワインレッド

50

の色がゆっくりと現れた。反応を紫外可視スペクトルの強度（OD）によってモニターした。AuNPの濃度は、遠心分離（6500 rpm、10分）によって約0.8 mMまで増加した。

【0224】

DLS：32.8 nm、PDI：0.050；Zeta：-32,94 mV $\pm$ 1,0 mV；UV-vis： $\lambda_{\max}$ 523 nm；TEM 30 nm；AFM 30 nm。

【0225】

50 nm AuNP

30 nmのサイズのAuNPを種結晶として使用して、50 nm AuNPまで成長させた。ガラス器具を王水（HCl：HNO₃ 3：1）で洗浄し、さらにMilliQ水ですすいだ。HAuCl₄×3H₂O（64 mg）をMilliQ水（546 mL）に溶解し、0.1 M水酸化ナトリウム溶液を用いてpHを7に調整した。30 nmの種を、 1.17×10^{11} ナノ粒子/mLの濃度で添加し、続いて、アクリル酸ナトリウムの溶液（876.3 mg、182 mL、51.2 mM）を添加した。用いた体積比は、（Au³⁺：Au⁰：アクリル酸ナトリウム）：（6：2：2）であった。フラスコを短時間回転させて、室温に3～4日おいた。反応は、粒子の成長をDLSによってモニターした。AuNPの濃度は、遠心分離（6500 rpm、10分）によって約0.8 mMまで増加した。DLS：52.6 nm、PDI：0.126；Zeta：-40.21 mV $\pm$ 1.62 mV；UV-vis： $\lambda_{\max}$ 531 nm；TEM 50 nm；AFM 50 nm。

【0226】

80 nm AuNP

50 nmのサイズのAuNPを種結晶として使用して、80 nm AuNPまで成長させた。50 nm AuNPの成長と同じ手順を使用した。4300 rpm、10分間の遠心分離によって粒子を濃縮した。

【0227】

DLS：85.4 nm、PDI：0.047；Zeta：-50.31 mV $\pm$ 1.58 mV；UV-vis： $\lambda_{\max}$ 557 nm；TEM 80 nm；AFM 80～85 nm。

【0228】

b. CTイメージングのためのPEGポリマー被覆金ナノ粒子

実施例IIaにおいて得られた溶液とのさらなる反応によるPEG被覆を含む金ナノ粒子を合成する。PEG₂₀₀₀～PEG₁₀₀₀₀のサイズ範囲のチオール官能化モノメトキシポリ（エチレングリコール）をRapp Polymerから購入した。ペグ化金ナノ粒子を遠心分離によって集め、MQ水又は緩衝液で洗浄する。

【0229】

ペグ化手順 16 nm AuNP：過剰のmPEGチオール（nm²表面あたり8 PEG分子）を16 nm AuNP溶液に添加し、そして、反応を一夜攪拌して室温においた。AuNPを9500 rpm、40分間の遠心分離により集めた。

【0230】

ペグ化手順 30 nm AuNP：mPEGチオール（nm²表面あたり8 PEG分子）を30 nm AuNP溶液に添加し、そして、9500 rpm、20分間の遠心分離によりAuNPを集める前に反応を一夜攪拌して室温においた。

【0231】

ペグ化手順 50 nm AuNP：mPEGチオール（nm²表面あたり8 PEG分子）を50 nm AuNP溶液に添加し、そして、反応を一夜攪拌して室温においた。AuNPを9500 rpm、10分間の遠心分離により集めた。

【0232】

ペグ化手順 80 nm AuNP：mPEGチオール（nm²表面あたり8 PEG分子）をAuNPに添加し、そして、混合物を一夜攪拌して室温においた。粒子を9000 rpm、10分間の遠心分離により集めた。

【0233】

10

20

30

40

50

c. ペグ化金ナノロッド

高安定性の $13 \times 47 \text{ nm}$ セチルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB) 被覆金ナノロッド (Nanopartz から) を、 $16,000 \text{ rcf}$ で遠心分離して、ロッドを濃縮し、その後、それらを $\text{MeO}-\text{PEG}-\text{SH}$ (5 kDa) 溶液に再懸濁する。該ナノロッドは、遠心分離により集めることができ、その後、それらを引き続いて MQ 水で洗浄する。

【0234】

d. ポリマー被覆ビスマススルフィドナノ粒子

ビスマススルフィドナノ結晶を、界面活性剤の存在下での沈殿によって調製する。ビスマスチオラート溶液を、3-メルカプトプロピオン酸を NH_4OH 中、クエン酸ビスマスに添加することによって調製する。激しく攪拌しながら、硫化ナトリウムを滴下してビスマスチオラート溶液に添加する。該混合物をろ過し、そして、生成物を凍結乾燥する。生成物を水性ポリビニルピロリドン (PVP) 中に溶解し、そして、水性ポリチレンオキシドに対して透析して、 PVP -被覆ナノ粒子を得る。

【0235】

e. リン酸カルシウムリポソームコア-シェルナノ複合体

ダイズレシチンをクロロホルムに溶解し、乾燥して脂質薄膜を生成することによって、リポソームコア-シェルナノ複合体の調製を達成する。 HNO_3 で $\text{pH} 2.4$ に調整した $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 及び $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ の溶液を、乾燥脂質膜を水和してリポソームを生成するために使用する。小胞懸濁液を emulsiflex-B3 (Avestin, Canada) によって 10 回乳化する。均一サイズのリポソームを得るために、該溶液をポア直径 200 nm のポリカーボネート膜フィルター (Poretics, USA) を通して押し出す。押し出しを 10 回繰り返す。懸濁液を Na^+ イオン交換カラムを通して、未封入の Ca^{2+} を除去する。水酸化物のリポソーム内部へのゆっくりとした拡散によってリポソーム内の沈殿プロセスを推進する、 NH_4OH 溶液を用いて pH を 10 に調整する。

【0236】

f. CT イメージングのための、封入された金ナノ粒子を含む PAMAM デンドリマー

HAuCl_4 を、種金ナノ粒子、例えば、 2 nm 粒子、を含む PAMAM デンドリマーに添加し、その後、アスコルビン酸を一度で添加して、30 分間反応させる。アスコルビン酸による穏やかな還元は、CT イメージングにおいて使用可能なデンドリマー内の金の種からより大きな金ナノ粒子への成長を確実にする。

【0237】

g. ナノ粒子は、MR 又は PET イメージングと併用される CT イメージングのための PEG ポリマー被覆金ナノ粒子である

以下の 2 つの実施例では、キレート剤は、以下の：1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 4, 7, 10-四酢酸 (DOTA) 及びその誘導体；1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン (シクラム) 及びその誘導体；1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン (シクレン) 及びその誘導体；1, 4-エタノ-1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン (e t-シクラム) 及びその誘導体；1, 4, 7, 11-テトラアザシクロテトラデカン (イソシクラム) 及びその誘導体；1, 4, 7, 10-テトラアザシクロトリデカン ($[13] \text{ aneN}_4$) 及びその誘導体；1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 7-二酢酸 (DO2A) 及びその誘導体；1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 4, 7-三酢酸 (DO3A) 及びその誘導体；1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 7-ジ (メタンホスホン酸) (DO2P) 及びその誘導体；1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 4, 7-トリ (メタンホスホン酸) (DO3P) 及びその誘導体；1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 4, 7, 10-テトラ (メタンホスホン酸) (DOTP) 及びその誘導体；エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 及びその誘導体；ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA) 及びその誘導体；1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン-

10

20

30

40

50

1, 4, 8, 11-四酢酸 (TETA) 及びその誘導体; 又は他のアダマンザン及びその誘導体のチオール基を含むリンカーを有する誘導体である。

【0238】

h. CTイメージング及びMRイメージングのためのPEGポリマー被覆金ナノ粒子
HAuCl₄溶液を10分間加熱し、はげしく攪拌しながら迅速にクエン酸ナトリウムを該溶液に添加することによって、PEG被覆を有する金ナノ粒子を合成する。溶液を冷却後、PEG2000-SHなどの適当な長さのMeO-PEG-SHを、MRイメージングを用いて可視化可能な金属を結合するチオール誘導体化キレート剤とともに添加する。この混合物を1時間攪拌する。ガドリニウムなどのMRイメージング剤を添加し、次いで溶液を1時間攪拌する。ペグ化金ナノ粒子を遠心分離によって集め、MQ水で洗浄する。

10

【0239】

i. CTイメージング及びPETイメージングのためのPEGポリマー被覆金ナノ粒子
HAuCl₄溶液を10分間加熱し、はげしく攪拌しながら迅速にクエン酸ナトリウムを該溶液に添加することによって、PEG被覆とともに金ナノ粒子を合成する。溶液を冷却後、PEG2000-SHなどの適当な長さのMeO-PEG-SHを、PETイメージングを用いて可視化可能な金属を結合するチオール誘導体化キレート剤とともに添加する。この混合物を1時間攪拌する。ペグ化金ナノ粒子を遠心分離によって集め、MQ水で洗浄する。例えば、PBS緩衝液中の銅 (⁶⁴Cu) などのPETイメージング剤を添加し、次いで溶液を30分間攪拌する。

20

【0240】

実施例 I I I - 本発明の方法において有用な脂質被覆ナノサイズ粒子の調製

この実施例は、脂質被覆ナノサイズ粒子の合成を記載する。

ステップ1: 50nm金ナノサイズ粒子 (AuNP) の合成

ガラス器具を王水 (HCl : HNO₃ 3 : 1) で洗浄し、さらにMilliQ水ですすぐ。

【0241】

HAuCl₄ × 3H₂O (125.2mg) をMilliQ水 (1.34L) に溶解し、0.1M水酸化ナトリウム溶液を用いてpHを7に調整した。MilliQ水中アクリル酸ナトリウム (1.72g、446.7mL、41mM) をpH調整した溶液に添加し、フラスコを短時間回転させて、室温に3~4日おいた。これらの日々の間にワインレッドの色ゆっくりと現れた。反応を紫外可視スペクトルの強度 (OD) によってモニターした。10分間の6500rpmでの遠心分離によって、AuNPを濃縮した。

30

【0242】

得られた30nmのサイズのAuNPを種として使用して、50nmAuNPを成長させた。ガラス器具を王水 (HCl : HNO₃ 3 : 1) で洗浄し、さらにMilliQ水ですすいだ。HAuCl₄ × 3H₂O (64mg) をMilliQ水 (546mL) に溶解し、0.1M水酸化ナトリウム溶液を用いてpHを7に調整した。2-アミノエタンチオール (HAuCl₄ : 2-アミノエタンチオールの比は、1 : 1.3であった) の存在下、30nmの種を1.17 × 10¹¹ナノ粒子/mLの濃度で添加し、続いて、アクリル酸ナトリウム (876.3mg、182mL、51.2mM) の溶液を添加した。使用した体積比は、(Au³⁺ : Au⁰ : アクリル酸ナトリウム) : (6 : 2 : 2) であった。フラスコを短時間回転させて、室温に3~4日おいた。反応をDLSによる粒子の成長によってモニターした。7500rpmにおける10分間の遠心分離によってAuNPを集め、そして洗浄した。

40

【0243】

得られた陽イオン性粒子懸濁液を、DSPC/DSPG/DSPC-PEG2000 (70 : 25 : 5) に添加し、これを70℃で60分間水和させた。8500rpmにおける10分間の遠心分離によって、脂質金粒子を集め、そして上清を交換することによってこの手順を用いて3回洗浄した。

50

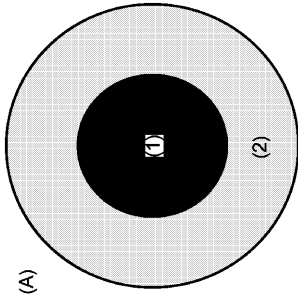
【 0 2 4 4 】

引用文献

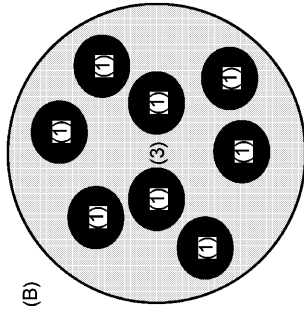
【表 1】

1. Dawson LA, Sharpe MB. Image-guided radiotherapy: rationale, benefits, and limitations. *Lancet Oncol.* 2006 Oct;7(10):848-58.
2. Jaffray, DA; JP Bissonnette, T Craig (1999) [1999]. "X-ray Imaging for Verification and Localization in Radiation Therapy in Modern Technology of Radiation Oncology (suppl. 1)". *Modern Technology of Radiation Oncology*. Madison, WI: Medical Physics Pub 10
3. Hainfeld JF, Slatkin DN, Focella TM, Smilowitz HM. Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent. *Br J Radiol.* 2006 Mar;79(939):248-53.
4. Kim D, Park S, Lee JH, Jeong YY, Jon S. Antibiofouling polymer-coated gold nanoparticles as a contrast agent for in vivo X-ray computed tomography imaging. *J Am Chem Soc.* 2007 Jun 20;129(24):7661-5. 20
5. Rabin O, Manuel Perez J, Grimm J, Wojtkiewicz G, Weissleder R. An X-ray computed tomography imaging agent based on long-circulating bismuth sulphide nanoparticles. *Nat Mater.* 2006 Feb;5(2):118-22.
6. Chu M and Liu G. Preparation and characterization of hydroxoapatite/liposome core-shell nanocomposites. *Nanotechnology* 16, 2005, 1208-1212. 30
7. Haba Y, Kojima C, Harada A, Ura T, Horinaka H, Kono K. Preparation of poly(ethylene glycol)-modified poly(amido amine) dendrimers encapsulating gold nanoparticles and their heat-generating ability. *Langmuir.* 2007 May 8;23(10):5243-6.
8. Zheng J, Perkins G, Kirilova Am Allen C and Jaffray DA. Multimodal Contrast Agent for Combined Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging Applications. *Investigative Radiology* 41, 2006, 339-348. 40
9. Chithrani, DB; Dunne, M; Stewart, J., Allen, C; and Jaffray, DA. Cellular uptake and transport of gold nanoparticles incorporated in a liposomal carrier. *Nanomedicine* 2010;6:161-169.

【図 1 (A)】



【図 1 (B)】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/062122

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61N5/10 A61K49/00 A61B6/03
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)

A61N A61K A61B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/075961 A2 (HAINFELD JAMES [US]; SLATKIN DANIEL [US]) 18 September 2003 (2003-09-18)	18
Y	abstract; claims 1,2,3,8,13,14 page 10, line 16 - page 12, line 9 page 15, line 28 - page 17, line 19 page 23, line 15 - page 24, line 26 -----	1-17,19
X	WO 2009/049083 A1 (UNIV ST LOUIS [US]; LANZA GREGORY M [US]; WICKLINE SAMUEL A [US]; PAN) 16 April 2009 (2009-04-16) the whole document -----	18
X	US 2008/213189 A1 (LEE JIN HYUNG [US] ET AL) 4 September 2008 (2008-09-04) abstract paragraph [0054] - paragraph [0059] paragraph [0122] - paragraph [0124] ----- -/-	18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ 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 document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 October 2011

Date of mailing of the international search report

03/11/2011

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

Beck, Ewa

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/062122

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/046733 A1 (PHILIPS INTELLECTUAL PROPERTY [DE]; KONINKL PHILIPS ELECTRONICS NV [NL] 26 May 2005 (2005-05-26) the whole document	18
Y	US 2006/245537 A1 (BAKAI ANNEMARIE [DE] ET AL) 2 November 2006 (2006-11-02) abstract; claims 1,13,14	1-17,19
X	US 2008/089836 A1 (HAINFELD JAMES F [US]) 17 April 2008 (2008-04-17) the whole document	18
A		1-17
A	WO 2004/017814 A2 (UNIV TEXAS SYSTEM BOARD OF [US]; NAGHAVI MORTEZA [US]; CASSCELLS SAMUE) 4 March 2004 (2004-03-04) abstract paragraph [0019] - paragraph [0021]	1-17
A	WO 2008/096279 A1 (SPAGO IMAGING AB [SE]; UVDAL KAJSA [SE]) 14 August 2008 (2008-08-14) abstract; claims 1,6 page 14, line 31 - page 15, line 14	1-17
X	US 2007/031337 A1 (SCHULTE REINHARD [US]) 8 February 2007 (2007-02-08) abstract paragraph [0023] - paragraph [0035]	1,3,4, 9-12 2
Y	WO 2004/047923 A1 (ELEKTA AB [SE]; BROWN KEVIN JOHN [GB]) 10 June 2004 (2004-06-10) abstract page 4, last paragraph - page 5, paragraph 5	2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2011/062122**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

1. ☒ Claims Nos.: 20
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 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 fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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 and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/062122

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03075961	A2	18-09-2003	AU 2002351240 A1	22-09-2003
WO 2009049083	A1	16-04-2009	CN 101868180 A	20-10-2010
			EP 2209420 A1	28-07-2010
			US 2010297019 A1	25-11-2010
US 2008213189	A1	04-09-2008	NONE	
WO 2005046733	A1	26-05-2005	CN 1882364 A	20-12-2006
			EP 1687034 A1	09-08-2006
			JP 2007511503 A	10-05-2007
			US 2007258888 A1	08-11-2007
US 2006245537	A1	02-11-2006	CN 1853566 A	01-11-2006
			DE 102005018330 A1	26-10-2006
			JP 2006297095 A	02-11-2006
US 2008089836	A1	17-04-2008	NONE	
WO 2004017814	A2	04-03-2004	NONE	
WO 2008096279	A1	14-08-2008	AU 2008212556 A1	14-08-2008
			CA 2675631 A1	14-08-2008
			CN 101663050 A	03-03-2010
			EP 2121040 A1	25-11-2009
			EP 2121041 A1	25-11-2009
			WO 2008096280 A1	14-08-2008
			JP 2010518070 A	27-05-2010
			US 2010119458 A1	13-05-2010
			US 2010111859 A1	06-05-2010
			ZA 200905420 A	27-10-2010
US 2007031337	A1	08-02-2007	NONE	
WO 2004047923	A1	10-06-2004	AT 463281 T	15-04-2010
			AU 2003283551 A1	18-06-2004
			CN 1717267 A	04-01-2006
			EP 1572298 A1	14-09-2005
			GB 2395882 A	02-06-2004
			JP 4463688 B2	19-05-2010
			JP 2006507864 A	09-03-2006
			US 2004114718 A1	17-06-2004

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード (参考)

A 61 K 49/00

C

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74)代理人 100166028

弁理士 北谷 賢次

(72)発明者 トマス ラース アンドレセン

デンマーク国, デーコー 2 7 2 0 バンレーセ, クローゲブイエルウ 6 8

(72)発明者 モルテン アルブレシュトセン

デンマーク国, デーコー 2 9 2 0 シャルロッテンランド, ホルゲルスバイ 1 5

Fターム(参考) 4C082 AA01 AC02 AC03 AC05 AE01 AJ07 AJ08 AJ13 AJ14 AR02

4C085 HH03 HH05 HH07 JJ03 JJ05 KA28 KA29 KB03 KB05 KB07

KB08 KB74 LL18