(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2021-519324
(P2021-519324A)
(43)公表日　令和3年8月10日(2021.8.10)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 47/69	***(2017.01)***	A61K	47/69		4C076
A61K 39/395	***(2006.01)***	A61K	39/395	D	4C084
A61K 38/43	***(2006.01)***	A61K	39/395	N	4C085
A61K 9/12	***(2006.01)***	A61K	38/43		
A61P 25/28	***(2006.01)***	A61K	9/12		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 24 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2020-552322 (P2020-552322)
(86)(22)出願日　平成31年3月28日 (2019.3.28)
(85)翻訳文提出日　令和2年11月9日 (2020.11.9)
(86)国際出願番号　PCT/US2019/024713
(87)国際公開番号　WO2019/191518
(87)国際公開日　令和1年10月3日 (2019.10.3)
(31)優先権主張番号　62/650,239
(32)優先日　平成30年3月29日 (2018.3.29)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

(71)出願人　520368585
マイクロヴァスキュラー　ゼラピューティクス　エルエルシー
ＭＩＣＲＯＶＡＳＣＵＬＡＲ　ＴＨＥＲＡＰＥＵＴＩＣＳ　ＬＬＣ
アメリカ合衆国　アリゾナ州　８５７１９　ツーソン　１８番　ストリート　１６３５　イー
１６３５　Ｅ，１８ｔｈ　Ｓｔｒｅｅｔ，Ｔｕｃｓｏｎ，ＡＺ　８５７１９（ＵＳ）
(74)代理人　100095577
弁理士　小西　富雅

最終頁に続く

(54)【発明の名称】アルツハイマー病を検出および治療する組成物および方法

(57)【要約】
本発明は、アルツハイマー病、または関連する疾患および状態の検出および治療に有用な診断および／または治療用リガンドで標識されたマイクロバブルおよび／またはナノ液滴、ならびにそれらの調製方法および使用方法を提供する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ベータアミロイドへの結合親和性を有する１つまたは複数の第１のリガンド、およびベータアミロイドを分解または分解以外で代謝することができる１つまたは複数の第２のリガンドに接合されているマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴。
【請求項２】
前記第２のリガンドは、酵素または抗体、あるいはそれらの断片である、請求項１に記載のマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴。
【請求項３】
前記第１のリガンドは、図１に列挙される化合物またはその誘導体である、請求項１または２に記載のマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴。
【請求項４】
各々の前記マイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴は、複数の前記第１のリガンドに接合されている、請求項１～３のいずれか一項に記載のマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴。
【請求項５】
各々の前記マイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴は、複数の前記第２のリガンドに接合されている、請求項１～４のいずれか一項に記載のマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴。
【請求項６】
前記第１のリガンドは、ＰＥＧリンカーを介して前記マイクロスケールまたはナノスケールの気泡に接合されている、請求項１～５のいずれか一項に記載のマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴。
【請求項７】
前記第２のリガンドは、ＰＥＧリンカーを介して前記マイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴に接合されている、請求項１～６のいずれか一項に記載のマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴。
【請求項８】
前記マイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴は、気体材料で満たされている、請求項１～７のいずれか一項に記載のマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴。
【請求項９】
前記気体材料は、フッ素化ガスを含む、請求項８に記載のマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴。
【請求項１０】
前記フッ素化ガスは、パーフルオロメタン、パーフルオロエタン、パーフルオロプロパン、パーフルオロシクロプロパン、パーフルオロブタン、パーフルオロシクロブタン、パーフルオロペンタン、パーフルオロシクロペンタン、パーフルオロヘキサン、パーフルオロシクロヘキサン、およびそれらの２つ以上の混合物から選択される、請求項９に記載のマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴。
【請求項１１】
前記フッ素化ガスは、パーフルオロプロパン、パーフルオロシクロプロパン、パーフルオロブタン、パーフルオロシクロブタン、パーフルオロペンタン、パーフルオロシクロペンタン、およびそれらの２つ以上の混合物から選択される、請求項９または１０に記載のマイクロスケールまたはナノスケールの気泡。
【請求項１２】
前記マイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴は、フィルム形成材料でコーティングされている、請求項１～１１のいずれか一項に記載のマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴。
【請求項１３】

前記フィルム形成材料は、１つまたは複数の脂質を含む、請求項１２に記載のマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴。
【請求項１４】
前記脂質は、リン脂質またはリン脂質の混合物を含む、請求項１３に記載のマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴。
【請求項１５】
前記マイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴は、約０．５から約１０ミクロンの範囲のマイクロスケールのサイズを有する、請求項１～１４のいずれか一項に記載のマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴。
【請求項１６】
前記マイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴は、約１２０ｎｍから約２８０ｎｍの範囲のナノスケールのサイズを有する、請求項１～１４のいずれか一項に記載のマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴。
【請求項１７】
前記マイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴は、ベータアミロイドおよびタウタンパク質の両方を分解または分解以外で代謝することができる、請求項１～１６のいずれか一項に記載のマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴。
【請求項１８】
請求項１～１７のいずれか一項に記載のマイクロスケールの気泡および／またはナノスケールの液滴を含む水性エマルジョンまたは懸濁液。
【請求項１９】
前記エマルジョンまたは懸濁液は、均質化された形態である、請求項１８に記載のエマルジョンまたは懸濁液。
【請求項２０】
前記エマルジョンまたは懸濁液はさらに、薬学的に許容され得る賦形剤、担体、または希釈剤を含む、請求項１８または１９に記載のエマルジョンまたは懸濁液。
【請求項２１】
タウタンパク質への結合親和性を有する１つまたは複数の第１のリガンド、およびタウタンパク質を分解または分解以外で代謝することができる１つまたは複数の第２のリガンドに接合されているマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴。
【請求項２２】
前記第２のリガンドは、酵素または抗体、あるいはそれらの断片である、請求項２１に記載のマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴。
【請求項２３】
前記第１のリガンドは、図１に列挙される化合物またはその誘導体である、請求項２０または２１に記載のマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴。
【請求項２４】
各々の前記マイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴は、複数の前記第１のリガンドに接合されている、請求項２１～２３のいずれか一項に記載のマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴。
【請求項２５】
各々のマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴は、複数の前記第２のリガンドに接合されている、請求項２１～２４のいずれか一項に記載のマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴。
【請求項２６】
前記第１のリガンドは、ＰＥＧリンカーを介して前記マイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴に接合されている、請求項２１～２５のいずれか一項に記載のマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴。
【請求項２７】
前記第２のリガンドは、ＰＥＧリンカーを介して前記マイクロスケールまたはナノスケ

ールの気泡／液滴に接合されている、請求項２１～２６のいずれか一項に記載のマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴。
【請求項２８】
前記マイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴は、気体材料で満たされている、請求項２１～２７のいずれか一項に記載のマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴。
【請求項２９】
前記気体材料は、フッ素化ガスを含む、請求項２８に記載のマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴。
【請求項３０】
前記フッ素化ガスは、パーフルオロメタン、パーフルオロエタン、パーフルオロプロパン、パーフルオロシクロプロパン、パーフルオロブタン、パーフルオロシクロブタン、パーフルオロペンタン、パーフルオロシクロペンタン、パーフルオロヘキサン、パーフルオロシクロヘキサン、およびそれらの２つ以上の混合物から選択される、請求項２９に記載のマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴。
【請求項３１】
前記フッ素化ガスは、パーフルオロプロパン、パーフルオロシクロプロパン、パーフルオロブタン、パーフルオロシクロブタン、パーフルオロペンタン、パーフルオロシクロペンタン、およびそれらの２つ以上の混合物から選択される、請求項２９または３０に記載のマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴。
【請求項３２】
前記マイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴は、フィルム形成材料でコーティングされた、請求項２１～３１のいずれかに記載のマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴。
【請求項３３】
前記フィルム形成材料は、１つまたは複数の脂質を含む、請求項３２に記載のマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴。
【請求項３４】
前記脂質は、リン脂質またはリン脂質の混合物を含む、請求項３３に記載のマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴。
【請求項３５】
前記マイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴は、約０．５から約１０ミクロンの範囲のマイクロスケールのサイズを有する、請求項２１～３４のいずれか一項に記載のマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴。
【請求項３６】
前記マイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴は、約１２０ｎｍから約２８０ｎｍの範囲のナノスケールのサイズを有する、請求項２１～３４のいずれか一項に記載のマイクロスケールまたはナノスケールの気泡。
【請求項３７】
前記マイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴は、ベータアミロイドおよびタウタンパク質の両方を分解または分解以外で代謝することができる、請求項２１～３６のいずれか一項に記載のマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴。
【請求項３８】
請求項２１～３７のいずれかに記載のマイクロスケールの気泡および／またはナノスケールの液滴を含む水性エマルジョンまたは懸濁液。
【請求項３９】
前記エマルジョンまたは懸濁液は、均質化された形態である、請求項３８に記載のエマルジョンまたは懸濁液。
【請求項４０】
前記エマルジョンまたは懸濁液はさらに、薬学的に許容され得る賦形剤、担体、または

希釈剤を含む、請求項３８または３９に記載のエマルジョンまたは懸濁液。
【請求項４１】
ベータアミロイドを検出するための方法であって、
それを必要とする対象に、請求項１～２０のいずれか一項に記載のマイクロスケールの気泡および／またはナノスケールの液滴を含む水性エマルジョンまたは懸濁液を投与するステップ、
および
その対象の一部を画像化して、ベータアミロイドの存在を検出するステップ
を含む方法。
【請求項４２】
タウタンパク質を検出するための方法であって、
それを必要とする対象に、請求項２１～４０のいずれか一項に記載のマイクロスケールの気泡および／またはナノスケールの液滴を含む水性エマルジョンまたは懸濁液を投与するステップ、および
その対象の一部を画像化して、タウタンパク質の存在を検出するステップ
を含む方法。
【請求項４３】
アルツハイマー病を診断または評価するための方法であって、
それを必要とする対象に、請求項１～４０のいずれかに記載のマイクロスケールの気泡および／またはナノスケールの液滴を含む水性エマルジョンまたは懸濁液を投与するステップ、および
その対象の一部を画像化して、その対象におけるアルツハイマー病を診断または評価するステップ
を含む方法。
【請求項４４】
アルツハイマー病を治療するための方法であって、
それを必要とする対象に、請求項１～４０のいずれかに記載のマイクロスケールの気泡および／またはナノスケールの液滴を含む水性エマルジョンまたは懸濁液を投与するステップ、および
その対象の脳の標的領域に超音波を適用するステップ
を含む方法。
【請求項４５】
ベータアミロイド凝集体を破壊するかまたは減少させるための方法であって、
それを必要とする対象に、請求項１～４０のいずれかのマイクロスケールの気泡および／またはナノスケールの液滴を含む水性エマルジョンまたは懸濁液を投与するステップ、および
ベータアミロイド凝集体を有するその対象の器官の標的領域に超音波を適用することによって、それらのベータアミロイド凝集体を破壊するかまたは減少させるステップ
を含む方法。
【請求項４６】
タウタンパク質凝集体を破壊するかまたは減少させるための方法であって、
それを必要とする対象に、請求項１～４０のいずれかのマイクロスケールの気泡および／またはナノスケールの液滴を含む水性エマルジョンまたは懸濁液を投与するステップ、および
タウタンパク質凝集体を有するその対象の器官の標的領域に超音波を適用することによって、それらのタウタンパク質凝集体を破壊するかまたは減少させるステップ
を含む方法。
【請求項４７】
前記フッ素化ガスは、パーフルオロプロパン、パーフルオロブタン、またはパーフルオロペンタン、またはそれらの２つ以上の混合物を含む、請求項４１～４６のいずれか一項

に記載の方法。
【請求項４８】
前記マイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴は、約０．５から約１０ミクロンの範囲のマイクロスケールのサイズを有する、請求項４１～４６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４９】
前記マイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴は、約１２０ｎｍから約２８０ｎｍの範囲のナノスケールのサイズを有する、請求項４１～４６のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
優先権主張および関連する特許出願
この出願は、２０１８年3月２９日に出願された米国仮出願シリアル番号６２／６５０，２３９の優先権の利益を主張し、その全内容は参照によりその全体が本明細書に援用される。
【背景技術】
【０００２】
本発明は、医薬組成物およびそれらの調製方法、ならびに診断および治療における使用方法に関する。より具体的には、本発明は、アルツハイマー病、または関連する疾患および状態の検出および治療に有用な診断および／または治療用リガンドで標識されたマイクロバブルおよび／またはナノ液滴、ならびにそれらのエマルジョン、ならびにそれらの調製方法および使用方法に関する。
【０００３】
発明の背景
アルツハイマー病（ＡＤ）は、不可逆的で進行性の神経変性疾患であり、記憶力と思考力、そして最終的には最も単純なタスクを実行する能力を徐々に破壊する。世界中で３０００万人以上がＡＤに罹患している。ＡＤは、現在、米国で６番目に多い死因としてランク付けされており、認知症の症例の６０％から７０％を占めている。症状に悩まされる病気の進行した状態の患者は、言語の問題、失見当識、家族や社会からの離脱、およびその他の行動上の問題を含むことが多く、結果的に身体機能の喪失につながり、最終的には死に至る。ＡＤを正しく診断するには、徹底的な検査と一連の臨床評価および除去を含むプロセスが必要とされる。
【０００４】
ＡＤの特徴は、脳内の神経細胞（ニューロン）間のアミロイド斑の蓄積である。ベータアミロイド（またはアミロイドベータ、Ａβ）は、ＡＤ患者の脳内に見られるアミロイドプラークの主成分としてＡＤに関与する、３６～４３のアミノ酸のペプチドである。ベータアミロイドは、ベータセクレターゼとガンマセクレターゼによって切断されてベータアミロイドを生成する、アミロイド前駆体タンパク質（ＡＰＰ）に由来する。ベータアミロイド分子は凝集して、いくつかの形態で存在する可能性のある柔軟な可溶性オリゴマーを形成し得る。研究によると、特定の誤って折り畳まれたオリゴマーは、他のベータアミロイド分子も誤って折り畳まれたオリゴマー形態をとるように誘導し、プリオン感染に似た連鎖反応を引き起こす可能性があることが示されている。前記オリゴマーは神経細胞に対して毒性がある。（Ｈａｍｌｅｙ ２０１２ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗｓ １１２（１０）：５１４７－９２；Ｈａａｓｓら ２００７ Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ ８（２）：１０１－１２。）
【０００５】
ＡＤに関係する別のタンパク質はタウタンパク質（またはτタンパク質）であり、これもそのようなプリオン様の誤って折り畳まれたオリゴマーを形成する。研究によると、誤

って折り畳まれたベータアミロイドはタウを誤って折り畳む可能性があることが示されている。ＡＤの病状は、不完全になり、もはや微小管を適切に安定化させなくなったタウタンパク質に関連している。（Ｎｕｓｓｂａｕｍら　２０１３　Ｐｒｉｏｎ．（１）：１４－９；Ｐｕｌａｗｓｋｉら　２０１２　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　ａｎｄ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１６６（７）：１６２６－４３。）

【０００６】

ＡＤの進行を遅らせるかまたは止める薬剤は明確に示されていない。アセチルコリンエステラーゼ阻害剤やＮ－メチル－Ｄ－アスパラギン酸受容体（ＮＭＤＡ）の受容体拮抗薬を含む、ＡＤの認知問題を治療するためのいくつかの薬剤が現在使用されているが、それらの使用による利点は非常に限定的である。

【０００７】

したがって、ＡＤのための新規で安全かつ信頼性の高い診断ツールおよび治療薬に対する緊急の必要性および重大な課題が残されている。

【発明の概要】

【０００８】

本発明は、新規なマイクロバブルおよびナノ液滴、ならびにそれらのエマルジョンの発見に部分的に基づいており、それらは、超音波によるＡＤの改善された検出のために、ベータアミロイドおよび／またはタウタンパク質を標的とするように設計されている。本発明はまた、新規なマイクロバブルおよび／またはナノ液滴、ならびにそれらのエマルジョンの発見に部分的に基づいており、超音波によるＡＤの改善された治療のために、ベータアミロイドおよび／またはタウタンパク質を標的とするように設計されている。本発明はさらに、医薬組成物ならびにその調製方法および使用方法に関する。

【０００９】

標的化マイクロバブルおよび／またはナノ液滴は、音響的に活性化することができ、それらは少なくとも１つ、好ましくは２つ（またはそれ以上）のリガンドを有する。第１のリガンドは、検出および局在化の目的でベータアミロイドまたはタウタンパク質に結合するモチーフである。第２のリガンドは、第２の異なるリガンドおよび／またはベータアミロイドまたはタウタンパク質を分解するための酵素を含み得る。本発明は、ＡＤを治療するために、脳からの誤って折り畳まれたおよび／または凝集したベータアミロイドおよび／またはタウタンパク質の流出を検出しかつ増加させる。

【００１０】

一局面では、本発明は、概して、ベータアミロイドへの結合親和性を有する１つまたは複数の第１のリガンドおよびベータアミロイドを分解するか分解以外で代謝することができる１つまたは複数の第２のリガンドが接合したマイクロスケールの気泡またはナノスケールの液滴（「マイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴」と呼ぶこともある）に関する。

【００１１】

別の局面において、本発明は、概して、タウタンパク質への結合親和性を有する１つまたは複数の第１のリガンドおよびタウタンパク質を分解するか分解以外で代謝することができる１つまたは複数の第２のリガンドが接合したマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴に関する。

【００１２】

さらに別の局面では、本発明は、概して、開示されたマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴を含む水性エマルジョンまたは懸濁液に関する。

【００１３】

さらに別の局面において、本発明は、概して、ベータアミロイドを検出するための方法に関する。この方法は、それを必要とする対象に、本明細書に開示されるマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴を含む水性エマルジョンまたは懸濁液を投与するステップ、およびその対象の一部を画像化して、ベータアミロイドの存在を検出するステップを含む。

【００１４】
さらに別の局面において、本発明は、概して、タウタンパク質を検出するための方法に関する。この方法は、それを必要とする対象に、本明細書に開示されるマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴を含む水性エマルジョンまたは懸濁液を投与するステップ、およびその対象の一部を画像化して、タウタンパク質の存在を検出するステップ、を含む。
【００１５】
さらに別の局面では、本発明は、概して、アルツハイマー病のリスクを診断または評価するための方法に関する。この方法は、それを必要とする対象に、本明細書に開示されるマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴を含む水性エマルジョンまたは懸濁液を投与するステップ、およびその対象の一部を画像化して、その対象におけるアルツハイマー病を診断または評価するステップ、を含む。
【００１６】
さらに別の局面において、本発明は、概して、アルツハイマー病を治療するための方法に関する。この方法は、それを必要とする対象に、本明細書に開示されるマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴を含む水性エマルジョンまたは懸濁液を投与するステップ、およびその対象の脳の標的領域に超音波を適用するステップを含む。
【図面の簡単な説明】
【００１７】
【図１ａ】図１ａは、凝集したタウ凝集体またはＡβプラークに結合するリガンドの例示的な化学構造を示す。
【図１ｂ】図１ｂは、凝集したタウ凝集体またはＡβプラークに結合するリガンドの例示的な化学構造を示す。
【００１８】
【図２】図２は、反応性官能基、ＤＳＰＥ－ＰＥＧｎ－ＮＨＳエステル（Ａ）およびＤＳＰＥ－ＰＥＧｎ－ＤＢＣＯを有するペグ化リン脂質の例示的な化学構造を示す。
【００１９】
【図３】図３は、タウ凝集体へのまたはＡβプラークおよびリン脂質への結合親和性を有するリガンド間の例示的な化学反応を示す。小分子中のアミン基はＮＨＳ－エステル基と反応してアミドリンカー（Ａ）を生成し、小分子中のアジド基は銅を含まないクリックケミストリーを介してジベンジルシクロオクチン（ＤＢＣＯ）中のアルキン基と反応してトリアゾールリンカー（Ｂ）を生成する。
【００２０】
【図４】図４は、例示的なＤＳＰＥ－ＰＥＧｎ－リガンド結合が、マイクロバブルの製剤に組み込まれて、アルツハイマー病におけるタウ凝集体またはＡβプラークの検出のための標的化マイクロバブルを生成することを示す。
【００２１】
【図５】図５は、例示的なタンパク質、例えばインスリン分解酵素（ＩＤＥ）、ネプリライシン（ＮＥＰ）、エンドセリン変換酵素（ＥＣＥ）、アンジオテンシン変換酵素（ＡＣＥ）、プラスミン、マトリックスメタロプロテナーゼ（ＭＭＰ）、ホスファターゼ、アルカリホスファターゼ（ＡＰ）ならびにタウおよびアミロイドベータに対する抗体は、リジンを介してＤＳＰＥ－ＰＥＧｎ－ＮＨＳエステルに接合するか、ＤＳＰＥ－ＰＥＧｎ－マレイミドに接合してそれらの構造内のシステインアミノ酸に接合することを示す。
【００２２】
【図６】図６は、例示的なＤＳＰＥ－ＰＥＧｎ－リガンドおよびＤＳＰＥ－ＰＥＧｎ－酵素が、マイクロバブルの製剤に組み込まれて、酵素を担持する標的化マイクロバブルを生成することを示す。ＭＢから作られたナノスケールの液滴は、タウ凝集体またはＡβプラークが形成される領域に酵素を局在化させ、これらのタンパク質の分解および除去を加速させる。
【００２３】

【図７】図７は、標的マイクロバブルの例示的なサイズ分析を示す。
【００２４】
【図８】図８は、標的ナノ液滴の例示的なサイズ分析を示す。
【００２５】
【図９】図９は、タウ凝集体に対するＭＢ、標的ＭＢおよび標的ナノ液滴の効果に関する例示的なデータを示す。ＭＢはマイクロバブルのみの使用を意味し、ＭＢ＋ＵＳは超音波と共にＭＢを使用したことを意味し、ｔ２ＣＭＢ＋ＵＳは化合物２Ｃおよび超音波と共に標的ＭＢを使用したことを意味する。４Ｃと４Ａに関しても同様。ｔ２ＣＮＤ＋ＵＳは化合物２Ｃと共に標的ＮＤを使用したことを意味する（ｎ＝３　試料／条件、バーは平均であり、エラーバーは標準誤差である）。
【発明を実施するための形態】
【００２６】
本発明は、超音波を用いるアルツハイマー病の優れた検出および治療のために、ベータアミロイドおよびタウタンパク質を標的とするマイクロおよび／またはナノのバブル／液滴の新規な構築物ならびにそれらのエマルジョンを提供する。
【００２７】
超音波は、血液脳関門を開くために使用されている。（米国特許番号５，７５２，５１５。）マイクロバブルはキャビテーションの閾値を下げ、血液脳関門を開くのを容易にする。アルツハイマー病のモードでは、マイクロバブルは超音波と共に使用されて、血液脳関門を開き、ベータアミロイドに対する抗体の侵入を促進する。（Ｊｏｒｄａｏ、ら　２０１０　ＰｌｏＳ　ｏｎｅ　５．５、ｅｌ０５４９。）
【００２８】
一局面では、本発明は、概して、ベータアミロイドへの結合親和性を有する１つまたは複数の第１のリガンド、およびベータアミロイドを分解または分解以外で代謝することができる１つまたは複数の第２のリガンドに接合されているマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴に関する。
【００２９】
別の局面において、本発明は、概して、タウタンパク質への結合親和性を有する１つまたは複数の第１のリガンド、およびタウタンパク質を分解または分解以外で代謝することができる１つまたは複数の第２のリガンドに接合されているマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴に関する。
【００３０】
特定の実施形態において、前記第１のリガンドは、図１に列挙される化合物またはその誘導体である。
【００３１】
特定の実施形態において、前記第２のリガンドは、酵素または抗体、あるいはそれらの断片である。
【００３２】
特定の実施形態において、各マイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴は、複数の前記第１のリガンドに接合されている。
【００３３】
特定の実施形態において、各マイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴は、複数の前記第２のリガンドに接合されている。
【００３４】
特定の実施形態において、前記第１のリガンドは、ＰＥＧリンカーを介して前記マイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴に接合されている。
【００３５】
特定の実施形態において、前記第２のリガンドは、ＰＥＧリンカーを介して前記マイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴に接合されている。
【００３６】

特定の実施形態では、前記マイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴は、気体および／または液体の材料で満たされている。特定の実施形態では、前記マイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴は、気体材料で満たされている。特定の実施形態では、前記マイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴は、液体材料で満たされている。

【００３７】

特定の実施形態では、前記気体材料は、フッ素化ガスを含む。本明細書で使用される「フッ素化ガス」という用語は、水素、フッ素および炭素を含むハイドロフルオロカーボンを指すか、または炭素およびフッ素原子のみを含む化合物（パーフルオロカーボンとしても知られる）、ならびに硫黄およびフッ素を含む化合物を指す。本発明の文脈において、この用語は、それらの分子構造が炭素とフッ素、または硫黄とフッ素からなり、かつ常温常圧で気体である材料を指す場合がある。

【００３８】

特定の実施形態では、前記フッ素化ガスは、パーフルオロメタン、パーフルオロエタン、パーフルオロプロパン、パーフルオロシクロプロパン、パーフルオロブタン、パーフルオロシクロブタン、パーフルオロペンタン、パーフルオロシクロペンタン、パーフルオロヘキサン、パーフルオロシクロヘキサン、およびそれらの２つ以上の混合物から選択される。

【００３９】

特定の実施形態では、前記フッ素化ガスは、パーフルオロプロパン、パーフルオロシクロプロパン、パーフルオロブタン、パーフルオロシクロブタン、パーフルオロペンタン、パーフルオロシクロペンタン、およびそれらの２つ以上の混合物から選択される。

【００４０】

特定の実施形態では、前記気体材料はさらに、適切なパーセンテージの非フッ素化ガスまたはガス混合物、例えば、約２％から約２０％の空気または窒素（例えば、約５％から約２０％、約１０％から約２０％、約１５％から約２０％、約２％から約１５％、約２％から約１０％、約２％から約５％の空気または窒素）を含む。

【００４１】

特定の実施形態では、前記マイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴内のフルオロカーボンは、凝縮した、すなわち液体状態で存在する。

【００４２】

特定の実施形態において、前記マイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴は、フィルム形成材料でコーティングされている。特定の実施形態では、前記フィルム形成材料は、１つまたは複数の脂質を含む。特定の実施形態では、前記脂質は、リン脂質またはリン脂質の混合物を含む。

【００４３】

任意の適切な脂質を利用することができる。前記脂質の脂質鎖は、約１０から約２４（例えば、約１０から約２０、約１０から約１８、約１２から約２０、約１４から約２０、約１６から約２０、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４）の炭素の長さで変わり得る。より好ましくは、炭素鎖の長さは約１６から約１８である。

【００４４】

いくつかの実施形態において、本発明のマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴は、ベータアミロイド、タウタンパク質の両方を分解または分解以外で代謝することができ、または分解と分解以外の代謝の両方が可能である。

【００４５】

いくつかの実施形態では、前記マイクロスケールまたはナノスケールの気泡は、約１０ｎｍから約１０μｍ（例えば、約１０ｎｍから約５μｍ、約１０ｎｍから約１μｍ、約１０ｎｍから５００ｎｍ、約１０ｎｍから約１００ｎｍ、約５０ｎｍから約１０μｍ、約１００ｎｍから約１０μｍ、約１μｍから約１０μｍまで）の範囲の直径を有する。いくつ

かの実施形態では、前記マイクロスケールまたはナノスケールの粒子または気泡は、約１０ｎｍから約１００ｎｍの直径を有する。いくつかの実施形態では、前記マイクロスケールまたはナノスケールの粒子または気泡は、約１００ｎｍから約１μｍの直径を有する。いくつかの実施形態では、前記マイクロスケールまたはナノスケールの粒子または気泡は、約１μｍから約１０μｍの直径を有する。

【００４６】

本明細書で使用される場合、「マイクロスケール」および「ナノスケール」という用語は、それぞれ、マイクロメートルおよびナノメートル範囲のマイクロバブルサイズを指す。

【００４７】

本明細書に開示される方法の特定の実施形態において、前記マイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴は、約０．５μｍから約１０μｍ（例えば、約１μｍから約１０μｍ、約２μｍから約１０μｍ、約５μｍから約１０μｍ、約０．５μｍから約５μｍまで、約０．５μｍから約２μｍ、約１μｍから約５μｍまで）の範囲のマイクロスケールのサイズを有する。

【００４８】

本明細書に開示される方法の特定の実施形態において、前記マイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴は、約１００ｎｍから約８００ｎｍ（例えば、約１００ｎｍから約５００ｎｍ、約１００ｎｍから約３００ｎｍ、約１２０ｎｍから約２８０ｎｍまで）の範囲のナノスケールのサイズを有する。

【００４９】

別の局面では、本発明は、概して、開示されたマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴を含む水性エマルジョンまたは懸濁液に関する。

【００５０】

本明細書で使用される場合、「エマルジョン」は、ナノメートルからミクロンまでのサイズで変化し得る液滴の形態の別のものに分散された少なくとも１つの非混和性液体からなる不均一系を指す。エマルジョンの安定性は大きく異なり、エマルジョンが分離するまでの時間は数秒から数年になり得る。懸濁液は、バルク液相中の固体粒子または液滴からなり得る。一例として、ドデカフルオロペンタンのエマルジョンは、リン脂質またはフルオロ界面活性剤を用いて調製することができ、複合体は、エマルジョンの安定化に使用される界面活性剤に対して、約０．１モルパーセントから約１モルパーセントの比率で、さらには５モルパーセントの比率でもエマルジョンに組み込まれ得る。

【００５１】

特定の実施形態では、前記エマルジョンまたは懸濁液はさらに、薬学的に許容され得る賦形剤、担体、または希釈剤を含む。各賦形剤、担体、または希釈剤は、前記エマルジョンまたは懸濁液の他の成分と適合性があり、かつ患者に有害ではないという意味で「許容され得る」ものでなければならない。薬学的に許容され得る賦形剤、担体、または希釈剤として役立つことができる材料のいくつかの例には、通常の生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、プロピレングリコール、グリセロールおよびポリエチレングリコール、例えばＰＥＧ４００またはＰＥＧ３３５０ＭＷが含まれるが、これらに限定されない。

【００５２】

特定の実施形態では、前記エマルジョンまたは懸濁液は均質化された形態である。

【００５３】

本明細書で使用される場合、「均質化された」形態は、エマルジョンまたは懸濁液が激しい混合の形態で調製されていることを指す。均質化は、２つの相互に不溶性の液体の混合物を全体にわたって同一にするために使用されるいくつかのプロセスのいずれかによって達成することができる。これは一般に、一方の液体をもう一方の液体全体に均一に分布した非常に小さな粒子からなる状態に変えることによって達成される。均質化は、通常、機器、例えばｕｌｔｒａ　ｔｕｒｒａｘ　ｔｙｐｅ、超音波プローブミキサー／ホモジナイザー、または、高圧で、その内部サイズを調整できる小さな開口部またはバルブに混合

物の成分を強制的に通すことにより前記混合物の成分を強制的に乳化または懸濁させる、高圧ホモジナイザーを使用して行われる。

【００５４】

さらに別の局面において、本発明は、概して、ベータアミロイドを検出するための方法に関する。この方法は、それを必要とする対象に、本明細書に開示されるマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴を含む水性エマルジョンまたは懸濁液を投与するステップ、およびその対象の一部を画像化して、ベータアミロイドの存在を検出するステップ、を含む。

【００５５】

さらに別の局面において、本発明は、概して、タウタンパク質を検出するための方法に関する。この方法は、それを必要とする対象に、本明細書に開示されるマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴を含む水性エマルジョンまたは懸濁液を投与するステップ、およびその対象の一部を画像化して、タウタンパク質の存在を検出するステップ、を含む。

【００５６】

さらに別の態様では、本発明は、概して、アルツハイマー病のリスクを診断または評価するための方法に関する。この方法は、それを必要とする対象に、本明細書に開示されるマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴を含む水性エマルジョンまたは懸濁液を投与するステップ、およびその対象の一部を画像化して、その対象のアルツハイマー病を診断または評価するステップ、を含む。

【００５７】

さらに別の局面において、本発明は、概して、アルツハイマー病を治療するための方法に関する。この方法は、それを必要とする対象に、本明細書に開示されるマイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴を含む水性エマルジョンまたは懸濁液を投与するステップ、およびその対象の脳の標的領域に超音波を適用するステップ、を含む。

【００５８】

さらに別の局面において、本発明は、概して、ベータアミロイド凝集体を破壊するかまたは減少させるための方法に関する。この方法は、それを必要とする対象に、本明細書に開示されるマイクロスケールの気泡および／またはナノスケールの液滴を含む水性エマルジョンまたは懸濁液を投与するステップ、およびベータアミロイド凝集体を有するその対象の器官の標的領域に超音波を適用することによって、それらのベータアミロイド凝集体を破壊するかまたは減少させるステップ、を含む。

【００５９】

さらに別の局面において、本発明は、概して、タウタンパク質凝集体を破壊するかまたは減少させるための方法に関する。この方法は、それを必要とする対象に、本明細書に開示されるマイクロスケールの気泡および／またはナノスケールの液滴を含む水性エマルジョンまたは懸濁液を投与するステップ、およびタウタンパク質凝集体を有するその対象の器官の標的領域に超音波を適用することによって、それらのタウタンパク質凝集体を破壊するかまたは減少させるステップ、を含む。

【００６０】

特定の実施形態では、前記フッ素化ガスは、パーフルオロプロパン、パーフルオロシクロプロパン、パーフルオロブタン、パーフルオロシクロブタン、パーフルオロペンタン、パーフルオロシクロペンタン、およびそれらの２つ以上の混合物から選択される。本明細書に開示される方法の特定の実施形態では、前記フッ素化ガスは、パーフルオロプロパン、パーフルオロブタン、またはペルフルオロペンタン、またはそれらの２つ以上の混合物を含む。

【００６１】

本明細書に開示される方法の特定の実施形態において、前記マイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴は、約０．５μｍから約１０μｍ（例えば、約１μｍから約１０μｍ、約２μｍから約１０μｍ、約５μｍから約１０μｍ、約０．５μｍから約５μｍ、

約０．５μｍから約２μｍ、約１μｍから約５μｍまで）の範囲のマイクロスケールのサイズを有する。

【００６２】

本明細書に開示される方法の特定の実施形態において、前記マイクロスケールまたはナノスケールの気泡／液滴は、約１００ｎｍから約８００ｎｍ（例えば、約１００ｎｍから約５００ｎｍ、約１００ｎｍから約３００ｎｍ、約１２０ｎｍから約２８０ｎｍまで）の範囲のナノスケールのサイズを有する。

【００６３】

本明細書で使用される場合、「対象」および「患者」という用語は、本明細書では互換的に使用され、生きている動物（ヒトまたは非ヒト）を指す。前記対象は哺乳動物であり得る。「哺乳動物」または「哺乳類」という用語は、分類学的な分類の哺乳動物内の任意の動物を指す。哺乳動物は、ヒトまたは非ヒト哺乳動物、例えば、イヌ、ネコ、ブタ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ラット、およびマウスであり得る。「対象」という用語は、疾患または状態に関して完全に正常であるか、またはすべての点で正常である個体を排除するものではない。

【００６４】

本明細書で使用される場合、疾患または障害の「治療」または疾患または障害を「治療する」という用語は、そのような状態、またはそのような疾患または状態の１つまたは複数の症状が発生する前または後に、それまたはそれらを軽減、遅延、または改善する方法を指す。治療は、疾患および／または根底にある病状の１つまたは複数の影響または症状に向けられ得る。前記治療は任意の軽減であり得、そしてその疾患またはその疾患の症状の完全な除去であってもよいが、これに限定されない。同等の未治療対照と比較して、そのような軽減または予防の程度は、任意の標準的な手法によって測定されるように、少なくとも５％、１０％、２０％、４０％、５０％、６０％、８０％、９０％、９５％、または１００％である。

【００６５】

図１～５に示されるように、ベータアミロイドおよび／またはタウタンパク質に結合する１つまたは複数のリガンドが選択される。前記リガンドは、二官能性スペーサー、好ましくはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）基に結合し、前記ＰＥＧ基は、好ましくは、約１，０００から約１０，０００ダルトン（例えば、約２０００から約１０，０００、約３，０００から約１０，０００ダルトン、約４，０００から約１０，０００ダルトン、約１，０００から約８，０００ダルトン、約１，０００から約６，０００ダルトン、約３，０００から約７，０００ダルトン、約４，０００から約６，０００ダルトン）およびより好ましくは約５，０００ダルトンの範囲の数平均分子量（ＭＷ）を有する。

【００６６】

酵素または抗体は第２のリガンドとして使用することができる。好ましい酵素は、ベータアミロイドおよび／またはタウタンパク質の代謝を助ける。前記第２のリガンドも、好ましくは、二官能性スペーサー、好ましくはＰＥＧを介して結合し、また、前記ＰＥＧは約１，０００から約１０，０００ダルトン（例えば、約２０００から約１０，０００、約３０００から約１０，０００ダルトン、約１，０００から６，０００ダルトン、約１，０００から約５，０００ダルトン、約１，０００から約４，０００ダルトン）、より好ましくは約１，０００から約２，０００ダルトンのＭＷを有する。

【００６７】

図２～５に示されるように、前記ＰＥＧは脂質アンカー、好ましくはリン脂質に共有結合している。

【００６８】

特定の実施形態では、前記リン脂質組成物は、ジパルミトイルホスファチジルコリン（「ＤＰＰＣ」）、リン脂質１を含む。ＤＰＰＣは双性イオン化合物であり、実質的に中性のリン脂質である。特定の実施形態において、前記リン脂質組成物は、ポリヒドロキシヘッド基、および／またはNa^+、K^+、Li^+、およびNH_4^+対イオンを有する、３５

０ダルトンを超えるヘッド基を含む第２のリン脂質２を含む。特定の実施形態では、前記リン脂質２は、ナトリウムカチオンおよびホスホリル部分に結合したグリセロールヘッド基を含むリン脂質３を含む。リン脂質４は、アンモニウム対イオンと、ホスホリル部分に結合したポリエチレングリコール（「ＰＥＧ」）ヘッド基を含む。特定の実施形態では、前記組成物は、ＰＥＧ化された脂質を含む。特定の実施形態では、ＰＥＧ基のＭＷは、約１，０００から約１０，０００ダルトンである。特定の実施形態では、ＰＥＧ基ＭＷは、約２，０００から約５，０００ダルトンである。特定の実施形態において、ＰＥＧ基ＭＷは、約５，０００ダルトンである。

【００６９】

脂質の例には、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］（アンモニウム塩）、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］（アンモニウム塩）、１，２－ジオレオイル－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］（アンモニウム塩）、１，２－ジミリストイル－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）－３０００］（アンモニウム塩）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－３０００］（アンモニウム塩）、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）－３０００］（アンモニウム塩）、１，２－ジオレオイル－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）－３０００］（アンモニウム塩）、１，２－ジミリストイル－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）－５０００］（アンモニウム塩）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－５０００］（アンモニウム塩）、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）－５０００］（アンモニウム塩）および１，２－ジオレオイル－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）－５０００］（アンモニウム塩）が含まれる。リン脂質５は、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、またはＤＰＰＥを表す。ＰＥ、特にＤＰＰＥは、本発明において、好ましい脂質であり、好ましくは５から２０モルパーセントの間の濃度、最も好ましくは１０モルパーセントの濃度で他の脂質を含有する製剤において好ましい。

【００７０】

本発明の組成物において気体前駆体として使用するためのフルオロカーボンには、部分的または完全にフッ素化されたカーボン、好ましくは飽和、不飽和または環状であるパーフルオロカーボンが含まれる。好ましいパーフルオロカーボンには、例えば、パーフルオロメタン、パーフルオロエタン、パーフルオロプロパン、パーフルオロシクロプロパン、パーフルオロブタン、パーフルオロシクロブタン、パーフルオロペンタン、パーフルオロシクロペンタン、パーフルオロヘキサン、パーフルオロシクロヘキサン、およびそれらの混合物が含まれる。より好ましくは、前記パーフルオロカーボンは、パーフルオロヘキサン、パーフルオロペンタン、パーフルオロプロパンまたはパーフルオロブタンである。

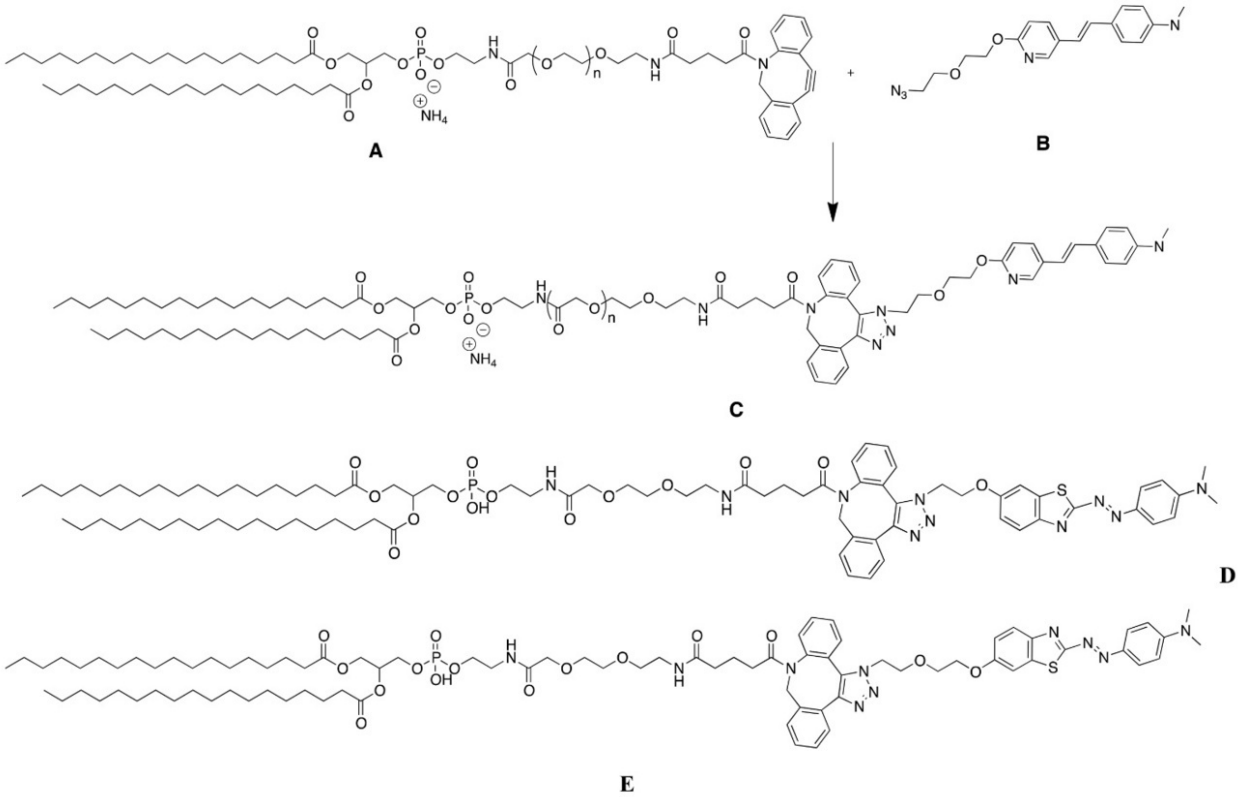
【実施例】

【００７１】

実施例１

複合体の調製

【化１】



スキーム１：複合体の調製：化合物２Ｃの実施例：ＤＳＰＥ－ＰＥＧ－５Ｋ－ＤＢＣＯ（Ａ）およびＡＤ－２Ｃ（Ｂ）をアセトニトリル（ＡＣＮ）中に溶解し、１（Ａ）：３（Ｂ）モル比で室温にて一晩反応させた。生成物は、Ｓｅｐ－Ｐａｃｋカラムを使用して精製および分離した。同じ手順を使用して、化合物４Ａ（Ｄ）および４Ｃ（Ｅ）を合成した。

マイクロバブルの調製：

【００７２】

バイオ複合体（１％モル比）をＤＰＰＣ（８２％モル比）、ＤＰＰＥ（１０％モル比）、およびＤＰＰＥ－ＭＰＥＧ－５Ｋ（７％モル比）と別々に混合してマイクロバブルを生成した。７５℃まで３０分間加熱しながら、リン脂質をプロピレングリコール中に溶解した。この溶液を、ＭＶＴ－１００製剤中に含まれる塩に添加した。最終溶液をバイアル（各１．５ｍＬ）内に分配し、オクタフルオロプロパン（ＯＦＰ）でガス処理した。

マイクロバブルのサイズ分析：

【００７３】

バイアルを活性化し、マイクロバブルに関して濃度とサイズ分布を分析した。

【表１】

	0.56～1.06μm		1.06～2.03μm		2.03～5.99μm		5.99～10.27μm	
実施例名称	濃度(#/mL)	%	濃度(#/mL)	%	濃度(#/mL)	%	濃度(#/mL)	%
試料_AD-2C_01	2.26E+10	75.10%	3.97E+09	13.20%	2.15E+08	0.72%	5.57E+06	0.02%
試料_AD-2C_02	2.2697E+10	74.47%	4.03E+09	13.21%	2.48E+08	0.81%	5.51E+06	0.02%
試料_AD-2C_03	1.2247E+10	73.74%	2.49E+09	14.97%	1.62E+08	0.97%	1.61E+06	0.01%
平均	1.92E+10	74.44%	3.49E+09	13.79%	2.08E+08	0.83%	4.23E+06	0.02%

【００７４】

標的マイクロバブルの例示的なサイズ分析を図７に示す。

ナノ液滴の調製

【００７５】

マイクロバブル製剤を含むバイアルを冷浴で３分間冷却した（－１５～－１８℃）。次に、それらのマイクロバブルを活性化し、冷浴で３分間冷却した（－１５～－１８℃）。溶液の乳白色の状態が曇るまで、窒素（４０～８０ｐｓｉ）をバイアルに注入した。前記バイアルを冷浴（－１５℃から－１８℃）に１０分間保持した後、ＲＴで１時間保持した。

ナノ液滴のサイズ分析

【００７６】

ナノ液滴のサイズ分析は、１７０から２５０ｎｍの有効直径を有する試料を示した。

【００７７】

標的ナノ液滴の例示的なサイズ分析を図８に示す。

インビトロでのタウタンパク質凝集体に対するマイクロバブル／ナノ液滴の効果

【００７８】

タウタンパク質は、ヘパリンの存在下で凝集体を形成する。チオフラビンＴ（$k_{Ex\,cit}$＝４５０ｎｍＡ．C_{mis}＝４８０ｎｍ）などの蛍光プローブはタウに結合する。２４ウェルプレートを、タウタンパク質（タウ（Ｋ１８）Ｐ３０１Ｌ変異体であらかじめ形成されたフィブリルおよびタンパク質モノマー；２ｍｇ／ｍＬ）およびヘパリン０．０３Ｍを用いて凝集用のＴｒｉｓ　２０ｍＭ、ＮａＣｌ　１００ｍＭ、ＥＤＴＡ　１ｍＭ緩衝液ｐＨ７．４中でインキュベートし、そしてＤＴＴ　１μＭの存在下、３７℃で３～４日間インキュベートした。

【００７９】

図９は、タウ凝集体に対するマイクロバブル（ＭＢ）、標的ＭＢ、および標的ナノ液滴の効果に関する例示的な結果を示し、ＭＢはマイクロバブルのみの使用を意味し、ＭＢ＋超音波（ＵＳ）は超音波と共にＭＢを使用したことを意味し、ｔ２ＣＭＢ＋ＵＳは化合物２Ｃおよび超音波と共に標的ＭＢを使用したことを意味する。４Ｃと４Ａに関しても同様。ｔ２ＣＮＤ＋ＵＳは化合物２Ｃと共に標的ＮＤを使用したことを意味する（ｎ＝３　試料／条件、バーは平均であり、エラーバーは標準誤差である）。

【００８０】

各ウェルに１．５ｍＬの生理食塩水を入れ、２００μＬのマイクロバブルまたはナノ液滴と共に１分間インキュベートした。各ウェルに適用された超音波条件は以下のとおり、１０％のデューティサイクル、５０００ｍＷ、周波数５９０Ｈｚ、３０秒サイクル（Ｓｏｎｉｃ　Ｃｏｎｃｅｐｔｓ、ＴＰＯ－２００－０２）である。前記ウェルへの超音波の適用（または偽の適用）に続いて、各内容物をエッペンドルフチューブに移し、室温で１０，０００ｒｐｍで２５分間遠心分離した。中間の液相を、４８０ｎｍでの蛍光測定のために黒色のＥＬＩＳＡプレート中に分注した（２００ｐＬ／ウェル）。凝集体の破壊時にタンパク質凝集体由来の蛍光が放出されるため、その蛍光を測定した。

【００８１】

結果により、マイクロバブルと超音波がタウ凝集体を破壊するが、タウを標的とするマイクロバブルとナノ液滴がはるかに大きな効果を引き起こすことが示される。インビトロ実験により、タウを標的とするマイクロバブルおよびナノ液滴と共に超音波を使用してＡＤを治療できるという概念が支持される。

実施例２

【００８２】

マイクロバブルの製造の詳細な説明については、例えば、米国特許第９，８０１，９５９Ｂ２号明細書を参照されたい。

【００８３】

脂質のブレンドは、ＤＰＰＣとＤＰＰＥ－ＭＰＥＧ－５０００、ＤＰＰＥ、およびＤＳＰＥ－ＰＥＧ５Ｋ－複合体を含む脂質の混合物をプロピレングリコール中に懸濁すること

によって調製された。プロピレングリコール中に懸濁した脂質を、それらが溶解するまで７０±５℃まで加熱した。次に、得られた脂質溶液を、塩化ナトリウム、リン酸緩衝液、およびグリセロールを含む水溶液に加え、撹拌することによって完全に混合させた。得られた脂質ブレンドの各ｍｌは、０．７５ｍｇの総脂質（０．３９ｍｇのＤＰＰＣ、０．０４６ｍｇのＤＰＰＥ、０．２６ｍｇのＭＰＥＧ－５０００－ＤＰＰＥ、および０．０５ｍｇのＤＳＰＥ－ＰＥＧ５Ｋ－複合体からなる）を含んでいた。また、前記脂質ブレンドの各ｍＬは、１０３．５ｍｇのプロピレングリコール、１２６．２ｍｇのグリセリン、２．３４ｍｇのリン酸ナトリウム一塩基性一水和物、２．１６ｍｇのリン酸ナトリウム二塩基性七水和物、および４．８７ｍｇの塩化ナトリウムが注射用水中に含んでいた。ｐＨは６．２～６．８であった。図１ａに示す複合体の１モルパーセントを脂質懸濁液に加えた。材料は、オクタフルオロプロパン（ＯＦＰ）ガス（＞８０％）と残りの空気を含むヘッドスペースを備えた密閉バイアル中に提供された。バイアルは、Ｖｉａｌｍｉｘ修飾歯科用アマルガメーターを使用して活性化され、ベータアミロイド／タウタンパク質を標的とするマイクロバブルを生成した。

実施例３

【００８４】

図４および５に示す複合体を使用して別個の製剤を調製したことを除いて、上記を実質的に繰り返した。

実施例４

【００８５】

前記複合体を含む脂質懸濁液を実施例２のように調製した。マイクロバブルは、４５秒間振とうすることによる撹拌によって形成された。次に、形成されたマイクロバブルを含む２ｍＬバイアルを、約－１５℃の温度に制御された冷浴に浸漬した。バイアルセプタム内に窒素ガス（４０～１２０ｐｓｉ）を針で注入した。前記バイアルの内容物と冷浴溶液の温度を定期的に観察することにより、脂質の凍結を回避した。窒素ガスで加圧した後、前記針を前記バイアルから取り外し、溶液上に圧力ヘッドを残した。前記バイアルを前記冷浴に１０～２０分間、そして室温で１０～１２０分間保持した。粒子のサイジングは、実施例２で調製されたマイクロバブルおよび実施例４からのナノ液滴に対して実施された。前記マイクロバブルの平均直径は約１～２ミクロンで、ナノ液滴の粒子サイズは約２００ナノメートルであった。

実施例５

【００８６】

脳の画像化は、タウがベータアミロイド凝集に沈着することを示すＰＥＴで実行される。実施例４からのナノ液滴は、10×10^{9}ナノ液滴の用量でＡＤを有する患者に静脈内投与され、集束超音波エネルギーが１ＭｈｚおよびＭＩ＝１．６で前記脳に適用される。エネルギーは６０Ｈｚの周波数でパルス化される。治療後、ＰＥＴ画像化が繰り返され、タウタンパク質沈着の減少が示される。

【００８７】

出願人の開示は、図を参照して好ましい実施形態で本明細書に記載されており、同様の番号は、同じまたは類似の要素を表す。本明細書全体を通して「一実施形態」、「実施形態」、または同様の言語への言及は、実施形態に関連して説明される特定の特徴、構造、または特性が本発明の少なくとも１つの実施形態に含まれることを意味する。したがって、「一実施形態において」、「実施形態において」という句の出現、および本明細書全体にわたる同様の言語は、必ずしもそうではないが、すべてが同じ実施形態を指す場合がある。

【００８８】

出願人の開示の記載された特徴、構造、または特性は、１つまたは複数の実施形態において任意の適切な方法で組み合わせることができる。本明細書の説明では、本発明の実施形態の完全な理解を提供するために、多数の特定の詳細が列挙されている。しかしながら、関連技術の当業者は、出願人の組成物および／または方法が、１つまたは複数の特定の

細目を用いることなく、または他の方法、構成要素、材料などを用いて実施できることを認識するであろう。他の例では、本開示の局面を曖昧にすることを避けるために、周知の構造、材料、または操作は詳細に示されていないか、または説明されていない。

【００８９】

本明細書および添付の特許請求の範囲では、文脈が明確に別段の指示をしない限り、単数形「ａ」、「ａｎ」、および「ｔｈｅ」は複数形の参照を含む。

【００９０】

本明細書で使用されるように、具体的に述べられていないか、文脈から明らかでない限り、「約」という用語は、当技術分野における通常の許容範囲内、例えば平均の２標準偏差内であると理解される。約は記載された値の１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％、０．５％、０．１％、０．０５％、または０．０１％以内と理解できる。特に文脈から明確でない限り、本明細書に提供されるすべての数値は、約という用語で修飾できる。

【００９１】

本明細書で使用されるように、具体的に述べられているかまたは文脈から明らかでない限り、「または」という用語は包括的であると理解される。

【００９２】

「含む」という用語は、組成物および方法を定義するために使用される場合、前記組成物および方法が列挙された要素を含むが、他の要素を除外しないことを意味することを意図する。「本質的にからなる」という用語は、組成物および方法を定義するために使用される場合、前記組成物および方法が列挙された要素を含み、前記組成物および方法にとって任意の本質的に重要な他の要素を除外することを意味するものとする。例えば、「本質的にからなる」とは、明示的に記載された薬理学的に活性な薬剤の投与を指し、明示的に記載されていない薬理学的に活性な薬剤を除外する。本質的にからなるという用語は、薬理学的に不活性またはイナートな薬剤、例えば、薬学的に許容され得る賦形剤、担体または希釈剤を除外しない。「からなる」という用語は、組成物および方法を定義するために使用される場合、他の成分の微量元素および実質的な方法ステップを除外することを意味するものとする。これらのトランジションタームのそれぞれによって定義される実施形態は、本発明の範囲内にある。

【００９３】

別段の定義がない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載されているものと類似または同等の任意の方法および材料もまた、本開示の実施または試験に使用することができるが、好ましい方法および材料をここで説明する。本明細書に列挙される方法は、開示される特定の順序に加えて、論理的に可能な任意の順序で実行することができる。

参照による援用

【００９４】

本開示では、特許、特許出願、特許刊行物、ジャーナル、書籍、論文、ウェブコンテンツなどの他の文書への参照と引用が行われている。そのようなすべての文書は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に援用される。本明細書に参照により援用されると言われているが、本明細書に明示的に記載されている既存の定義、言及、または他の開示材料と矛盾する任意の材料またはその一部は、その援用された材料と本願の開示材料との間に矛盾が生じない範囲でのみ援用される。矛盾が生じた場合、好ましい開示として本開示を優先して矛盾は解決されるべきである。

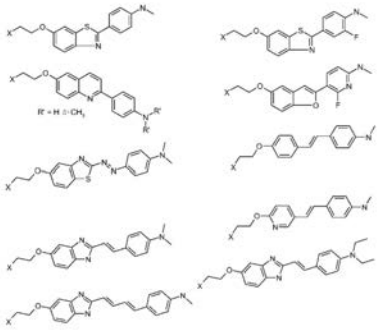
鈎等物

【００９５】

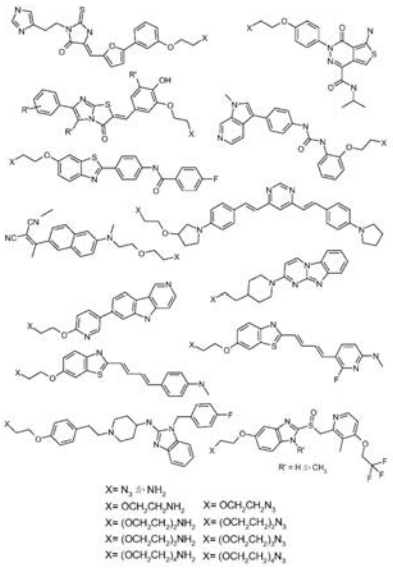
代表的な例は、本発明を説明することを補助することを意図しており、本発明の範囲を制限することを意図しておらず、またそれらを本発明の範囲を制限するためのものと解釈すべきではない。実際、本明細書に示されまた記載されたものに加えて、本発明およびそ

の多くのさらなる実施形態の様々な修飾は、実施例および本明細書に含まれる科学的および特許的な文献への参照を含む本文書の全内容から当業者に明らかになるであろう。実施例は、その様々な実施形態およびその均等物における本発明の実施に適合させることができる重要な追加情報、例示およびガイダンスを含む。

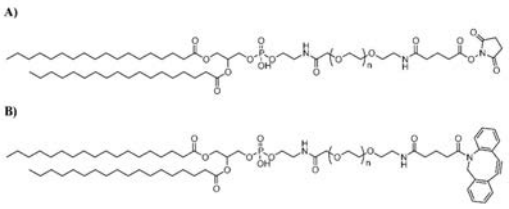
【図１ａ】



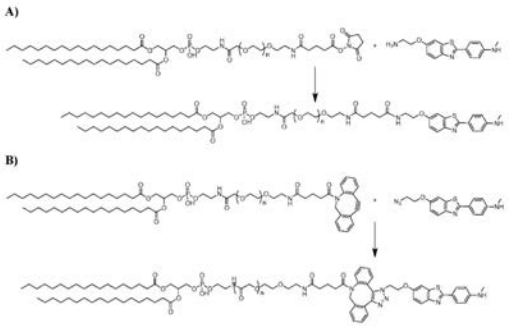
【図１ｂ】



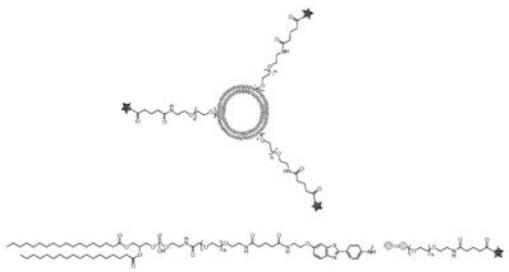
【図２】



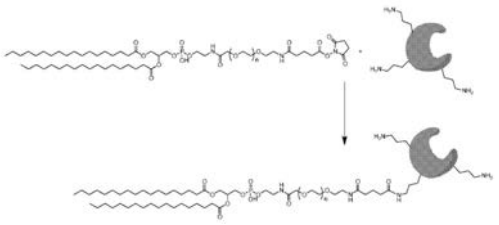
【図３】



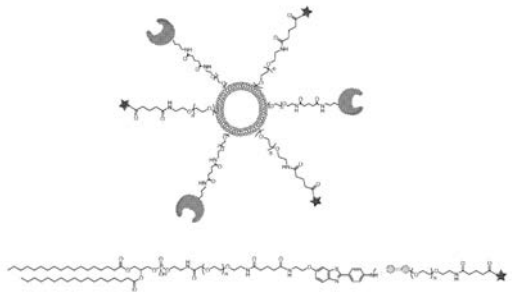
【図４】



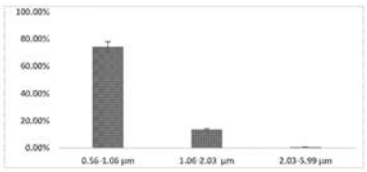
【図５】



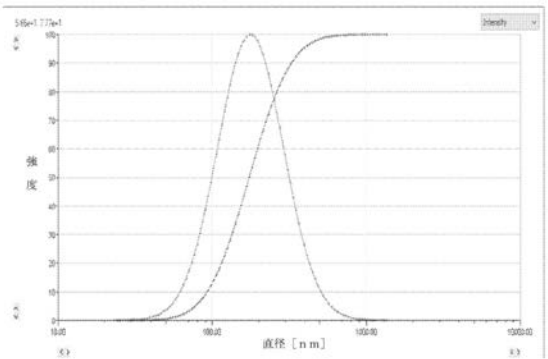
【図６】



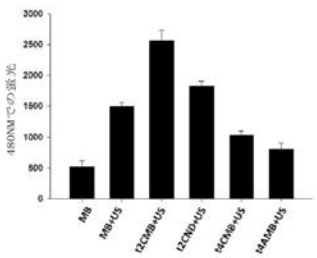
【図７】



【図８】



【図９】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 2019/024713

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

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.: 4-17, 24-37
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 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.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 2019/024713

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(see extra sheet)
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 9/00-9/127, 47/00-47/50, 48/00, 49/00-49/22, B82Y 5/00, A61P 25/28

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)
PatSearch (RUPTO Internal), USPTO, PAJ, Espacenet, Information Retrieval System of FIPS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 9801959 B2 (MICROVASCUAR THERAPEUTICS LLC) 31.10.2017, claims, col. 9, lines 37-51, col. 13, lines 10-52, col. 1, lines 15-27	1-3, 18-23, 38-49
A	LEINENGA Gerhard et al. Scanning ultrasound removes amyloid-β and restores memory in an Alzheimer's disease mouse model. Science Translational Medicine, 2015, vol. 7, Issue 278, 278ra33, pp. 1-11, abstract, p. 1, paragraph 1, p. 8, paragraph 2 from the bottom	1-3, 18-23, 38-49
A	UNGER Evan C. et al. Therapeutic applications of lipid-coated microbubbles. Advanced Drug Delivery Reviews, 2004, 56, pp. 1291-1314, abstract, p. 1299, left col., last paragraph, right col., last paragraph, p. 1295, table 2, p. 1304, chapter 8, paragraph 2 from the top, p. 1305, chapter 9, paragraph 2 from the top, p. 1306, 1307	1-3, 18-23, 38-49
A	US 6028066 A (IMARX PHARMACEUTICAL CORP.) 22.02.2000, col. 85, lines 14-16, col. 82, lines 38-41, col. 86, lines 55-56, example 7, part B, example 11, part D	1-3, 18-23, 38-49

☐ 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	Date of mailing of the international search report
13 June 2019 (13.06.2019)	27 June 2019 (27.06.2019)
Name and mailing address of the ISA/RU: Federal Institute of Industrial Property, Berezhkovskaya nab., 30-1, Moscow, G-59, GSP-3, Russia, 125993 Facsimile No: (8-495) 531-63-18, (8-499) 243-33-37	Authorized officer N. Luzina Telephone No. 8(495) 531-64-81

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Classification of subject matter

International application No.
PCT/US 2019/024713

A61K 9/107 *(2006.01)*
A61K 9/127 *(2006.01)*
A61K 47/24 *(2006.01)*
A61K 47/50 *(2017.01)*
A61K 48/00 *(2006.01)*
A61K 49/18 *(2006.01)*
A61K 49/22 *(2006.01)*
B82Y 5/00 *(2011.01)*
A61P 25/28 *(2006.01)*

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	***9/107***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	25/28	
Ａ６１Ｋ	***49/22***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	9/107	
			Ａ６１Ｋ	49/22	

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,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,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,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,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

(72)発明者 アンガー, エヴァン, シー.
アメリカ合衆国 アリゾナ州 ８５７１５ ツーソン ６２２７ イースト ミラマール ドライヴ
(72)発明者 ダルヤエイ, イマン
アメリカ合衆国 アリゾナ州 ８５７４１ ツーソン ６１９６ エヌ コルテ サン ベッラ
(72)発明者 ミューイルレット, エマニュエッレ, ジョエッレ
アメリカ合衆国 アリゾナ州 ８５７０４ ツーソン ６８０５ ノース ポモナ ロード

Ｆターム(参考) 4C076 AA17 AA24 AA95 BB11 CC01 EE23 EE59 FF34 FF68
4C084 AA02 AA03 DC01 DC02 DC03 DC09 NA05 NA13 NA14 ZA15
ZB05 ZB09 ZC19 ZC75
4C085 HH09 JJ03 JJ17 KA03 KA26 KB74 KB82 LL20