

(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2014-503575

(P2014-503575A)

(43) 公表日 平成26年2月13日 (2014. 2. 13)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 9/127 (2006. 01)	A 6 1 K 9/127	4 C 0 7 6
A 6 1 K 47/02 (2006. 01)	A 6 1 K 47/02	4 C 0 8 6
A 6 1 K 47/24 (2006. 01)	A 6 1 K 47/24	
A 6 1 K 47/28 (2006. 01)	A 6 1 K 47/28	
A 6 1 K 47/34 (2006. 01)	A 6 1 K 47/34	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2013-550906 (P2013-550906)	(71) 出願人	506377178
(86) (22) 出願日	平成24年1月31日 (2012. 1. 31)		ナノバイオティックス
(85) 翻訳文提出日	平成25年9月27日 (2013. 9. 27)		NANOB I O T I X
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/051510		フランス、エフー75012パリ、リュ・
(87) 国際公開番号	W02012/104277		ドゥ・ワッティニー60番
(87) 国際公開日	平成24年8月9日 (2012. 8. 9)	(71) 出願人	592236245
(31) 優先権主張番号	11305097.5		サントル・ナシオナル・ドゥ・ラ・ルシェ
(32) 優先日	平成23年1月31日 (2011. 1. 31)		ルシュ・シアンティフィク
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		CENTRE NATIONAL DE
(31) 優先権主張番号	61/437, 831		LARECHERCHE SCIENT I
(32) 優先日	平成23年1月31日 (2011. 1. 31)		F I Q U E
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100068526
			弁理士 田村 恭生
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 超常磁性のナノ粒子を用いて、興味対象生成物のリボソームからの放出をモニターする方法

(57) 【要約】

本出願は、リボソームの膜透過性上昇および興味対象化合物の付帯的な放出をモニターする方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

リポソームであって、 pH 6 及び 8 の間の水性媒体中で測定されたときに、その静電気表面電荷は -20 mV 未満又は $+20 \text{ mV}$ 以上であり、超常磁性のナノ粒子をカプセル化する熱感受性の脂質膜を含んでなり、リポソーム膜透過性上昇および興味対象生成物の付帯的な放出をモニターする方法で使用するためのリポソームであり、該方法は、次の工程：

- a) T_2^* を測定する工程、
- b) T_m で又は T_m 以上でリポソームを加熱する工程、
- c) 工程 b) の後に T_2^* を測定する工程、
- d) 工程 a) および工程 c) から得られた T_2^* 値から r_2^* 値を得る工程、
- e) T_m で又は T_m 以上での加熱工程の後に、 T_m で又は T_m / r_2^* 以上での加熱工程の前に、 r_2^* の比率を決定する工程、ここで 1.5 以上の比率はリポソーム膜透過性上昇および興味対象生成物の付帯的な放出を示唆し、その結果、リポソーム膜透過性上昇をモニターする工程、を含んでなる、リポソーム。

10

【請求項 2】

リポソームであって、 pH 6 及び 8 の間の水性媒体中で測定されたときに、その静電気表面電荷は -20 mV 未満又は $+20 \text{ mV}$ 以上であり、超常磁性のナノ粒子をカプセル化する熱感受性の脂質膜を含んでなり、リポソーム膜透過性上昇および興味対象生成物の付帯的な放出をモニターする方法で使用するためのリポソームであり、該方法は、次の工程：

- a) T_2^* および T_1 を測定する工程、
- b) T_m で又は T_m 以上でリポソームを加熱する工程、
- c) 工程 b) の後に T_2^* および T_1 を測定する工程、
- d) 工程 a) および工程 c) から得られた T_2^* および T_1 値から r_2^* および r_1 値を得る工程、
- e) T_m で又は T_m 以上での加熱工程の前および後に、 r_2^* / r_1 の比率を決定する工程、ここで 2 以上の加熱工程 b) の前の r_2^* / r_1 の比率及び加熱工程 b) の後の r_2^* / r_1 の比率はリポソーム膜透過性上昇および興味対象生成物の付帯的な放出を示唆し、その結果、リポソーム膜透過性上昇をモニターする工程、を含んでなるリポソーム。

20

30

【請求項 3】

リポソームが、加熱工程 b) の間に、 T_2^* 、又は T_2 および T_2^* を測定する少なくとも 1 つの工程をさらに含んでなる請求項 1 で規定される方法で使用するためである、請求項 1 に記載のリポソーム。

【請求項 4】

リポソームが、加熱工程 b) の間に、 T_2^* および T_1 、および随意に T_2 を測定する少なくとも 1 つの工程をさらに含んでなる請求項 2 で規定される方法で使用するためである、請求項 2 に記載のリポソーム。

【請求項 5】

T_m が 39°C 及び 45°C の間にある、前の請求項のいずれか 1 つに記載のリポソーム。

40

【請求項 6】

熱感受性の脂質膜が、少なくともホスファチジルコリンを含んでなる、前の請求項のいずれか 1 つに記載のリポソーム。

【請求項 7】

熱感受性の脂質膜が、さらにコレステロールを含んでなる、請求項 5 に記載のリポソーム。

【請求項 8】

熱感受性の脂質膜が、さらにジステアシルホスファチジルエタノールアミン-メトキシポリエチレングリコールを含んでなる、請求項 6 または 7 に記載のリポソーム。

【請求項 9】

50

リポソームの最大の寸法が50～500nmの間、好ましくは50～250nmの間である、前の請求項のいずれか1つに記載のリポソーム。

【請求項10】

ナノ粒子が、カルボン酸、ホスフェートおよびアミン剤から選択された剤で静電的に又は共有結合で完全にコーティングされている、前の請求項のいずれか1つに記載のリポソーム。

【請求項11】

ナノ粒子が磁鉄鉱および（または）磁赤鉄鉱の様な酸化鉄から調製されている、前の請求項のいずれか1つに記載のリポソーム。

【請求項12】

ナノ粒子の最大の寸法が2～30nmの間、好ましくは2～20nmの間である、前の請求項のいずれか1つに記載のリポソーム。

【請求項13】

興味対象生成物が、治療上の核酸、細胞増殖抑制化合物および細胞毒性化合物から選択される、前の請求項のいずれか1つに記載のリポソーム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は健康部門で、特にヒト健康において、用いられるものである。ここに開示した方法および組成物は、総じて、興味対象化合物のインビボ送達をモニターするために磁気共鳴技術を採用することに関する。より詳しくは、開示は、熱感受性のリポソームの膜透過性上昇および興味対象化合物の所望される生体内サイトへの付帯的な放出をモニターするために、生理学的pHで水性の媒体中で測定されたときにその静電気表面電荷が-20 mV未満、又は+20mV以上である超常磁性のナノ粒子を使用することに関する。

【背景技術】

【0002】

医学の画像診断は、病理学的及び生理的なプロセスの評価のための重要な非侵襲性のツールとして発展した。現在、NMR画像法(MRI)は、コンピューター断層撮影の様な他の技術に対する多くの利点を実証する最も広く用いられている画像診断療法のうちの1つである。臨床検査に典型的に用いられた適用磁界の無害性は、その安全な使用に帰着する。プロトンMRIは、静磁界に付託されたときに、組織及び器官におけるプロトンの濃度及び緩和の特性が、磁気共鳴画像の強度に影響を及ぼす場合があるという原理に基づく。その結果、この技術は高コントラスト解像度をもたらす、それは、コントラスト組織識別のおかげで、異なる組織のプロトン密度の差により(脂肪または水分に依存して)形態学的画像化を可能にする。ある器官の機能的な画像化も行なうことができる、すなわち血液酸素化、または感覚刺激下の脳エリア活性化である。細胞の画像化が強力磁界で目論まれるので、MRIは高い空間分解能も実証し、および深さ制限はない。造影剤の投与なしでMRIを行なうことができるが、多くのコントラスト増強剤が内部組織および器官の視覚化を強める能力が、その広範囲の使用に帰着した。プロトンMRIに有用なコントラスト増強剤はプロトンの緩和特性の変化の原因である。それは画像強調および改善された軟部組織差別化に帰着する場合がある。

【0003】

与えられた温度領域内でそれらの構造的完全性を失う熱感受性リポソームのドラッグデリバリービヒクルとしての使用は、腫瘍又は他の組織をターゲットとする有望なアプローチである。しかし今まで、効率的なリポソームMRI造影剤は提案されていない。

【0004】

US2004/0101969は、造影剤として、分子化合物(MnSO_4)を用いて、環境感受性のリポソームから放出された興味対象化合物の局在化および分布をモニターする方法について記述する。

【0005】

10

20

30

40

50

WO 2008/035985は、マトリックスまたは膜の材料、薬物、内部T1磁気共鳴金属キレート造影剤および外部T1磁気共鳴金属キレート造影剤を含んでなるドラッグデリバリーのための追跡可能な分散粒子について記述しており、ここで、内部T1剤は自由水から遮蔽され、そして、外部T1剤は自由水に暴露される。

【0006】

EP 2067485は、常磁性の金属化合物を含んでなるドラッグデリバリーのための熱感受性リポソームについて記述する。常磁性の金属化合物は金属のナノ粒子であってよい。好ましくは、常磁性の金属化合物は、化学交換依存性の飽和移動(CEST)造影剤として、金属が水又はプロトンの別の適切な源と相互作用することを可能にする、キレート化構造を含んでなる。

【0007】

これらの文献はすべて、T1磁気共鳴性の常磁性分子化合物であり及び生体内で測定されたときに制限のある感受性だけを提供する造影剤に言及する。その結果、そのような造影剤の比較的多く、恐らく有害な服用量が、所与の被検者に投与されることになる。これや他の問題は本明細書に開示した組成物及び方法によって追求されている。

【0008】

WO2008/033031は、2つの別個の化学的な造影剤、薬物放出をモニターするために用いられるT1シグナルを現すそれらの一つ(T1剤)、およびT2*シグナルを発現する別の一つ(T2*剤)、を含んでなる追跡可能なMRIドラッグデリバリー粒子について記述する。この文献は、薬物放出をモニターするためにT2*剤を用いることを示唆していない。

【0009】

US2009/004258は熱感受性のリポソームカプセル封入酸化鉄ナノ粒子、およびカルボフルオロセレン(CF)(薬物モデルとして用いられているCF)について記述する。代替磁界によって活性化されたときに、ナノ粒子は熱を発することができ、それによって、CFに向かった膜の透過性上昇を可能にする。US2009/004258では、CF放出のモニタリングは蛍光検出によって実施される。

【発明の概要】

【0010】

発明者は、今や現在利用可能な方法に比べて優れた感受性を供する有利な方法をここに提供する。この方法は、特に、帯電した無毒性の超常磁性ナノ粒子の低い投薬量を用いて、標的部位上のリポソーム送達のモニタリング、及びさらに驚くには、興味対象生成物の前記リポソームからの放出の効率的なモニタリングを可能にする。

【0011】

本発明者は、リポソーム膜透過性上昇および興味対象生成物の付帯的な放出をモニターする方法を提供する。該リポソームは、超常磁性のナノ粒子（生理学的水素指数で水性媒体中で測定されたときに、その静電気表面電荷は+20mV未満または -20mV以上である）をカプセル化する熱感受性脂質膜を含んでなり、該方法は、第1の実施形態中で、次の下記工程を含んでなる：

- a) T2*を測定する工程、
- b) Tmで又はTm以上でリポソームを加熱する工程、
- c) 工程b)の後にT2*を測定する工程、
- d) 工程a)および工程c)から得られたT2*値から r_{2*} 値を得る工程、
- e) Tmで又はTm以上での加熱工程の後に、Tmで又はTm/ r_{2*} 以上での加熱工程の前に、 r_{2*} の比率を決定する工程、ここで1.5以上の比率はリポソーム膜透過性上昇、および興味対象生成物の付帯的な放出を示唆し、その結果、リポソーム膜透過性上昇をモニターする工程。

【0012】

特別の実施形態では、方法は加熱工程b)の間の、T2*、又はT2およびT2*を測定する工程をさらに含有する。

【0013】

第2の実施形態では、方法は、下記工程を含んでなる：

- a) T2*およびT1を測定する工程、
- b) T_mで又はT_m以上でリポソームを加熱する工程、
- c) 工程b)の後にT2*およびT1を測定する工程、
- d) 工程a)および工程c)から得られたT2*およびT1値から r_2^* および r_1 値を得る工程、
- e) T_mで又はT_m以上での加熱工程の前および後に、 r_2^*/r_1 の比率を決定する工程、ここで2以上の加熱工程b)の前の r_2^*/r_1 の比率及び加熱工程b)の後の r_2^*/r_1 の比率はリポソーム膜透過性上昇、および興味対象生成物の付帯的な放出を示唆し、その結果、リポソーム膜透過性上昇をモニターする工程。

【0014】

10

特別の実施形態では、方法は加熱工程b)の間の、T2*およびT1、および随意にT2を測定する工程をさらに含有する。

【0015】

本明細書で発明者は驚くべきことには、次のことを実証する。即ち、熱感受性のリポソーム膜透過性上昇は、加熱でおよび興味対象生成物の付帯的な放出で、リポソーム中に閉じ込められた超常磁性のナノ粒子によって可能にされて、核磁気共鳴映像法(MRI)シグナルの変形に帰着する。それは高い値で、容易に測定可能である。

【0016】

本明細書で発明者は、超常磁性のナノ粒子をカプセル化する熱感受性の脂質膜を含んでなる熱感受性のリポソームを提供し、ナノ粒子の静電気表面電荷は、生理学的pHで水性の媒体中で測定されたときに、-20mV未満又は+20mV以上であり、及びナノ粒子は診断かモニタリング剤として使用可能である。典型的に、そのようなリポソームは、本発明による及びここに記述されたリポソーム膜透過性上昇および興味対象生成物の付帯的な放出をモニターする方法で使用するためである。

20

【0017】

特別の実施形態では、熱感受性のリポソームはナノ粒子をカプセル化する熱感受性の脂質膜を含んでなるリポソームであり、ナノ粒子は、治療用又は診断用薬として使用可能であり、各ナノ粒子は、i) 無機コアを含んでなり、その最大の寸法は約100nm未満であり、及び、ii) ナノ粒子の表面で静電荷-20mV未満又は+20mV以上の存在に責任を負う剤で完全にコーティングされており、静電荷は、0.2~8g/lの間で可変な懸濁液でのナノ粒子の濃度に対して、pH 6及び8の間の水性媒体におけるゼータ電位測定によって決定される。

30

【0018】

別の側面では、本開示は、ここに記述された生成物のいずれか一以上を含んでなるキット、すなわち熱感受性のリポソームおよび組成物を、ここに記述された方法の文脈中で生成物を用いるための指示を提供する注意書きと共に提供する。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】図1：5nmサイズの酸化鉄ナノ粒子のTEM観察（目盛バー= 200nm）。

【図2】図2：酸化鉄含有リポソームに対して得られた典型的な溶出プロフィール：図2は、鉄イオン及びフェナントロリンの間の比色定量の反応を介してUV可視分光法（Cary 100 V arian分光計）によって磁気的なナノ粒子の定量化によって決定された酸化鉄含有リポソームに対する溶出プロフィールを示す。リポソームにおける酸化鉄の濃度は1から2.5g/lまでわたる。

40

【図3】図3：ドキソルビシンの放出プロファイル：図3は、蛍光測定によって決定されたドキソルビシン(DOX)-担持酸化鉄含有熱感受性リポソーム(TSL)の動的放出プロファイルを示す。サンプルは、37℃、41℃、43℃および45℃で、リン酸緩衝液の塩性1X(PBS 1X)およびウシ胎仔血清(FBS)（体積比率1:1）を含んでなる媒体中で熟成された。加熱は水浴を介して行われる。

【図4】図4：熱感受性(TSL)及び非熱感受性のリポソーム(NTSL)中で閉じ込められた、1.5テスラの酸化鉄ナノ粒子及び遊離した（又は、自由な）ナノ粒子(遊離NP（又は、自由NP

50

))での、加熱に際しての磁気共鳴(MR)緩和能の発生：図4Aは、45℃で加熱の前に(黒色)、およびその加熱の後に(灰色)、1.5テスラで熱感受性リポソーム(TSL)、非熱感受性リポソーム(NTSL)(両方とも5nm-サイズの酸化鉄ナノ粒子が担持された)および遊離したナノ粒子(遊離したNP)の縦方向の(r_1)緩和能を示す。加熱は水浴を介して行われる。図4Bは、45℃で加熱の前に(黒色)、およびその加熱の後に(灰色)、1.5テスラで熱感受性のリポソーム(TSL)、非熱感受性のリポソーム(NTSL)(両方とも5nm-サイズの酸化鉄ナノ粒子が担持された)および遊離したナノ粒子(遊離したNP)の横方向の(r_{2*})緩和能を示す。加熱は水浴を介して行われる。

【図5】図5：熱感受性(TSL)及び非熱感受性のリポソーム(NTSL)中で閉じ込められた、1.5テスラの酸化鉄ナノ粒子及び遊離したナノ粒子(遊離したNP)での、加熱に際しての磁気共鳴(MR)シグナルの発生：図5は、以下の希釈(酸化鉄における40、20、10および5 $\mu\text{g/mL}$)のための37℃および45℃において、熱感受性(TSL)及び非熱感受性リポソーム(NTSL)内に閉じ込められた酸化鉄ナノ粒子および遊離したナノ粒子(遊離したNP)の溶液の、1.5テスラでのMR画像を示す。ガドリニウムベースのキレートガドレル酸(Dotare) 0.5mMをコントロール(対照)として用いた。

【図6】図6：高強度焦点超音波(HIFU)-誘発加熱の前後における、熱感受性リポソーム(TSL)中でカプセル化された酸化鉄ナノ粒子のMR信号およびT2*写像：図6は、HIFUデバイスでの加熱前後に、熱感受性のリポソーム(TSL)中でカプセル化された酸化鉄ナノ粒子のMR画像およびT2*写像を示す。赤い矢印は、 T_m で又は T_m 以上での加熱に際しての熱感受性リポソームの透過性上昇に対応する、HIFU焦点でのT2*の変化を示す。

【発明を実施するための形態】

【0020】

サンプルの磁気モーメントの正確な歳差(Larmor)周波数で高周波エネルギーのパルス適用することによって、より低いエネルギー状態における歳差運動をする核は共鳴を達成して、その結果として、より高いエネルギー状態における歳差運動をする核に変換される。ラジオ波パルスが切られるとき、励起された核は最初の平衡状態を達成するために緩和する。この緩和は2つの方法で達成することができる。スピン格子緩和(さらに縦方向の又はT1緩和)と名付けられた第1プロセスでは、励起された核は、時定数T1によって特徴付けられた特別の速度で周辺環境(格子)にそのエネルギーを発散する。また、スピン-スピン緩和(さらに横方向の又はT2緩和)と名付けられた第2のプロセスでは、高エネルギー状態の核は時定数T2によって特徴付けられた特別の速度で低いエネルギー状態にある核でエネルギーを交換する。T1及びT2に対する値は、特別の核が位置している化学的及び磁気的な環境に依存し、そして、身体内の異なる構造および組織には異なるT1およびT2値が存在する(Tilcockら、Adv Drug Delivery Reviews、(1999年);37:33-51)。

MR画像中の異なる組織のコントラストを発生するのは主にこれらの2つの緩和過程の相対的な大きさである。及び用いられるパルスシーケンスの詳細に依存して、(即ち、エコー時間TE(それはパルス及びエコーの頂点間の時間、繰り返し時間TR(それはパルス間の時間である))重みは主としてT1またはT2の差を示すために画像に加えることができる。

【0021】

水プロトン緩和過程は磁気共鳴(MR)造影剤の使用によって「触媒され」、その結果、縦方向の緩和時間(T1)および横方向の緩和時間(T2)を短くし、したがって、それらが分配される部位におけるMR信号の強度を増加する(S. Aime, et al., Biopolymers 2002; 66:419-428)。MR造影剤の効果は、プロトン緩和速度(すなわち緩和能)、 r_1 および r_2 へのその衝撃の点において一般に評価される。それらは線形関係：

$1/T_{i, \text{平均}} = 1/T_{i, \text{中間}} + r_i \times [\text{CA}]$ ($i=1$ または $i=2$)、から決定され、ここで、 $T_{i, \text{平均}}$ は測定された緩和時間であり、 $T_{i, \text{中間}}$ は、造影剤を持たない関心領域の緩和時間である。そして、[CA]は造影剤濃度を指す(Martina et al., J. Am. Chem. Soc. 2005; 127:10676-10685)。次に、緩和能は造影剤濃度当たり s^{-1} で表現される。造影剤は縦方向及び横方向の緩和能を増加する(「T1に比重を置いた(T1-weighted)」画像又は「T2に比重を置いた(T2-weighted)」画像)。しかしそれらの性質、適用された磁界および用いられる

パルスシーケンスに依存する可変な程度である。

【0022】

MRIのための2つのメインクラスの造影剤がある：常磁性の錯体および超常磁性酸化鉄ナノ粒子である。第1のクラスは、主として多くの不對スピンを呈するイオン、即ち、Mn(II)、Mn(III)およびGd(III)イオンのキレートを含み、それらに常磁性の挙動を付与する。ガドリニウムに基づいた剤は最も一般に用いられるものである。常磁性の剤は、同様の量だけ、 r_1 および r_2 を増加するが、組織における r_1 中の変化率が r_2 中のそれよりはるかに大きいのでT1強調像を用いて、最もよく視覚化される(Koslowska et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 2009;61:1402-1411)。

【0023】

10

対比剤の第2のクラスは超常磁性酸化鉄ナノ粒子から構成され、酸化鉄は、マグヘマイト(γ -Fe₂O₃)又は磁鉄鉱(Fe₃O₄)結晶構造である(De Cuyper et al. Methods in Enzymology, 2003;373:175-198)。超常磁性は、結晶の寸法が強磁性分域(およそ30nm)より小さい場合に生じる。従って、それらは強磁性体と異なり、磁氣的な残留磁気を示さない(即ち、外部磁界の除去の上で、0まで誘発磁化が回復する)。次に、結晶はそれぞれ完全に磁化された単一の磁氣的な単ドメインであると考えられ、各々の磁氣的なスピンの強い磁氣的カップリングおよび(従って)完全な整列を可能にし、結晶のスピネル型構造の直接の結果である単磁石であると考えられることができる(Corot et al. Adv. Drug Deliv. Rev. 2006;58:1471-1504)。

【0024】

20

超常磁性体造影剤は、一般に r_1 でよりも r_2 でのはるかに多い増加に導き、T2に比重を置いた走査で最もよく見られる(Koslowska et al. Adv. Drug Deliv. Rev. 2009;61:1402-1411)。適切な画像化シーケンスが選択される場合、T2緩和時間に対するこの優勢な効果は、T1緩和時間のこれらの剤の特性の使用を妨げない(C. Chambon, et al., Magn. Reson. Imaging 1993;11:509-519; E. Canet, et al., Magn. Reson. Imaging 1993;11:1139-1145)。

それらの高い磁化率により、超常磁性のナノ粒子はさらに局所的磁界不均質を発生し、かくして、角度で静磁界に適応したスピン中の位相のコヒーレンスの損失に導く。この現象は、横方向磁化の迅速な損害の結果と共に別の型の緩和時間(T2*) (それは一般に磁界不均質およびスピンスピン横方向緩和の組み合わせによる)に帰着する。T2*は次のように定義される： $1/T2^* = 1/T2 + 1/T_{不均一性} = 1/T2 + \gamma \Delta B_0$ 、ここで、 γ は磁気回転比を表し、及び ΔB_0 はローカルに可変なフィールドの強さの差を表わす。超常磁性体造影剤は、次に、T2*に比重を置いた走査に高度に敏感である。

30

【0025】

常磁性の剤は、直接近い近傍の水プロトンに影響し、局所的な水分流動に大きく依存する。従って、これらの剤の影響は非常に局所的である。そして、それらは、理想的には適切な交換速度の水に接しているべきである。対照的に、超常磁性の剤は、環境と無関係の磁界に影響する。したがって、コントラストの点において影響は、すぐまわりの環境を越えてよく広がる(G.M. Lanza, et al., J. Nucl. Cardiol. 2004;11:733-743)。従来型スピネコーMR画像においては、T2(超常磁性)剤の存在が組織の暗い(強度低下)外観に導く。しかし、T1剤は反対(過強度)を引き起こす。

40

【0026】

本発明の文脈中で用いられる熱感受性リボソームは、局所的(例えば腫瘍内(IT))、皮下、静脈内(IV)、皮膚内、動脈内、気道(吸入)、腹膜内、筋肉内および経口経路(経口的に)の様な異なるルートによって被検者に投与することができる。

【0027】

本明細書で使用されるように、用語「被検者」はいかなる生物体をも意味する。用語はもっぱら人間を指す必要はないが(それは被検者の1つの例である)、さらに動物、特に温血の脊椎動物、典型的に哺乳動物および組織培養などを指すこともできる。

【0028】

50

本発明者は、リポソーム膜透過性上昇および興味対象生成物の付帯的な放出を、特に生体内でモニターする方法を提供する。リポソームは、超常磁性のナノ粒子（その静電気表面電荷（ここでは、電荷、または、表面電荷とも称される）は、生理学的pHで（典型的にはpH6～pH8の間で）水性媒体中で測定されたときに、-20mV未満または+20mV以上である）をカプセル化する熱感受性脂質膜を含んでなる。

【0029】

本発明の第2の実施形態では、方法は、下記工程を含んでなる：

- a) $T2^*$ を測定する工程、
- b) T_m で又は T_m 以上でリポソームを加熱する工程、
- c) 工程b)の後に $T2^*$ を測定する工程、
- d) 工程a)および工程c)から得られた $T2^*$ 値から r_{2^*} 値を得る工程、
- e) T_m で又は T_m 以上での加熱工程の後に、 T_m で又は T_m/r_{2^*} 以上での加熱工程の前に、 r_{2^*} の比率を決定する工程、ここで1.5以上の比率はリポソーム膜透過性上昇、および興味対象生成物の付帯的な放出を示唆し、その結果、リポソーム膜透過性上昇をモニターする工程。

10

【0030】

上記の様に、 r_{2^*} 比率は、リポソーム膜透過性上昇に応じて（すなわちリポソームからの興味対象生成物放出に応じて）一様でない。より具体的には、 r_{2^*} 比率は、1.2～10まで一様でない、好ましくは、 r_{2^*} 比率は1.5以上である。

【0031】

特別の実施形態では、方法は加熱工程b)の間の、 $T2^*$ 、又は $T2$ および $T2^*$ を測定する工程をさらに含有する。

20

【0032】

第2の実施形態では、方法は、下記工程を含んでなる：

- a) $T2^*$ および $T1$ を測定する工程、
- b) T_m で又は T_m 以上でリポソームを加熱する工程、
- c) 工程b)の後に $T2^*$ および $T1$ を測定する工程、
- d) 工程a)および工程c)から得られた $T2^*$ および $T1$ 値から r_{2^*} および r_1 値を得る工程、
- e) T_m で又は T_m 以上での加熱工程の前および後に、 r_{2^*}/r_1 の比率を決定する工程、ここで2以上の加熱工程b)の前の r_{2^*}/r_1 の比率及び加熱工程b)の後の r_{2^*}/r_1 の比率はリポソーム膜透過性上昇、および興味対象生成物の付帯的な放出を示唆し、その結果、リポソーム膜透過性上昇をモニターする工程。

30

【0033】

上記の様に、 r_{2^*}/r_1 比率は、リポソーム膜透過性上昇に応じて（すなわちリポソームからの興味対象生成物放出に応じて）一様ではない。

より具体的には、 r_{2^*}/r_1 比率は、1.2～20まで一様でない、好ましくは、 r_{2^*}/r_1 比率は2以上、より好ましくは、5以上である。

【0034】

特別の実施形態では、方法は加熱工程b)の間の、 $T2^*$ および $T1$ 、および随意に $T2$ を測定する工程をさらに含有する。

40

【0035】

用語「測定」は完全な獲得、又はリアルタイム映像技術の文脈における $T2$ 、 $T2^*$ 又は $T1$ のリアルタイム獲得を指す。

【0036】

典型的には、生体内で実行されたときに、ここに記載された方法の T_m 又は T_m 以上での加熱工程b)は、被検者の特定領域（熱処理されたエリアに対応する）のリポソーム膜透過性上昇および興味対象生成物の付帯的な放出をモニターするためにローカルに実行される。そのようなローカルに実行された方法は、放出された生成物の空間的分布の評価を可能にする。

【0037】

50

発明者はここに、 T_m （ゲルから液体への結晶の相転移温度）を伴った熱感受性リポソームを提供する。このリポソームは、超常磁性のナノ粒子（その静電気表面電荷は、生理学的pHで（典型的にはpH6～pH8の間で）水性媒体中で測定されたときに、-20mV未満または+20mV以上である）をカプセル化する熱感受性脂質膜を含んでなる。前記リポソームが熱によって活性化される場合、標的部位上の熱感受性リポソームの送達をモニターする診断用薬として、および興味対象生成物の前記熱感受性リポソームからの放出の効率的なモニタリングに、これらのナノ粒子は使用可能である。好ましくは、このように、本発明者は、リポソームであって、pH 6及び8の間の水性媒体中で測定されたときに、その静電気表面電荷は-20mV未満又は+20mV以上であり、超常磁性のナノ粒子をカプセル化する熱感受性の脂質膜を含んでなり、リポソーム膜透過性上昇および興味対象生成物の付帯的な放出をモニターする方法で使用するためのリポソームを提供する（興味対象生成物は元々該リポソーム中にナノ粒子に加えて存在している）。以下で更に説明するように、静電荷は、0.2～8g/lの間で可変な懸濁液でのナノ粒子の濃度に対して、pH 6及び8の間の水性媒体におけるゼータ電位測定によって典型的に決定される。

10

【0038】

用語「リポソーム」は、外部媒体から小胞内の媒体を分離する膜を形成する、両親媒性分子の少なくとも1つの二重層からなる球状の小胞を指す。小胞内の媒体は、リポソームの内部水性コアを構成する。親水性分子又は成分は、当業者によって知られ、さらにここに以下記述されるカプセル化の活性方法経由で、リポソームの内部水性コアの内部でカプセル化することができる。疎水性分子又は成分は膜の内部で捕捉することができる。

20

二重層を構成する両親媒性分子は脂質（特に、リン脂質）である。リン脂質分子の両親媒性の特性は、リン酸基およびグリセロールグループから構成された親水性ヘッド、および1つ又は2つの脂肪酸から構成された疎水性テールの存在にある。

【0039】

水性の媒体では、リン脂質は、水と脂肪のアシル鎖の接触を最小限にするために自己集合する傾向がある。そして、それらは、それらの化学構造によって異なる型の集合体（ミセル、層状の相など）を採用する傾向がある。より詳しくは、ホスファチジルコリンは「自発的な」わん曲および最終的に生ずる小胞を経験する、積み重ねられた二重層にある層状の相を形成することが知られている(Lasic et al. Adv. Colloid. Interf. Sci. 2001; 89-90:337-349)。リン脂質的な層状の相はサーモトロピック液晶を構成する。これは、両親媒性分子の配列する度合いが温度に依存することを意味する。確かに、リン脂質的な二重層は、「ゲル様の」層状相 L_β から「流体様の」層状相 L_α への間の推移に対応する主要な相転移温度 T_m （「融解」の温度に対して）を実証する。「ゲル」相では、脂肪酸のカーボネート化された鎖の間の強い疎水的相互作用が、リン脂質分子の結晶の秩序化を刺激する：二重層は小イオンに対して単に浸透性がある。「流体」相では、疎水性のテールは熱運動により動いており、それはリン脂質分子の配列のロスを引き起こし、「液晶」相へ導く：二重層は分子（例えば、薬物）に対して浸透性があるようになる。

30

【0040】

「ゲルから液晶」への相転移温度 T_m は、リン脂質分子の化学構造：脂肪酸の炭化水素鎖長、不飽和度、不斉および分岐は、鎖グリセロール連結の型（エステル、エーテル、アミド）、グリセロール骨格への鎖結合の位置（1、2-対1、3-）およびヘッドグループ修飾、に依存する。

40

ホスファチジルコリンの場合には、脂肪アシル鎖の構造および構成が特別の関連性がある(Koynova et al., Biochim. Biophys. Acta 1998;1376:91-145)。

脂肪酸の鎖長の増加は主要な相転移温度を増加する。例えば、9から24炭素原子までわたる鎖長を持った飽和したジアシルホスファチジルコリンについては、 T_m が $1/n$ （ n は脂肪のアシル鎖中の炭素原子の数である）に線形従属することが示された。即ち、 T_m が、 $n=16$ に対する 41°C から $n=24$ に対する 80°C まで増加する。

【0041】

主要なゲル-液晶の相転移温度に対する不飽和度の効果は、構成（シス又はトランス型

50

）、脂肪アシル鎖中の位置および二重結合の数に依存する。例えば、18-炭素を含んでなるホスファチジルコリンのsn-2鎖のみに、および両方の鎖に、シス型の不飽和度の単一サイトを導入することは、鎖融解遷移温度をそれぞれ50℃（54.5℃から3.8℃まで）および75℃（54.5℃から-21℃まで）低下させる効果があり得る。対照的に、二重結合がトランス型である場合、効果は相当に減少する。さらに、T_mは、シス形二重結合の位置に決定的に依存する。具体的には、二重結合が炭化水素鎖の幾何学的な中心の近くにある場合、T_mは極小化され、及び、二重結合が鎖のいずれかの端へ移動すると共に、次第に増加する。二重結合がホスファチジルコリンのsn-2鎖にのみ、又は両方の鎖中にある場合、これらの依存性が当てはまる。二重結合の数の影響に関して、シス形不飽和度の数の増加によって、T_mが減少することが示された。例えば、シス形不飽和度の2つ又は3つのサイトが18-炭素を含んでなるホスファチジルコリンの両方のアシル鎖へ導入される場合、鎖融解遷移温度は、印象的な109℃（54.5℃から-55.1℃まで）および116℃（54.5℃から-61.5℃まで）それぞれに低下する(Koynova et al., Biochim. Biophys. Acta 1998;1376:91-145)。

10

【0042】

混成鎖のホスファチジルコリンは、sn-1およびsn-2位置で異なる炭化水素鎖長を示す。規定された構造の関連するホスファチジルコリンの遷移温度の正確な予測を可能にする経験式が導き出された。標準化された鎖長非等価パラメーター($\Delta C/CL$)が記述され、ここで、 ΔC ($=|n_1-n_2+1.5|$)が有効な鎖長差で、 n_1 および n_2 が、それぞれグリセロールバックボーンのsn-1およびsn-2位置での鎖における炭素の数である。CLは2つの鎖のより長いものの有効長である。2つの鎖(n_1+n_2 =定数)を構成する同数の全炭素原子を実証するホスファチジルコリンについては、鎖長非等価パラメーター $\Delta C/CL$ が約0.4に増加するとき、鎖融解温度は単調に減少する。 $\Delta C/CL$ が約0.4以上になる場合、アシル鎖のメチル末端によって引き起こされた充填摂動は、非常に優勢になるので、非対称のホスファチジルコリン分子は、混合交互嵌合と呼ばれる新しい充填配置を採用する。この転位に際して、T_mは鎖長不斉につれて増加する。

20

【0043】

ドラッグデリバリー目的に対して、ステロール成分は、リボソームにふさわしい物理化学的および生物学的な挙動を付与するために含まれてよい。そのようなステロール成分はコレステロール又はその誘導体（例えばエルゴステロール、コレステロールヘミサクシネート）から選択されてもよい。しかし、それにはコレステロールが好適である。

30

コレステロールの存在がリボソームの浸透性を減少させて、血漿または血清蛋白質の攪乱効果からリボソームを保護することが一般に認識されるので、コレステロールはリボソームの脂質の配合物中でしばしば用いられる。

コレステロール分子は3つの良く識別された部位を含んでいる：小さな極性水酸基、剛性プレート様のステロイド環およびアルキル鎖テールである。コレステロールが膜ヘインターカレートする場合、その極性水酸基はホスファチジルコリン分子のグリセロール骨格部位の中間近くに位置した(Kepczynski M. et al., Chemistry and Physics of Lipids, 2008;155:7-15)。脂質二重層中へのコレステロールの様な改質剤の取り込みは、リボソーム膜の構造的又は物理的性質（その構成、自由容積、厚さ、流動性（粘度）および極性（疎水性）等）を大幅に変える。

40

【0044】

二重層の粘度は、膜の自由容積に影響を及ぼす二重層内でのコレステロールの位置および温度に依存する。二重層のマイクロ粘度に対するコレステロールの効果はやや複雑である。コレステロールが、液相状態にある膜の明白なマイクロ粘度を増加する（流動性を減じる）ことは周知である(Cournia et al. J.Phys.Chem.B, 2007;111:1786-1801)。

Papahadjopoulosらは、血清または血漿に接している場合、リボソームとしてのコレステロールの保護効果が脂質膜の物理的状态、即ち「ゲル」又は「流体」に依存することを示した。ゲル状態では、コレステロールの存在は、二重層内でリン脂質アシル鎖の配列するパラメーターに影響し、捕捉された分子の放出を増強する。流体状態では、コレステロールはリボソームを安定させて、カプセル化された物質の漏出を予防する(Papahadjopoulos

50

os et al. Pharm. Research, 1995;12(10):1407-1416)。

【0045】

25モルパーセント(mol %)以上の濃度でのコレステロールの添加に際して、ゲルから液晶への脂質相転移上に劇的な影響がある。攪乱した液体(流体)および秩序有る固体(ゲル)相間の共存の新しい熱力学的に安定した部位が記述されている:秩序有る液体相である(Cournia et al. J. Phys. Chem. B, 2007;111:1786-1801; Polozov et al., Biophysical Journal, 2006;90:2051-2061)。この新しい相は、ゲル相の流動性、及び純粋な脂質によって形成された流体相の流動性の間の中間にある流動性によって特徴付けられる。最近、コレステロールがモデル膜、所謂「脂質いかだ」中で動的な錯体を生み出すために、飽和している脂質(高融点の脂質)(ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)およびスフィンゴミエリン)と連携する場合、秩序ある液体相が形成されることが提案された。コレステロールは、コレステロールに富んだ、及び、コレステロールに乏しいミクロドメインが形成されるモデル膜中の相分離を促進する(Radhakrishnan et al. Proc. Natl. Acad. Sci., 2000;97:12422-12427; Mc Connell et al. Biochim. Biophys. Acta, 2003;1610:159-173)。確かに、Gaber et al. (Pharm. Research, 1995;12(10):1407-1416)は、コレステロールジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、水素化大豆ホスファチジルコリン(HSPC)およびコレステロールの33mol%を、それぞれ100:50:75及び50:50:50のモル比に含んでいる2つの脂質の調製物は、示差走査熱量法測定によって実証されるように、30℃及び65℃の間の相転移温度を示さないことを示した。そのような配合物を持ったリポソームは「非熱感受性の」リポソームと呼ばれる。

【0046】

本発明の文脈における使用可能な典型的な「熱感受性の」リポソーム(典型的には、39℃及び55℃の間の、好ましくは39℃及び50℃の間の、より好ましくは39℃及び45℃の間の相転移温度 T_m を持ったリポソーム)は、少なくともホスファチジルコリンを含有する。

ホスファチジルコリンは、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、ジステアрилホスファチジルコリン(DSPC)、水素化大豆ホスファチジルコリン(HSPC)、モノパルミトイルホスファチジルコリン(MPPC)、モノシテアрилホスファチジルコリン(MSPC)およびそのいかなる混合物から選択されてもよい。

【0047】

好ましい実施態様において、熱感受性のリポソームはさらにジステアрил-ホスファチジルエタノールアミン(DSPE)、(ジステアрилホスファチジルエタノールアミン(DSPE)-メトキシポリエチレングリコール(PEG))(DSPE-PEG)を含有する。

【0048】

好適な実施形態では、コレステロールは25mol %より少ないモル比で添加される。

【0049】

好ましい熱感受性の脂質膜は、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、水素化大豆ホスファチジルコリン(HSPC)、コレステロールおよびジステアрилホスファチジルエタノールアミン(DSPE)-メトキシポリエチレングリコール(例えばPEG2000)(DSPE-PEG2000)(PEG)を含んでなる。

特別の実施形態では、先に特定された化合物のモル比には100:50:30:6または100:33:27:7が好適である。

【0050】

別の好ましい熱感受性の脂質膜は、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、モノパルミトイルホスファチジルコリン(MPPC)およびジステアрилホスファチジルエタノールアミン(DSPE)-メトキシポリエチレングリコール(例えばメトキシポリエチレングリコール-2000)(DSPE-PEG2000)(PEG)を含んでなる。

特別の実施形態では、先に特定された化合物のモル比には100:12:5が好適である。

【0051】

別の好ましい熱感受性の脂質膜は、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、モノシテアрилホスファチジルコリン(MSPC)およびジステアрилホスファチジルエタノールア

ミン(DSPE)-メトキシポリエチレングリコール(例えばメトキシポリエチレングリコール-2000)(DSPE-PEG2000)(PEG)を含んでなる。

特別の実施形態では、先に特定された化合物のモル比には100:12:5が好適である。

【0052】

調製の様式に依存して、小胞の層状態の寸法及び度合いは調整することができる。単層脂質の小胞を調製するいくつかの方法は、文献に記載されている：逆相蒸発(Szoka et al., PNAS, 1978; 75(9):4191-4198)、エタノール注入(Pons et al. International Journal of Pharmaceutics, 1993;95(1-3):51-56)、加熱法(Mozafari et al., Journal of Biotechnology, 2007;129:604-613)。しかし最も単純なのは脂質フィルム水和法(Bangham et al., J. Mol. Bio., 1965;13:238-252)である。

簡単に云えば、脂質フィルム水和法では、脂質は有機溶媒(クロロホルム等)中で可溶化する。溶液の均質化の後、有機溶媒は窒素気流下で蒸発する。次に、かくして得られた乾燥した脂質フィルムは、100から800nmにわたる寸法を持った多層ベシクルの生成に導く主要な相転移温度 T_m 以上の温度で水性媒体によって水和される(Mills J.K. et al. Methods in Enzymology 2004;387:82-113)。脱水及び再水和のサイクルは、それぞれに凍結し(液体窒素中で)および溶液を解凍する(T_m 以上で温度で)ことによって、単層の小胞の形成により水性の内部体積を増加することを可能にする。次に、小胞に寸法較正を可能にするプロセスが、均質の粒度分布を得るために適用される。音波処理は20から50nmにわたる寸法で小さな単層のベシクル(Small Unilamellar Vesicles)(SUV)を製造する。しかし、フィルター膜による押し出し法は、フィルター気孔の寸法に依存して、50から500nmにわたる寸法で大きな単層のベシクル(Large Unilamellar Vesicles)(LUV)を製造する。 T_m 以上の温度で両方のプロセス(音波処理及び押出)を実行しなければならない。

【0053】

本発明による熱感受性のリボソームの中で最大の寸法は、典型的には、50~500nmの間で、好ましくは50~250nmの間で、例えば、約50nm及び約150nmの間で、含有される。

【0054】

本発明中で好ましくは用いられる熱感受性リボソームは、それらの生物学的適合性および特別の体内分布を保証するか改善するために、生体適合性のコーティングを含んでなる。

生物学的適合のコーティングは、生物学的適合の懸濁液(生理液(血液、血漿、血清、など)、いかなる等張媒体又は生理的媒体(例えばグルコース(5%)および(または)NaCl(0.9%)を含んでなる媒体))でのリボソーム安定性を許容するか容易にする。それは医薬投与に必要である。

そのような生物学的適合のコーティングは表面処理剤でリボソームを処理することにより得られる。

安定性は生体適合性の懸濁液でリボソームの動的光散乱によって確認されてもよい。

前記コーティングは、有利にはリボソームの完全性を生体内で保存し、その生物学的適合性を保証するか、改善し、及び、その随意の機能化(例えばスパーサー分子、生体適合性のポリマー、標的化剤、タンパク質、などで)を促進する。

【0055】

コーティングは非生物分解性かもしれないし又は生物分解性かもしれない。両方のオプションが、本発明の文脈中で用いることができる。

非生物分解性のコーティングの例は、糖(アガロース等)、飽和炭素ポリマー(ポリエチレンオキサイド等)、架橋された又はされない、変性された又はされない(ポリメタクリレート又はポリスチレン等)、同様にそれらの組み合わせ、から成るグループ中で選択された一以上の材料又は表面処理剤である。

【0056】

生物分解性のコーティングの例は、例えば、変性された又はされない、天然の又はそうでない生体分子及び生物学的なポリマー；変性された又はされない、天然の形の又はそうでない、から成るグループから選択された一以上の材料又は表面処理剤である。生物学的

なポリマーは、糖類、オリゴ糖又は多糖類、ポリスルホン化された又はされない、例えばデキストランである。

【0057】

前述の材料、化合物又は表面処理剤は、単独で又は組み合わせで、混合物又は集合体で、複合材料又はそうでなく、共有結合又はそうでなく、随意に他の化合物と結合して、用いることができる。

【0058】

本発明による熱感受性のリボソームは、生物学的組織又は細胞の特別のターゲッティングを可能にする表面成分をさらに含有することができる。そのような表面の成分には、標的生物学的構造上で存在する認識要素とのリボソーム相互作用を許容する標的化剤が好適である。

10

【0059】

一旦リボソームが腫瘍に蓄積さえすれば、そのような標的化剤は作用することができる。

標的化剤の構成が標的との相互作用に責任があるように、前記標的化剤の密度は当業者によって知られた方法によって注意深くコントロールされることになっている。その高密度は確かに標的化剤構成を混乱させ、及び、その結果として標的細胞によるその認識を混乱させる可能性がある。(例えば、J. A. Reddy et al. Gene therapy 2002;9:1542; Ketan B. Ghaghada et al. Journal of Controlled Release 2005;104:113を参照)。更に、高い標的剤密度は、脈管構造における循環中に細網内皮系(RES)によるリボソームクリアランスを容易にし得る。

20

【0060】

標的化剤は抗原、スパーサー分子、生物学的適合性ポリマーから選択されてもよい。標的化剤は、ヒト又は動物体中にある分子への親和性を顕示するいかなる生物学的又は化学構造になり得る。例えば、それは、ペプチド、オリゴペプチド又は、ポリペプチド、タンパク質、核酸、ホルモン、ビタミン、酵素など、及び一般に分子(例えば受容体、マーカ一、抗原、など)のいかなる配位子でもあり得る。病理学的な細胞によって発現された分子の配位子および特に腫瘍抗原、ホルモン受容体、サイトカインレセプター又は成長因子レセプターの配位子である。前記標的とされた剤は、例えば、LHRH、EGF、葉酸、抗-B-FN抗体、e-セレクトイン/P-セレクトイン、抗-IL-2R抗体、GHRH、などのグループ中で選択することができる。

30

【0061】

コーティングはさらに異なる官能基(又はリンカーセグメント)を含むことができ、その官能基はいかなる興味対象分子もリボソームの表面に結合することを可能にし、例えば、生物学的組織又は細胞の特別の標的化を可能にする表面の成分などである。

【0062】

用語「ナノ粒子」は、粒子または粒子の集合体を指し、前記ナノ粒子は、コア(又は中心核)およびコーティングを含んでなり、コアの最大の寸法は、約100nm未満である。典型的には、ナノ粒子のコアの最大の寸法は、円形か球形のナノ粒子の直径、又は卵形か卵形の形のナノ粒子の最長の長さである。

40

「ナノ粒子の寸法」、「ナノ粒子の最大の寸法」という用語は、ここでは、「ナノ粒子のコアの最大の寸法」を指す。

「コア」は単一粒子(結晶または結晶子)又は粒子(結晶または晶子の集合体)の集合体を指すことができる。

透過型電子顕微鏡(TEM)又は低温TEMはコアが単一粒子にある場合に、ナノ粒子、とりわけコアの寸法を測定するために有利に用いることができる(図2を参照)。同様に、動的光散乱(DLS)は前記コアが粒子、又は粒子の集合にある場合に、溶液でのナノ粒子のコアの流体力学的径を測定するために用いることができる。寸法尺度を比較し、かつ前記寸法を確認するために、これらの2つの方法は、互いの後にさらに用いられてもよい。

物質は無機質原料である。

50

【0063】

ここに使用されたナノ粒子の電子的な表面電荷は、ゼータポテンシャル測定によって決定されたときに、-15mV未満又は+15mV以上、例えば、-15mV及び-20mVの間、又は+15mV及び+20mVの間で、典型的には、-20mV未満又は+20mV以上であり、測定は0.2~8g/lの間で可変な濃度を持ったナノ粒子懸濁液上で実行され、ナノ粒子は、6及び8の間に含まれるpHで水性媒体中に懸濁されている。

【0064】

ナノ粒子の形は例えば、丸、平ら、引き延ばされた形、球状、卵形または楕円形などであり得る。形は生産様式によって決定するかコントロールし、所望される応用に従って、当業者によって適用することができる。

ターゲットとされたサイト上で一度送達されると、粒子の形がそれらの「生体適合性」に影響を及ぼす場合があるので、全く均質な形を有する粒子が好ましい。したがって、薬物動態学的理由で、形として本質的に球状、円形、卵形であるナノ粒子が好ましい。球状か円形の形が特に好ましい。

【0065】

ナノ粒子の中で最大の寸法、i.e. ナノ粒子のコアの最大の寸法は、本発明の文脈において、典型的には1~50nmの間で包含される。

それは、有利には、約2nm及び約50nmの間で、例えば約2nm及び30nmの間で又は約2nm及び約20nmの間で、好ましくは約2nm及び約10nmの間で、典型的には、約5nm及び約10nmの間で、約4nm及び約8nmの間で又は約30nm及び50nmの間で包含される。

【0066】

本発明の文脈中で用いられるナノ粒子は、コア及びコーティングを包含し、前記コーティングは、生理学的pHで水性の媒体中で測定されたときに、静電気表面電荷-20mV未満の又は+20mV以上の存在の責任がある。

静電コーティングは有利には、「十分なコーティング」（完全な単層）である。これは、ナノ粒子のすべての表面上で適切で均質の電荷を生み出す分子のまさに高密度の存在を意味する。

コーティングは無機又は有機表面被覆になりえる。

無機の場合、コーティングは、オキシド、水酸化物およびオキシヒドロキシドから成るグループから選択されてもよい。無機物被覆は例えば、ケイ素、アルミニウム、カルシウムおよび(または)マグネシウムを包含してもよい。

例えばマグネシウム、カルシウムからなるグループから選択された無機の剤は、pH 7でプラス荷電(+20mV以上)をナノ粒子の表面へもたらすであろう。

別の実施態様において、ケイ素グループはpH 7で負電荷(-20mV未満の)をナノ粒子の表面へもたらすために用いられてもよい。

【0067】

有機である場合、コーティングは、互いに影響し合うことができる分子であって、共有結合又は静電気結合を通してナノ粒子表面で結合している、および前記ナノ粒子に表面性質を与えている、分子で調製される。

表面被覆有機分子には2つのグループ、RおよびXがある。Xの機能はナノ粒子表面と相互作用することである。そして、Rの機能はナノ粒子の表面にその特有性を与えることである。

Xは、例えばカルボキシラート(R-COO⁻)、シラン(R-Si(OR)₃)、ホスホン(R-PO(OH)₂)、リン酸(R-O-PO(OH)₂)、ホスフェート(R-PO₄³⁻)およびチオール(R-SH)グループから選択されてよい。

Rは生理的なpHで水性懸濁液におけるナノ粒子に少なくとも電子的な表面電荷をもたらしす。

Rがプラス荷電をナノ粒子の表面へもたらす場合、Rはアミン(NH₂-X)であってよい。

Rが負電荷をナノ粒子の表面へもたらす場合、Rはホスフェート(PO₄(X)又はカルボキシラート(COO)(X)であってよい。

10

20

30

40

50

【0068】

ナノ粒子にプラス荷電(+20mV以上)を付与する表面の有機物被覆は、例えば、アミノプロピルトリエトキシシラン、ポリリシン又は2-アミノエタントールから選択されてもよい。

ナノ粒子表面へ負電荷(-20mV未満)を付与する有機物被覆は、例えばポリリン酸塩、メタ燐酸塩、ピロ燐酸塩、など、又は例えばクエン酸塩又はジカルボン酸(特にコハク酸)から選択されてもよい。

再び、静電コーティングは有利には「十分なコーティング」である。

【0069】

この静電コーティングおよびとりわけアミノ又は、カルボン酸部分はナノ粒子の表面上のいかなるグループ又は剤も連結するためにさらに用いることができる。

10

【0070】

随意に、ナノ粒子表面は立体的なグループを用いて機能化することができる。そのようなグループは、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリエチレンオキシド、ポリビニルアルコール、ポリアクリレート、ポリアクリルアミド(ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)、ポリカルバミド、生体高分子又は、多糖類(デキストラン)、キシラン、セルロース、コラーゲンおよび両性イオンの化合物(ポリスルホベタイン等)から選択されてもよい。

この立体的なグループは、生物学的適合の懸濁液(生理液(血液、血漿、血清、など)、いかなる等張の媒体又は生理学的媒体(例えばグルコース(5%)および(または)NaCl(0.9%)を含んでなる媒体)でのナノ粒子安定性を増加する。

20

【0071】

コアを構成する無機質原料は超常磁性の材料である。

超常磁性の材料は、例えば、鉄、ニッケル、コバルト、ガドリニウム、サマリウム、ネオジムを、好ましくはオキシド、水酸化物又は金属の形で、及びそのいかなる混合物をも含む。

特別の例において、コアを形成する物質は、酸化第一鉄及び酸化第二鉄から成るグループから選択される。本発明の好ましい実施態様において、オキシドナノ粒子は磁鉄鉱またはマグヘマイトからなる。

混合原料も磁界及びナノ粒子の間の相互作用を最適化するために用いることができる。固溶体形態(いくつかの材料の任意の混合物としての当業者によって周知)(CoFe_2O_4)は、例えば混合材料として用いることができる。混合解除された相中の固溶体形態(例えば、 $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Co}$)は、さらに用いることができる。

30

【0072】

本発明の文脈において、興味対象生成物は、治療上の効果又は予防的な効果を持ったいかなる化合物(例えば薬物)も含む。それは、組織生長、細胞増殖、細胞分化中で影響するか関与する化合物、生物作用(免疫反応等)を起動することができる化合物、又は一以上の生物過程において他の役割も果たすことができる化合物でありえる。

非限定的な例のリストは、抗微生物薬(抗菌剤、特に抗生物質、抗ウイルス物質および抗真菌剤を含む)；抗腫瘍剤、特に抗癌性化学療法剤(細胞増殖抑制等)、細胞毒性剤、及び癌を治療するように意図された他の生物学的又は無機的生成物(治療上の核酸等)、特にミクロのRNA(miRNA)、短鎖ヘアピンRNA(shRNA)および/または小型干渉RNA(siRNA)を含む。

40

本発明における薬物はさらにプロドラッグであってもよい。

そのような興味対象生成物のいかなる組み合わせもさらに用いられてもよい。

【0073】

興味のある化合物は、担体のコンパートメントの内部、外部、または両方に、例えば、リポソームの空洞、および(または)シェル中に存在してよい。

【0074】

本開示はさらにキットを提供し、該キットはここに記述された熱感受性のリポソームの

50

いかなる一以上も含んでなり、該リボソームは超常磁性のナノ粒子および標的部位に送達され放出される興味対象化合物を含んでなる、又は、そのようなリボソームを含んでなる組成物を提供する。例えば、キットは少なくとも1つのここに記述されるような熱感受性のリボソーム又は熱感受性のリボソームの集団を含んでなり、及びさらに、ここに記述された診断上の組成物の成分の一以上で満たされた一以上の容器を含んで成る。

熱感受性リボソーム、熱感受性リボソームの集団又は発明の本方法によって組成物を用いることに対して、生成物を用いるための指示を提供するラベリングノーティス(labeling notice)をさらに提供することができる。

【0075】

他の側面および発明の利点は以下の実施例において明白になるであろう。それは制限としてではなく例示の目的のために与えられる。

【0076】

実験の部

【0077】

実施例1：5nmサイズのナノ粒子の調製

5nmに集中した粒度分布を持った酸化鉄ナノ粒子は、(US4329241; Bacri et al., J. Magn. Magn. Mat., 1986; 62:36-46)から適用された、鉄および鉄イオンの共沈によって合成される。

簡単には、反応させる媒体は、制御されたイオン強度を持った、pH 12で維持された硝酸ナトリウム3Mの溶液に存する。モル比Fe(III)/Fe(II)が2と等しい第一鉄及び第二鉄イオンの3M硝酸ナトリウム溶液を調製し、混合下に反応させる媒体に徐々に添加する。それは急速に黒くなる。次に、全体の溶液は混合下に周囲温度で一晩熟成する。

次に、フェライトナノ粒子は磁石上で沈殿する。そして、上澄液は反応媒体を除くために除去する。次に、ナノ粒子表面のペプチゼーション（酸性化）および酸化は、激しい混合の下、室温で硝酸HNO₃ 2Mの溶液で顆粒剤を希釈することにより実行する。

ナノ粒子コアの酸化は、激しい混合下に高温（>90℃）で硝酸鉄(III)溶液中での顆粒剤の培養によって実行する。

次に、ナノ粒子は遠心分離によって洗浄する。

顆粒剤は、酸化鉄中で150g/lの濃度に達する様に、酸性の水中で最終的に希釈する。その溶液は超音波処理によって均質化する。そして次に、pHはpH 2に調節する。

ナノ粒子のモルフォロジー（寸法及び形）は透過型電子顕微鏡によって観察した(図1)。

酸化鉄ナノ粒子の結晶構造はX線回折分析によって確認した。

【0078】

実施例2：ナノ粒子の表面処理 - ヘキサメタリン酸ソーダ(HMP)でのナノ粒子の機能化
ヘキサメタリン酸ソーダの懸濁液を、実施例1（添加されたヘキサメタリン酸ソーダの量はLD50/5未満）からの酸化鉄ナノ粒子の懸濁液に添加する。そして、懸濁液のpHは6及び8の間に含まれるpHに調節する。

電子的な表面電荷（<-20mV）はZetasizer NanoZS(Malvern Instruments)上でゼータ電位測定によって決定される。該測定は、633nmのHeNeレーザーを用いて、0.2~2g/lの間で可変な濃度のナノ粒子懸濁液上で実行し、ナノ粒子は、6及び8の間に含まれるpHで水性媒体中に懸濁する。

【0079】

実施例3：リボソームの内部の酸化鉄ナノ粒子およびドキシソルビシンの共同カプセル化
3.1. 酸化鉄ナノ粒子をカプセル化する熱感受性リボソーム(TLS)の調製：

酸化鉄ナノ粒子をカプセル化する熱感受性のリボソームは、脂質のフィルム再水和方法を用いて調製される(Bangham et al., J. Mol. Bio., 1965;13:238-252; Martina et al., J. Am. Chem. Soc., 2005;127:10676-10685)：

a) 脂質はクロロホルム中で可溶化する。クロロホルムは、最終的に窒素フローの下で蒸発する。脂質のフィルムの再水和は、実施例2において記載されている酸化鉄溶液の2mLで55℃で実施する。その結果、脂質の濃度は50mMである。

以下の脂質の組成物を用いた：ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、水素化大豆ホスファチジルコリン(HSPC)、コレステロール(Chol)およびPEG化ジステアerylホスファチジルエタノールアミン(DSPE-PEG2000)をモル比100:33:27:7(DPPC:HSPC:Chol: DSPE-PEG2000)。

b) 次に、凍結融解サイクルは、液体窒素および55℃で調整された水浴へ連続的にサンプルを注入することにより、20回実行する。

c) Thermobarrel押出機(LIPEXTM Extruder, Northern Lipids)は制御された温度および圧力の下で、ナノ粒子含んでいるリポソームの寸法を検定するために用いた。いかなる場合でも、押出は2から20バールにわたる圧力の下で55℃で実行した。

d) 非カプセル化粒子の分離はセファクリルS1000濾過ゲル上でサイズ排除クロマトグラフィーによって実行する。

e) 溶出プロファイルは、Che et al., Journal of Chromatography B, 1995;669:45-51, and Nigo et al., Talanta, 1981;28:669-674から適用された第一鉄イオン/フェナントロリンの比色定量反応を介して(図2)、UV可視分光法(Cary 100 Varian spectrometer)による磁気的なナノ粒子の定量化によって決定する。リポソーム含有画分を収集する(図2、第1のピーク)。リポソームにおける酸化鉄の濃度は1から2.5g/lまでわたる。組成物のTmは43℃である。

【0080】

3.2. 酸化鉄ナノ粒子をカプセル化する熱感受性リポソーム(TLS)のドキソルビシンによる装填

酸化鉄含有リポソーム内部でのドキソルビシン(DOX)の活性な装填を、pH勾配を介して用いた。一旦リポソームの内部水性コア中に閉じ込められたならば、ドキソルビシン漏出はアンモニウム塩でのアントラサイクリン分子の錯化によって防がれる：

a) 酸化鉄含有リポソーム(実施例3.1において説明した様に調製した)は、1時間、およそpH5で、アンモニウム水素ホスフェート($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$)の120mM溶液中で培養する。

b) 透析工程は、外側の $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ を除くために、HEPES緩衝液食塩水(HEPES 20mM、NaCl 140mM、pH 7.4)中で実施する：4℃で一晩、1回、次に周囲温度で3時間、2回(250*250*250の最終希釈比)。

c) 1.55mg/mLのドキソルビシン濃度を得るために、NaCl 140mM中7mg/mLのドキソルビシン原液 284 μL を、酸化鉄含有リポソーム溶液の1mLに添加する。組成物は一晩の間、37℃で培養する。

d) 次に、カプセル化されていないドキソルビシンを、セファデックスG50濾過ゲル(カラム高さ：5cm; 溶離剤：HEPES緩衝液食塩水)上のサイズ排除(size-exclusion)クロマトグラフィーによって除く。ゲル上に析出した、ドキソルビシンが担持されたりポソームの体積は700 μL である。500 μL の画分を収集する。

e) 溶出プロファイルは、各画分中のドキソルビシン濃度の定量により実施する(480nmでの吸光度測定による)。リポソーム/ドキソルビシン含有画分を収集する。

f) 最終のリポソームドキソルビシン濃度は、UV可視分光法によって480nmでのドキソルビシンの吸光度を測定することにより決定する。

【0081】

3.3. 酸化鉄ナノ粒子をカプセル化する「非熱感受性のリポソーム」(NTSL)の調製

工程a)で以下の脂質の組成物を用いた以外は、前述の操作(実施例3.1を参照)を続けた：水素化大豆ホスファチジルコリン(HSPC)、コレステロール(Chol)およびPEG化ジステアerylホスファチジルエタノールアミン(DSPE-PEG2000)が、モル比100:65:7(HSPC:Chol:DSPE-PEG2000)で。

工程a)、b)およびc)において、脂質フィルムの再水和、解凍サイクルおよび押出し法は、62℃で実施する。

【0082】

実施例4：ドキソルビシンおよび酸化鉄ナノ粒子の両方をカプセル化する熱感受性リポソームからの薬物放出の動力学

図3は、実施例3.2において調製されるようなドキソルビシン(DOX)担持酸化鉄を含んでいる熱感受性リポソーム(TSL)の放出動力学プロファイルを示す。ドキソルビシン放出は、温度及び時間の関数として、蛍光測定によって決定する。

ドキソルビシン放出プロファイルは、ドキソルビシンの自動消光特性を用いて特徴付けられる(Jeffrey K. Mills et al. Biochimica et Biophysica Acta 2005; 1716:77-96)。簡単には、DOXがリポソームの内部で高度に濃縮される場合、蛍光強度はクエンチされるが、DOXが外部媒体中で放出され、次に、希釈される場合は、蛍光強度は増加する。

蛍光測定は、 $\lambda_{\text{励起}} = 480\text{nm}$ および $\lambda_{\text{発光}} = 590\text{nm}$ で、Cary Eclipse (Varian)分光光度計で実施する。リポソームは、50%体積のウシ胎仔血清(FBS)で補足された、リン酸緩衝液食塩水(PBS)中で200倍希釈する。最初の蛍光強度 I_0 は、時間 $t=0$ 、および $T_0=25^\circ\text{C}$ で測定した。温度 T (37°C 、 41°C 、 43°C 、 45°C) に達する様に、薄められたサンプルを水浴中に注入する。異なるタイムポイントにおいては、サンプルが最初の温度(T_0)に達する様に水浴中に収集し注入する。次に、蛍光強度 $I_{\text{放出光}}$ を測定する。次に、トリトンTX100 (蒸留水中の10%体積) の0.1%体積を、ドキソルビシンの総量に対応する $I_{\text{全量}}$ を得るために、脂質膜をばらばらに壊すために添加する。 $t=0$ および $T_0=25^\circ\text{C}$ で存在するDOXの外側の%は、 $I_0/I_{\text{全量}}$ として計算される。そして、DOXの放出された% (温度の関数) は、 $I_{\text{放出光}}/I_{\text{全量}}$ として計算される。

【0083】

図3に示されるように、熱感受性のリポソーム溶液が 43°C (これは、このリポソーム組成物の主要なゲル-液晶相転移温度である T_m に相当する) 以上に加熱されるとき、アドリアマイシンの放出は最大である。この温度で、脂質のメンブレンは流体状態にある。また、その透過性上昇は、リポソームからの薬の放出を可能にする。

【0084】

実施例5： T_m で、または T_m 以上での加熱によって、酸化鉄ナノ粒子をカプセル化する熱感受性リポソームの膜透過性上昇 (および続いて起こる薬物放出) のMRIモニタリング。

r_1 および r_2^* の緩和能の決定は、緩和時間 T_1 および T_2^* の測定によって行った。その測定は、1.5テスラの臨床用MRI Philips Achievaを用い、ヘッドSENSEコイルを使用し、熱感受性のリポソーム(TSL) (実施例3.1) および非熱感受性のリポソーム(NTSL) (実施例3.3) (両方とも5nmサイズの酸化鉄ナノ粒子を装填したもの) について行ない、およびカプセル化されていない酸化鉄ナノ粒子(遊離NP (又は、遊離NP)) (実施例1) についても行なった。各サンプルの一連の希釈は、酸化鉄における40、20、10および $5\mu\text{g/mL}$ にそれぞれ対応して行なった。希釈はアガロースゲル(4%)中で行った。サンプルは、最初に 37°C 、その後 45°C で、水浴を使用して加熱した。また、各希釈の緩和時間 T_1 および T_2^* は 37°C 、および 45°C で測定した。

T_1 測定については、反転回復法シーケンスを使用した($TR/TI_{\text{最初}}/\Delta T_1 = 2000/50/100$ ミリセカンド、 $TE = 10$ ミリセカンド、 $NEX = 2$ 、 $FOV = (1 \times 1 \times 3\text{ mm})^3$ 、マトリックス = 12×168 、ここで、 TR = 繰り返し時間、 IT = 反転時間、 TE = エコー時間、 NEX = 励起回数、 FOV = viewのフィールド)。

速い勾配エコーシーケンスを、フリップ角 = 40° 、10エコー、 $TR/TE_{\text{最初}}/\Delta TE = 300/10/10$ ミリセカンド、 $NEX = 4$ で、 T_2^* 測定に使用した。

図4は、主要なゲル-液晶相転移温度 T_m (この温度で、脂質膜はその後流体状態にある) 以上の温度に対応する 45°C で加熱することによる緩和能値 r_1 (図4A) および r_2^* (図4B) の修正(modification)を示す。

【0085】

カプセル化されていない酸化鉄ナノ粒子 (遊離NP (又は、自由NP)) および酸化鉄を装填したNTSLは、 37°C および 45°C でそれぞれ加熱する前後の縦方向の緩和能 r_1 の重要な進展(evolution)を実証しなかった。対照的に、酸化鉄を装填したTSLの縦方向の緩和能 r_1 が、加熱によって 37°C での $r_1 = 0.1\text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ から 45°C での $r_1 = 1.68\text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ まで、10倍の増加を示す。

【0086】

カプセル化されていない酸化鉄ナノ粒子(遊離NP)および酸化鉄を装填したNTSLは、37℃および45℃でそれぞれ加熱する前後の横方向の緩和能 r_{2*} の重要な進展を実証しなかった。対照的に、酸化鉄を装填したTSLの横方向の緩和能 r_{2*} が、加熱によって、37℃での $r_{2*} = 208.7 \pm 23.4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ から45℃での $r_{2*} = 109.4 \pm 0.2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ まで、約2倍減少する。

【0087】

この実施例は、ナノ粒子の環境におけるプロトンの縦方向および横方向の緩和時間に対するTSLの脂質膜の透過性上昇の影響を実証する。この現象は、熱感受性のリボソーム溶液の T_m 以上の加熱前後での比率 r_{2*}/r_1 の進展として結果を提示することにより(表1を参照)、よく強調される。

【0088】

表1：TSL、NTSLおよび遊離NP(又は、自由なNP)についての加熱による比率 r_{2*}/r_1 の進展(evolution)

【表1】

温度(℃)	TSL	NTSL	遊離 NP
37℃	1000	150	33
45℃	67	128	28
k ^(*)	15	1,2	1,2

(*) kは、それぞれ、37℃および45℃での r_{2*}/r_1 値の間の比率を表わす。

加熱により、 r_{2*}/r_1 値の驚くほど著しい減少が、TSLについて実証される。しかし、NTSLおよび遊離NPとしての重要な進展は観察されない(k値を参照)。

【0089】

図5は、異なる希釈因子(酸化鉄中の40、20、10および5 μg/mL)について酸化鉄含有サンプル(TSL、NTSLおよび遊離したナノ粒子)のMR画像を示す。実験は、速い勾配エコーシーケンス(TR/TE = 300/10ミリ秒、NEX = 4、FOV = (1×1×3 mm)³、マトリックス = 128×168、フリップ角 = 40)を使用して、Philips Achievaにより1.5テスラで行なった。40 μg/mLの酸化鉄中の濃度については、熱感受性リボソーム(TSL)としてのMRIコントラストの変形が、加熱ではっきり目に見える：「亜信号(hyposignal)」は37℃で観察される。しかし、「超信号(hypersignal)」は45℃で得られる。重要な信号の変化は、非熱感受性のリボソーム(NTSL)および酸化鉄ナノ粒子(遊離NP)の両方について観察されなかった。

【0090】

T_m 以上の温度での加熱による比率 r_{2*}/r_1 のこの主な変形は、リボソーム脂質膜の透過性上昇の非常に感受性な「プローブ」を構成する。薬がリボソームの内部の酸化鉄ナノ粒子と共に共カプセル化されるとき、続いて起こる薬物放出は(実施例4.1を参照)、この著しいMRI信号伝達変形の検知によってモニターすることができる。

【0091】

更に、熱感受性リボソームの脂質膜透過性上昇のモニタリングは、先のT2*写像によって、および熱感受性のリボソーム溶液を T_m で又は T_m 以上を加熱した後に観察され得る。

図6において、超音波実験は、1.5TのMRIシステムのベッドに組み込まれた、手作りのモノラル焦点超音波振動子(Imasonic SA)で行なった。変換器は、1.5MHzの正弦波(sinusoidal)のシグナルと共に、80mmの焦点距離を有している。加温は60秒の間に20Wの音響出力で行なった。

アガロースゲル(4% - 2%シリカ)に含まれた酸化鉄ナノ粒子(20 μg/ml)を含んでいるTSLを使用した。

加熱により、熱感受性リボソームは、HIFU焦点(赤い矢印)ではっきり目に見える変化と共に

に、正確なMR信号およびT2*緩和時間増強を示した。平均では、ポジティブな増強は約51%であった。加温の前にT2*は 4.9 ± 0.4 ミリセカンドで、HIFU加熱の後に 54 ± 31.4 ミリセカンドまで増加した(赤い矢印)。

【0092】

結果は、薬物放出のリアルタイム画像化が今や可能であることを実証している。

【図1】

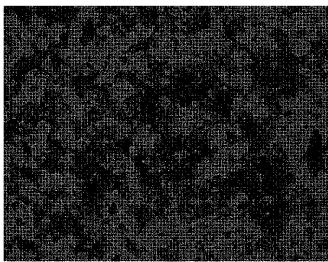
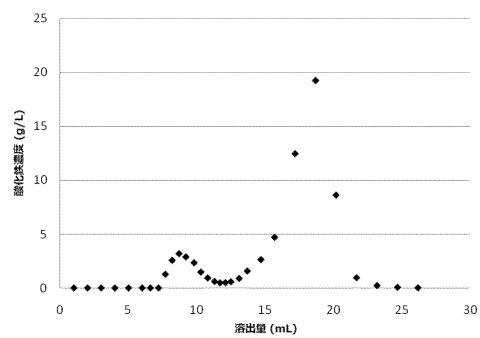
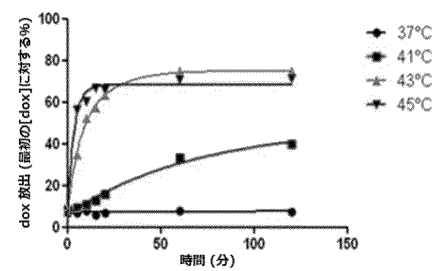


Figure 1

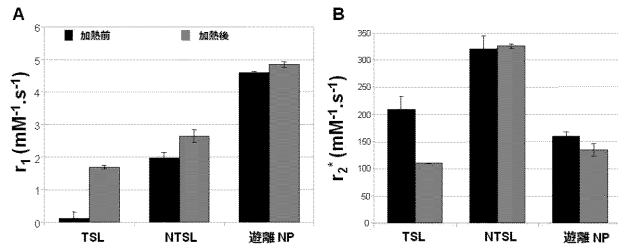
【図2】



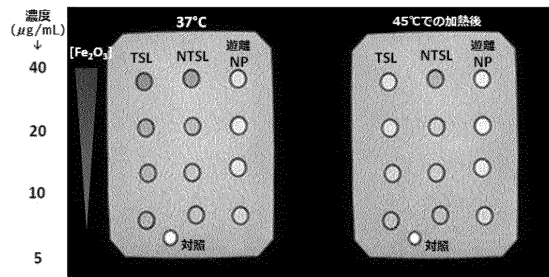
【図3】



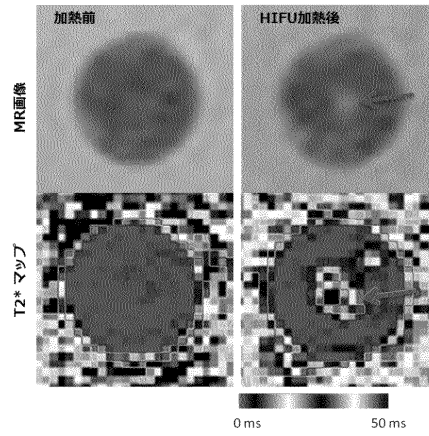
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/051510

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K9/127 A61K41/00 A61K49/18 A61K9/51
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

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

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

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2009/004258 A1 (YANG CHUNG-SHI [TW] ET AL) 1 January 2009 (2009-01-01) the whole document paragraph [0003] paragraph [0022] - paragraph [0024] paragraph [0028] paragraph [0033] - paragraph [0047] paragraph [0055] - paragraph [0056] paragraph [0066] - paragraph [0070] figures 6A-6D,9 claims 1-14 ----- -/-	1-13

☒ 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 application or patent but published on or after the international filing date

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

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

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

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

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

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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 August 2012

Date of mailing of the international search report

30/08/2012

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

Marchand, Petra

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/051510

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	W0 2008/033031 A2 (EPITARGET AS [NO]; FOSSHEIM SIGRID L [NO]; NILSSEN ESBEN A [NO]) 20 March 2008 (2008-03-20) page 1, line 4 - line 7 page 2, line 1 - page 3, line 14 page 5, line 13 - line 22 page 7, line 1 - page 8, line 5 page 9, line 32 - page 10, line 8 page 10, line 28 - line 31 page 11, line 18 - page 14, line 26 examples 1-6 figure 1 claims 1-11	1-13
A	EP 2 067 485 A1 (KONINKL PHILIPS ELECTRONICS NV [NL]) 10 June 2009 (2009-06-10) cited in the application paragraph [0001] paragraph [0009] - paragraph [0014] paragraph [0034] - paragraph [0050] paragraph [0053] - paragraph [0054] paragraph [0061] paragraph [0066] - paragraph [0068] example 1 figure 1 claims 1-17	1-13
A	AIME S ET AL: "Gd-loaded liposomes as T1, susceptibility, and CEST agents, all in one", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, DC; US, vol. 129, no. 9, 7 March 2007 (2007-03-07) , pages 2430-2431, XP002470078, ISSN: 0002-7863, DOI: DOI:10.1021/JA0677867 the whole document page 2430, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 2	1-13
A	W0 2008/035985 A2 (EPITARGET AS [NO]; FOSSHEIM SIGRID L [NO]; NILSSEN ESBEN A [NO]) 27 March 2008 (2008-03-27) page 1, line 5 - page 2, line 33 page 6, line 1 - line 14 page 12, line 13 - page 13, line 18 examples 1-3 figure 1 claims 1-11	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/051510

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2007/197904 A1 (VIGLIANTI BENJAMIN L [US] ET AL) 23 August 2007 (2007-08-23) paragraph [0003] paragraph [0034] - paragraph [0035] paragraph [0044] paragraph [0048] paragraph [0056] paragraph [0167] - paragraph [0168] paragraph [0184] - paragraph [0190] examples 1-12 paragraph [0268] - paragraph [0272] paragraph [0289] paragraph [0297] - paragraph [0298] claims 1-53 -----	1-13
A	ARRUEBO ET AL: "Magnetic nanoparticles for drug delivery", NANO TODAY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 2, no. 3, 4 May 2007 (2007-05-04), pages 22-32, XP022063172, ISSN: 1748-0132, DOI: DOI:10.1016/S1748-0132(07)70084-1 the whole document page 27, right-hand column, line 20 - page 28, left-hand column, last line -----	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/051510

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2009004258 A1	01-01-2009	TW 200900082 A US 2009004258 A1	01-01-2009 01-01-2009
WO 2008033031 A2	20-03-2008	EP 2068940 A2 NO 329127 B1 US 2010061938 A1 WO 2008033031 A2	17-06-2009 30-08-2010 11-03-2010 20-03-2008
EP 2067485 A1	10-06-2009	NONE	
WO 2008035985 A2	27-03-2008	EP 2066357 A2 US 2010158817 A1 WO 2008035985 A2	10-06-2009 24-06-2010 27-03-2008
US 2007197904 A1	23-08-2007	US 2007197904 A1 WO 2008082657 A2	23-08-2007 10-07-2008

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/704 (2006.01) A 6 1 K 31/704

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,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,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN

(74)代理人 100100158

弁理士 鯨島 睦

(74)代理人 100138900

弁理士 新田 昌宏

(74)代理人 100157174

弁理士 佐藤 洋

(74)代理人 100162684

弁理士 呉 英燦

(72)発明者 アニエス・ポティエ

フランス、エフー 7 5 0 0 6 パリ、リュ・ノートル・ダム・デ・シャン 7 7 番

(72)発明者 ローラン・レヴィ

フランス 7 5 0 1 4 パリ、ブルヴァール・ラスパイユ 2 4 6 番

(72)発明者 マリーエディス・メイル

フランス、エフー 7 5 0 1 2 パリ、ブルヴァール・スール 6 5 番

(72)発明者 マテュー・ジェルマン

フランス、エフー 9 4 5 0 0 シャンピニー・シュル・マルヌ、アヴニュ・マルクス・ドルモワ 3 番、パティマン 4

(72)発明者 シリル・ロアンザト

オランダ、エヌエルー 3 5 1 4 ハーヘー・ユトレヒト、ピーテル・ニューラントストラート 1 1 5 ベー番

(72)発明者 クリ・ムーナン

オランダ、エヌエルー 6 0 3 9 ヘーイェー・ストランプロイ、フランス・ストラウクス・ストラート 5 番

(72)発明者 ピエール・スミルノフ

フランス、エフー 1 7 0 0 0 ラ・ロシェル、リュ・ドゥ・カレ 2 4 番

F ターム (参考) 4C076 AA19 AA95 CC27 DD29 DD63 DD70 EE23 FF68

4C086 AA10 EA10 MA01 MA04 MA24 NA13 ZB26