

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁶
A61K 51/08

(11) 공개번호 특2000-0052830
(43) 공개일자 2000년08월25일

(21) 출원번호	10-1999-7003659	(87) 국제공개번호	WO 1998/18500
(22) 출원일자	1999년04월27일	(87) 국제공개일자	1998년05월07일
번역문제출일자	1999년04월27일		
(86) 국제출원번호	PCT/GB1997/02953		
(86) 국제출원출원일자	1997년10월28일		
(81) 지정국	AP ARIPO특허 : 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 우간다 가나 짐바브웨 EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐스탄 몰도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투갈 스웨덴 핀란드 OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 중앙아프리카 콩고 코트디부아르 카메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고 국내특허 : 알바니아 아르메니아 오스트리아 오스트레일리아 아제르바이잔 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 벨라루스 캐나다 스위스 중국 쿠바 체코 독일 덴마크 에스토니아 스페인 핀란드 영국 그루지야 헝가리 이스라엘 아이슬란드 일본 케냐 키르기즈 북한 대한민국 카자흐스탄 세인트루시아 스리랑카 라이베리아 레소토 리투아니아 룩셈부르크 라트비아 몰도바 마다가스카르 마케도니아 몽고 말라위 멕시코 노르웨이 뉴질랜드 슬로베니아 슬로바키아 타지키스탄 투르크메니스탄 터어키 트리니다드토바고 우크라이나 우간다 미국 우즈베키스탄 베트남 폴란드 포르투갈 루마니아 러시아 수단 스웨덴 싱가포르 인도네시아 가나 유고슬라비아		
(30) 우선권주장	9622369.8	1996년10월28일	영국(GB)
	9622366.4	1996년10월28일	영국(GB)
	9702195.0	1997년02월04일	영국(GB)
	9708265.5	1997년04월24일	영국(GB)
	9711839.2	1997년06월06일	영국(GB)
	9711837.6	1997년06월06일	영국(GB)
(71) 출원인	니코메드 이미징 에이에스 조오지 디빈센조, 토브 아스 헬지, 에바 요한손		
(72) 발명자	노르웨이 오슬로 4, 니코비엔 2(우편번호 0485) 클라베네스,요 노르웨이엔-1166오슬로미드토센5 퉁베트, 폴 노르웨이엔-0401오슬로토르쇼브피.오. 박스4220니코바이엔2니코메드이미징 에이에스 회그세트, 안데르스 노르웨이엔-0681오슬로32아트레스케븐 틀레샤우그, 헬게 노르웨이엔-0401오슬로토르쇼브피.오. 박스4220니코바이엔2니코메드이미징 에이에스 쿠트베르트슨, 알란 노르웨이엔-0401오슬로토르쇼브피.오. 박스4220니코바이엔2니코메드이미징 에이에스		

고달, 아슬락

노르웨이엔-0365오슬로네드레실케스트로

호프, 라르스

노르웨이엔-0480오슬로오센가타29

고그스타트, 가이르

노르웨이엔-0494오슬로크제틸스바이8비

브린, 클라우스

노르웨이엔-0401오슬로토르쇼브피.오. 박스4220니코바이엔2니코메드이메이징
에이에스

네베스타트, 안네

노르웨이엔-0485오슬로탐부르바이엔13케이

뢰프하우그, 다그핀

노르웨이엔-0401오슬로토르쇼브피.오. 박스4220니코바이엔2니코메드이메이징
에이에스

헬레부스트, 할디스

노르웨이엔-0765오슬로올라프볼스브이.36

솔바켄, 마그네

노르웨이엔-0401오슬로토르쇼브피.오. 박스4220니코바이엔2니코메드이메이징
에이에스

(74) 대리인

장수길, 김영

심사청구 : 없음

(54) 진단/치료제 또는 그와 관련된 개선

요약

수성 담체액 중 가스 함유 또는 가스-발생 물질로 이루어진 리포터의 현탁액을 포함하며, 표적과 함께 2 가지 형태 이상의 결합쌍을 형성할 수 있는 것을 특징으로 하는 표적 추적가능한 진단 및(또는) 치료적 활성제.

색인어

진단 및(또는) 치료적 활성제, 초음파 조영제, 리포터, 마이크로버블.

명세서

본 발명은 진단 및(또는) 치료적 활성제, 더욱 특히 신체내 부위 및(또는) 구조와 상호작용하거나 그에 친화성을 갖는 잔기와 혼합된 진단 및(또는) 치료 활성제에 관한 것으로서, 신체내 특정 부위의 진단 영상화 및(또는) 치료가 개선될 수 있다. 하기에 표적 초음파 조영제로서 언급된 초음파 영상을 사용하기 위한 진단제가 특히 관심이 되고 있다.

초음파 영상은 예를 들면, 혈관계, 특히 심장기록법 및 조직 미세혈관계의 연구에서 효과적이며 가치있는 진단 도구를 구성한다고 공지되어 있다. 수득한 음향 화상을 증가시키기 위해 고체 입자, 유화 액적, 가스 버블 및 캡슐화된 가스 또는 액체의 현탁액을 포함하는 다양한 조영제가 제안되었다. 일반적으로 용이하게 압축가능한 저밀도 조영제가 그들이 만들어낸 음향의 후방 산란면에서 특히 효과적인 것으로 인식되어 있어서 가스-함유 및 가스-발생 시스템의 제조에 상당한 관심이 나타났다.

가스-함유 조영제는 또한 예를 들면, MR 신호 세기를 감소시키는 작용을 하는 자화성 조영제로서 자기 공명 (MR) 화상에서도 효과적인 것으로 공지되어 있다. 또한, 산소-함유 조영제도 효과적인 유용한 상자성 MR 조영제를 대표한다.

또한, X-선 영상 분야에서 이산화탄소와 같은 가스가 네가티브 경구 조영제 또는 혈관내 조영제로서 사용될 수 있다는 것도 관찰되었다.

방사성 가스, 예를 들면 크세논과 같은 불활성 가스의 방사성 동위원소도 신티그램 촬영법, 예를 들면 혈액 영상에 사용된다.

표적 초음파 조영제는 (i) 초음파 조사와 상호작용하여 검출가능한 신호를 발생시킬 수 있는 리포터 잔기; (ii) 특히 신체내 표적 부위 및(또는) 구조, 예를 들면 병리의 특정 세포 또는 영역에 대한 친화성을 갖는 하나 이상의 벡터; 및 (iii) 상기 리포터 및 벡터(들)를 연결하는 하나 이상의 결합제 (결과적으로 이들을 직접 결합시키지는 않음)를 포함하는 것으로 여겨질 수 있다.

진단/치료제가 결합하고자 하는 분자 및(또는) 구조를 이하 표적이라고 언급한다. 신체내 선택된 영역/구조에서 특정 화상 또는 치료 효과를 수득하기 위해 표적은 이 영역/구조에 존재하고 유용해야 한다. 이상적으로는, 관심있는 영역에만 발현되지만, 후방 문제를 일으킬 수 있는 신체내 기타 위치에 존재하기도 한다. 이 표적은 분자중 (예를 들면, 표적 분자) 또는 영상화 및(또는) 치료할 영역에 존재하는 미지의 분자 또는 더욱 복잡한 구조로 정의될 수 있고, 주어진 벡터 분자에 특이적으로 또는 선택적으로 결합할 수 있다.

이러한 벡터는 영상화 및(또는) 치료할 영역/구조에 이러한 잔기를 결합시키기 위해 리포터 잔기에 부착 또는 결합된다. 벡터는 선택된 표적에 특이적으로 결합할 수 있거나, 단지 선택적으로 결합하며, 제한된 수의 기타 분자/구조에 대한 친화성을 가져서 다시 후방 문제를 일으킬 수 있다.

표적 초음파 조영제에 관계된 제한된 선행 기술이 존재한다. 따라서, 예를 들면 US-A-5531980은 리포터가 충상 또는 충상 형태에서 적어도 부분적으로 존재하는 하나 이상의 필름-형성 계면활성제 (이 계면활성제는 '특정 표적 목적을 위해 디자인된 생활성 중'을 포함하는 하나 이상의 벡터에 결합되어 있음)에 의해 안정화된 공기 또는 가스 마이크로버블의 수성 현탁액을 포함하는 리포터인 시스템에 관한 것이다. 마이크로버블이 계면활성 물질에 의해 직접 캡슐화되지 않지만, 마이크로버블을 안정화시키는 액체 충전된 리포솜에 혼합된다고 언급되어 있다. 이러한 리포솜에 존재하는 인지질과 같은 충상 또는 충상 계면활성 물질은 필연적으로 친유성 테일 '백-투-백(back-to-back)' 및 안쪽과 바깥쪽 모두에 친수성 헤드를 갖는 하나 이상의 지질 이중층의 형태로 존재한다(예를 들면, 문헌[Schneider, M. on 'Liposomes as drug carriers: 10 years of research' in Drug targeting, Nyon, Switzerland, 3-5 October 1984, Buri, P. and Gumma, A. (Ed), Elsevier, Amsterdam 1984] 참조).

EP-A-0727225는 리포터가 충분한 증기압을 가진 화합물을 포함하여 그 비율이 피검자의 신체 온도에서 가스상인 표적 초음파 조영제를 기재하고 있다. 이 화합물은 벡터로서 단백질-, 펩티드- 또는 탄수화물-기재 세포 부착 분자 리간드를 포함하는 계면활성제 또는 알부민 담체와 결합한다. 이러한 조영제내 리포터 잔기는 WO-A-9416739에 기재된 상 전이 콜로이드 시스템에 상응하며; 이는 현재 이러한 상 전이 콜로이드의 투여가 비조절적으로 성장하여, 가능하게는 예를 들면, 심근 혈관계 및 뇌의 위험한 색전화를 일으키는 마이크로버블의 발생을 초래할 수 있다고 인식되어 있다(예를 들면, 문헌[Schwarz, Advances in Echo-Contrast [1994(3)], pp 48-49] 참조).

WO-A-9320802는 조직-특이성 초음파 화상 개선이 항체, 펩티드, 렉틴 등과 같은 조직-특이성 리간드에 결합된 음향적으로 반사성인 올리고충상 리포솜을 사용하여 성취될 수 있음을 제안하였다. 이 리포솜은 가스를 제거하기 위해 신중히 선택되고 가스-기재 초음파 조영제의 유리한 반향성을 가지지 않는다. 또한, 예를 들면, 피브리, 트롬비 및 아테롬성 동맥경화성 영역에 대한 표적에서 이 기술에 대한 참고 문헌이 알카논유크셀(Alkanonyuksel, H.) 등의 문헌[J. Pharm. Sci. (1996) 85(5), 486-490; J. Am. Coll. Cardiol. (1996) 27(2) Suppl A, 298A; and Circulation, 68 Sci. Sessions, Anaheim 13-16 November 1995]에서 발견된다.

또한, 중요한 실제적 자세한 사항을 주지 않는 벡터로서 모노클로날 항체의 가능한 사용 및(또는) 세망내 피계에 의해 용해될 수 있는 물질을 포함하는 리포터통과시 언급되는 초음파 조영제에 관한 다수의 공개 문헌이 있어서 간과 같은 기관의 화상 개선을 가능하게 한다 - 예를 들면, WO-A-9300933, WO-A-9401140, WO-A-9408627, WO-A-9428874, US-A-5088499, US-A-5348016 및 US-A-5469854 참조. 통상적으로, 표적 세포에 집중시키기 위해서, 선행 기술의 표적된 조영제는 하나의 표적에 강하게 결합하는 하나의 벡터를 사용함으로써 신체내 특정 위치, 예를 들어, 종양 세포에서 콘트라스트를 증가시키는 경향이 있다. 하나의 벡터에 높은 친화성으로 결합하는 하나의 벡터를 사용하는 이러한 원리에 반하여, 본 발명은 다수 종류의 벡터-표적 상호작용(예를 들어, 동일하거나 상이한 세포 타입상의 다른 표적에 대하여 친화성을 갖는 다수의 상이한 벡터 및(또는) 하나 이상의 벡터와 관련된 제제를 포함)을 사용함으로써 보다 유리한 특성을 갖는 진단 및(또는) 치료 활성제를 얻을 수 있다는 발견에 부분적으로 기초한다. 이렇게 하여, 가스-함유 및 가스-발생 진단 및(또는) 치료제의 결합은 예를 들어, 낮거나 높은 친화성으로, 하나 이상의 수용체에 대하여 특이성을 갖는 하나의 벡터 사이 또는 하나 이상 표적 타입에 대하여 친화성을 갖는 하나 이상의 벡터 사이에 다중 결합쌍을 형성함으로써 달성할 수 있다. 하나 이상의 표적 분자/구조물에 벡터-결합된 제제의 그러한 다중 결합은, 예를 들어, 표적 특이성을 증가시키고(거나) 신체내 그외에 발현된 표적에 보다 낮은 수준의 유사한 분자/구조물과 기본적인 상호작용으로부터 목적하는 표적 부위에서 상호작용을 현저하게 함으로써 유리한 표적 특성을 생성할 수 있다.

하나의 표적에 높은 친화성으로 결합하는 하나의 벡터를 사용하는 것이 잘 공지되어 있다. 그러나, 본 발명은 하나의 타입의 벡터와 하나의 타입의 표적 사이에 낮은 친화성으로 다수의 결합쌍을 형성함으로써 또는 낮거나 높은 친화성으로 하나 이상의 타입의 벡터와 하나 이상의 타입의 표적 사이에 다수의 결합쌍을 형성함으로써 가스-함유 및 가스-발생 진단 및(또는) 치료제의 목적하는 결합을 얻을 수 있다는 발견에 기초하고 있다. 따라서, 하나 이상의 표적 분자/구조물에 대하여 벡터 결합된 제제의 다수 결합은 예를 들어, 표적 특이성을 증가시키고(거나) 신체내 그외에 발현된 표적에 대하여 보다 낮은 수준의 분자/구조물과 기본적인 상호작용으로부터 목적하는 표적 부위에서 상호작용을 현저하게 함으로써 유리한 표적 특성을 가질 수도 있다.

따라서, 본 발명의 한 특징에 따라 표적가능한 진단 및(또는) 치료적 활성제, 예를 들면 수성 담체액 (예를 들면, 주입가능한 담체액) 중에서 가스-함유 또는 가스-발생 물질을 함유하는 리포터의 현탁액을 포함하며, 2 개 이상 타입의 결합쌍을 형성할 수 있는 것, 예를 들면, 2 개 이상의 결합 위치에 결합할 수 있는 2 개 이상의 벡터에 또는 하나의 벡터에 결합되는 것을 특징으로 하는 초음파 조영제가 제공된다.

본 발명의 하나의 유리한 실시 대양은 표적에 대한 제한된 부착이 진단 및(또는) 치료적 활성제의 매우 유용한 성질이며, 이 성질이 표적에 대한 고정된 부착보다 일시적 유지를 수득하는 벡터를 사용하여 성취될 수 있다는 추가의 발견에 기초한다. 따라서 이러한 진단 및(또는) 치료적 활성제는 특정 부위에서 고정적으로 유지되기 보다는, 예를 들면 내피 세포와의 일시적 상호반응에 의해 혈관성 내피와 함께 지연된 흐름의 형태로 유효하게 존재할 수 있다. 따라서, 이러한 진단 및(또는) 치료적 활성제는 초음파 조영제가 해부학적 특징이 결여된 혈류의 벌크에 대해 개선된 반향성을 제공하는 경우에 혈관 벽 상에 농축될

수 있다. 따라서, 이들 진단 및(또는) 치료적 활성제는 미세혈관을 포함하는 모세관 시스템의 개선된 화상을 허용할 수 있으며, 예를 들면 심장에서 정상 및 부적절하게 살포된 조직 사이의 구별을 용이하게 할 수 있고, 쿠퍼 세포, 트롬비 및 아테롬성 동맥경화성 손상과 같은 구조를 시각화하거나 신생-혈관 및 염증 조직 영역의 시각화에 유용할 수 있다. 본 발명은 특히 조직 과사의 영역에 위치한 정상 혈관에서 발생하는 화상 변화에 적합하다.

결합 친화성은 상호작용의 수 및 그의 강도에 의존적이라고 생각된다. 따라서, 특정 제제 및 표적간의 상호작용의 정도를 조절하기에 적당하도록 수용체 단위의 표면에서의 벡터 분자의 밀도를 선택할 수도 있다.

또한, 다중-특이성이라는 용어는 하나 이상의 세포 표면 수용체에 대하여 특이성을 가지고, 동시에 치료학적 반응을 유도하는 기질 또는 수용체계 결합에 대한 특이성을 갖는 제2 성분을 포함하는 하나 이상의 벡터로 구성되는 가스-함유 또는 가스-발생 물질의 주사가능한 담체액을 나타내는데 사용된다. 따라서, 란자 (Lanza) 등의 문헌[Circulation, (1996) 94(12), pp 3334]에 기재된 안티-피브리린 항체와 같은 표적성 벡터, YRALVDTLK와 같은 안백신 V 아테롬성 혈소판 결합 펩티드 또는 피브리린 혈응고 결합한다고 알려진 임의의 다른 벡터를 포함하는 다중-특이 영상제는 스트렙토키나제, 플라스미노겐 활성제(tPA), 우로키나제(uPA) 또는 프로우로키나제(scuPA)와 같이 피브리노겐 활성을 가짐으로서 국부적인 항트롬보 치료 효과를 갖는 약물 또는 효소와 함께 본 발명의 범위내에 포함된다. 또한, 본 발명은 종양 성장을 억제할 수 있는 화학요법제로서 작용하는 벡터 또는 약물 분자와 함께 종양 세포에 대한 증가된 특이성을 갖는 벡터를 포함하는 것으로 확대된다.

모두는 아니지만, 많은 표적 분자가 표적 위치에 단독으로 발현되지 않는 것으로 공지되어 있다; 공동 위치에서는 표적 세포에 의해서 그러한 분자가 과도 발현되거나, 그러나 표적 구조물에서는 체내 그 밖의 위치에서 보다 낮은 수준으로 발현된다. 이러한 상태에서는 표적에 대하여 비교적 낮은 친화성을 갖는 벡터의 다중성을 갖는 리포터의 사용하는 것이 유리할 수도 있는데, 이유는 그 때 리포터가 리포터에 다중(및 또한 강한) 결합을 가능하게 하는 높은 표적 밀도의 부위에 집중되는 경향이 있기 때문이다(예를 들어, 종양 세포로서 과도 발현되는 염산 수용체 및 글루타티온-S-트라스퍼라제 수용체 각각에 결합하는 벡터 염산 및 글루타티온을 도입하는 가스-함유 제제). 다른 한편으로, 낮은 표적 밀도 부위는 표적을 결합하는 그러한 낮은 친화성 벡터와 충분한 상호작용을 제공하지 않을 것이다. 본 발명의 이러한 실시태양에서, 낮은 친화성의 벡터는 $10^8 M^{-1}$ 미만, 예를 들어, $10^7 M^{-1}$ 미만, 바람직하게는 $10^6 M^{-1}$ 미만의 표적 분자 또는 구조물과의 상호작용에 대한 결합 상수 K_d 를 갖는 것으로 간주될 수 있다. 따라서, 본 발명의 추가의 실시태양은 가스-함유 및 가스-발생 진단 및(또는) 치료제의 목적하는 결합은 하나 이상의 벡터 타입 및 하나 이상의 표적 간의 낮은 친화성을 갖는 결합쌍을 형성함으로써 얻을 수 있다는 발견에 기초하고 있다. 그러므로, 다중 벡터는 특이성을 증가시키는데 사용될 수 있고, 리포터는 단지, 표적 분자의 특정 결합을 나타내는 표적 세포 또는 구조물에 결합할 것이다.

또한, 증가된 결합력을 생성하기 위해서는, 표적 구조물의 예를 들어, 에피토프와 같은 다른 부분에 결합하는 복수개의 벡터를 선택하는 것이 유용할 것이다. 이는 특히 표적 밀도가 낮을 때 유리할 것이다.

다른 특이성을 갖는, 즉, 다른 세포상에서 다른 표적 분자에 결합하는 2 개 이상의 벡터를 포함하는 생성물이 예를 들어, 양의 다른 형태와 같이 일정 범위의 질병 검출을 위한 '일반적인 목적용' 제제로서 유리하게 사용될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 이러한 제제의 사용은 메타스타제의 검출을 가능하게 하고, 표적 분자(예를 들어, 항원)의 발현에 대하여 종종 불균질하다.

본 발명의 범위에서, 리포터 단위는 통상적으로 벡터에 결합하여 존재할 것이다. 종종, 예비-표적겨냥이라고 불리는 표적 과정의 또다른 타입에서, 벡터(종종, 모노클로날 항체)는 단독으로 투여되고, 후속해서 리포터는 벡터 분자를 특이적으로 커플링할 수 있는 잔기에 결합하여 투여된다(벡터가 항체인 경우, 리포터는 단백질 A 또는 항-면역글로불린 항체와 같은 면역글로불린-결합 분자에 결합될 수 있다). 이러한 프로토콜의 장점은 그의 표적을 결합하지 않는 벡터 분자의 제거를 위한 시간이 허락되어, 실질적으로 과량의 리포터-벡터 결합체의 존재와 관련된 근본적인 문제가 감소된다는 것이다. 본 발명에서는 하나의 특이적인 벡터, 또다른 벡터에 커플링되는 리포터 단위 및 제1 벡터와 결합하는 잔기를 예비 표적으로 하는 것을 들 수 있다. 본 발명에서 몇몇 경우 및 특히, 심근과 같은 특정 부위의 혈액 환류 속도의 평가에서 표적에 결합되는 초음파 조영제를 대체시키거나 표적으로부터 탈리시키는 속도를 측정하는 것이 중요하다. 이는 표적으로부터 조영제를 대체시키거나 탈리시키는 벡터 또는 다른 제제의 후속 투여에 의한 조절된 방식으로 달성될 수 있다.

본 발명에 따른 유용한 벡터는 세포 부착 단백질에 대한 리간드 및 내피 세포 표면상의 상응하는 리간드를 갖는 세포 부착 단백질 그 자체를 포함한다. 세포 부착 단백질의 예로는 인테그린이 있고, 이들의 대부분은 Arg-Gly-Asp(RGD) 아미노산 서열에 결합한다. 필요하다면, 벡터는 주로, 염증 또는 다른 병리학적인 반응 위치 또는 그의 가까에서 발견되는 것과 같은 활성화된 내피 세포상에 발현되는 특정 세포 부착 단백질에 대하여 표적이 될 수도 있다. 사용될 수 있는 다른 벡터는, 대부분의 세포에서 발견되는 단백질 및 솔페이트화된 폴리사카라이드의 복합체인 세포-표면 프로테오글리칸에 결합하는 단백질 및 펩티드를 포함한다. 그러한 프로테오글리칸은 척추 동물로부터의 모든 유핵 세포를 음성의 표면 전하를 띠게 한다. 또한, 본 발명에 있어서 이러한 전하는 예를 들어, 양이온 지질을 함유하는 양성 전하의 벡터를 사용함으로써 내피 표면과 정전기적으로 상호작용하는데 사용될 수 있다.

본 발명의 추가적인 측면은 벡터(들)가 예를 들어, 이들이 표적 또는 수용체에 쉽게 노출되지 않는 방식으로 리포터에 부착하거나 비공유결합적으로 리포터 중에 포함된다는 것이다. 그러므로, 예를 들어, 벡터를 함유하는 잔기의 확산 능력을 변화시키기 위해서 제제를 투여 후 외부 초음파에 노출시키는 것과 같이, 벡터를 노출시키는 부가적인 공정을 적용함으로써 증가된 조직 특이성을 달성할 수 있다.

리포터는 예를 들어, 임의의 적당한 가스-함유 또는 가스-발생 초음파 조영제 제형의 임의의 간단한 형태일 수 있다. 그러한 제형의 대표적인 예로는 내용집성 표면막(예를 들어, WO-A-8002365에 기재된 것과 같은 젤라틴), 필모겐 단백질(예를 들어, US-A-4718433, US-A-4774958, US-A-4844882, EP-A-0359246, WO-A-9112823, WO-A-9205806, WO-A-9217213, WO-A-9406477 또는 WO-A-9501187에 기재된 것과 같은 사람

혈청 알부민과 같은 알부민), 중합체 물질(예를 들어, EP-A-0398935에 기재된 것과 같은 합성 생분해성 중합체, EP-A-0458745에 기재된 것과 같은 탄성 계면 합성 중합체막, EP-A-0441468에 기재된 것과 같은 미세입자 생분해성 폴리알데히드, WO-A-9317718 및 WO-A-9507434에 기재된 것과 같은 폴리아미노산의 미세입자 N-디카복실산 유도체-폴리시클릭 이미드), 비중합체 및 비중합성 벽-생성 물질(예를 들어, WO-A-9521631에 기재된 것과 같음) 또는 계면활성제(예를 들어, 플루로닉(Pluronic)과 같은 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 공중합체 계면활성제, WO-A-9506518에 기재된 것과 같은 중합체 계면활성제, 또는 WO-A-9211873, WO-A-9217212, WO-A-9222247, WO-A-9428780 또는 WO-A-9503835에 기재된 것과 같은 중합체 계면활성제)으로 가스 안정화된(예를 들어, 최소한 부분적으로 캡슐화됨) 마이크로버블이다.

다른 유용한 가스-함유 조영제 제형은 내부에 가스를 함유하거나 달리 그와 관련된 미세입자(특히, 미세입자 덩어리)와 같은 가스 함유 고체계를 포함한다(예를 들어, EP-A-0122624, EP-A-0123235, EP-A-0365467, WO-A-9221382, WO-A-9300930, WO-A-9313802, WO-A-9313808 또는 WO-A-9313809에 기재된 바와 같은 보이드, 캐비티 또는 공극내에 포함되고(거나) 그의 표면에 부착되는 것과 같음). 이러한 미세입자 조영제의 반향성은 고체 물질(예를 들어, 미세입자 구조물의 용해시)로부터 유리된 가스(예를 들어, 마이크로버블) 및(또는) 가스 함유된/관련된 가스로부터 직접 유도될 수 있다고 생각된다.

가스-함유 조영제 제형과 관계된 상기 서술한 문헌은 본 명세서에 참고문헌으로 인용되어 있다.

가스 마이크로버블 및 미세입자와 같은 다른 가스-함유 물질은 정맥 주사와 같은 투여 후 폐동맥계를 통하여 자유롭게 통과시킬 수 있도록 하기 위해서 바람직하게는, 10 μm (예를 들어, 7 μm 이하)를 넘지 않는 초기 평균 크기를 갖는다.

본 발명에서 인지질-함유 조성물이 예를 들어, 인지질-안정화된 가스 마이크로버블의 형태로 사용되는 경우, 유용한 인지질의 대표적인 예로는 레시틴(즉, 포스파티딜콜린), 예를 들어, 에그 요크 레시틴 또는 대두 레시틴과 같은 천연 레시틴, 또는 합성 또는 반합성 레시틴, 예를 들어, 디미리스토일포스파티딜콜린, 디팔미토일포스파티딜콜린 또는 디스테아로일포스파티딜콜린; 포스파티드산; 포스파티딜에탄올아민; 포스파티딜세린; 포스파티딜글리세롤; 스프링고미엘린; 플루오르화된 상기 임의의 동족체; 상기의 혼합물 및 콜레스테롤과 같은 다른 지질과의 혼합물을 들 수 있다. 예를 들어, 천연 발생(예를 들어, 유도된 에그 요크 또는 대두), 반합성(예를 들어, 부분적으로 또는 전체적으로 수소첨가됨) 및 합성 포스파티딜세린, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딜이노시톨, 포스파티드산 및(또는) 카르디오피린과 같은 전체적인 전하, 예를 들어, 음전하를 갖는 분자를 포함하는 인지질의 다량 사용(약 75% 이상)하는 것이 특히 유리할 수 있다.

가스-함유 조영제를 제조하는데 사용될 수 있는 지질의 다른 예로서는 지방산, 스테아르산, 팔미트산, 2-n-헥사데실스테아르산, 올레산 및 지질 구조를 함유하는 다른 산이 있다. 이들 지질 구조는 특히, 하나 이상의 아미노산과 커플링시에 특히 중요하게 생각된다. 생성되는 지질 변화된 아미노산(예를 들어, 디팔미토일리신, 디스테아로일-2,3-디아미노프로피온산)이 하나 이상의 벡터 분자의 결합을 위한 커플링 위치를 특징짓는 관능화된 스페이서 성분의 부착을 위한 유용한 전구체로서 생각된다.

본 발명의 또다른 측면은 링커 부분(예를 들어, PEG, 폴리아미노산, 알킬할라이드 등)에 부착된 지질 리포터를 포함하는 리포펩티드 구조물의 합성에 관한 것이며, 상기 링커는 하나 이상의 벡터 분자를 커플링 하기 위하여 적당하게 관능화된다. 음하전된 막과의 정전기적 상호 작용을 통하여 마이크로버블내 리포터 성분의 고정화를 위하여 하전된 링커 성분(예를 들어, 2 개 이상의 리신 잔기)을 포함하는 것이 특히 바람직하다. 인지질 가스 함유 구조물과 하나 이상의 표적된 리포펩티드 서열과의 혼합 및 '도핑'에 의해서 다중-특이 표적겨냥을 달성할 수 있다. 또한, 탐(Tam) 등의 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 9084]에 기재된 바와 같이, 분지된 리신 코어 구조물상에 하나 이상의 벡터를 조립함으로써 다중-특이성을 얻을 수 있다. 또한, 로우에(Lowe) 등의 문헌[Combination Chemistry, Chemical Society Reviews, 1995, 309-317]에 기재된 바와 같이, 화학적 합성에 의해서 합성된 조합적 라이브러리(combinatorial libraries)를 포함하는 리포펩티드 또는 인지질을 사용하여 다중-특이성을 달성할 수 있다.

또한, 세포 표면에 위치하는 수용체 분자와 비특이적 반응을 위한 하나 이상의 반응성기를 갖는 관능화된 마이크로버블도 본 발명의 범위에 속한다. 티올 잔기를 포함하는 마이크로버블은 예를 들어, 디술피드 교환 반응을 통하여 세포 표면 수용체에 결합할 수 있다. 이러한 공유 결합의 가역적인 성질은 레드스 환경을 변화시킴으로써 버블 유동이 조절가능하다는 것을 의미한다. 유사하게, N-히드록시숙신이미드 에스테르와 같은 활성 에스테르를 포함하는 막의 '활성화된' 마이크로버블은 세포 표면 분자의 다중성으로 밝혀진 아미노산을 변형시키는데 사용할 수 있다.

본 발명에 따라서 유용할 수도 있는 가스-함유 미세입자 물질의 대표적인 예는 카르보히드레이트(예를 들어, 헥소스, 예를 들어, 글루코스, 프럭토스 또는 갈락토스; 디사카라이드, 예를 들어, 슈크로스, 락토스 또는 말토스; 펜토스, 예를 들어, 아리비노스, 자일로스 또는 리보스; α -, β - 및 γ -시클로덱스트린; 폴리사카라이드 예를 들어, 전분, 히드록시에틸 전분, 아밀로스, 아밀로펙틴, 글리코겐, 이눌린, 풀룰란, 덱스트란, 카르복시메틸 덱스트란, 덱스트란 포스페이트, 케토덱스트란, 아미노에틸덱스트란, 알기네이트, 키틴, 키토산, 히알루론산 또는 헤파린; 및 당알코올, 알디톨, 예를 들어, 만니톨 또는 솔비톨), 무기염(예를 들어, 염화나트륨), 유기염(시트르산나트륨, 아세트산나트륨 또는 타르트르산나트륨), X-레이 조영제(예를 들어, 예를 들어, 메트리조산, 디아트리지산, 이오탈람산, 이옥사글산, 이오헥솔, 이오펜톨, 이오파미돌, 이오딕사놀, 이오프로미드, 메트리아미드, 이오디파미드, 메글루민, 이오디파미드, 메글루민 아세트리오에이트 및 메글루민 디아트리지오에이트와 같이, 3- 및(또는) 5-위치에서 카복실, 카르바모일, N-알킬카르바모일, N-히드록시알킬카르바모일, 아실아미노, N-알킬아실아미노 또는 아실아미노에틸과 같은 치환체를 갖는 하나 이상의 2,4,6-트리옥소도페닐기를 함유하는 임의의 시판용 카르복실산 및 비이온 아마이드 조영제) 및 폴리펩티드 및 단백질(예를 들어, 사람 혈청 알부민과 같은 젤라틴 또는 알부민)이다.

본 발명에 따라서 조영제의 리포터내에 임의의 생물상용성 가스가 존재할 수도 있으며, 본 명세서에서 사용된 '가스'라는 용어는 37 °C의 정상 인체 온도에서 실질적으로 거의 가스(증기 포함) 형태의 임의의 물

질(혼합물을 포함함)을 포함한다. 따라서, 예를 들어 가스는 공기; 질소; 산소; 이산화탄소; 수소; 헬륨, 아르곤, 크세논 또는 크립톤과 같은 불활성 가스; 헥사플루오르화황, 데카플루오르화이황 또는 펜타플루오르화트리플루오로메틸황과 같은 플루오르화황; 헥사플루오르화셀레늄; 메틸실란 또는 디메틸실란과 같은 임의로 할로겐화된 실란; 저분자량 탄화수소 (예를 들면, 7 개 이하의 탄소 원자를 포함), 예를 들면 에탄, 프로판, 부탄 또는 펜탄과 같은 알칸, 시클로프로판 또는 시클로펜탄과 같은 시클로알칸, 에틸렌, 프로펜, 프로파디엔 또는 부텐과 같은 알켄, 또는 아세틸렌 또는 프로핀과 같은 알킨; 디메틸 에테르와 같은 에테르; 케톤; 에스테르; 할로겐화 저분자량 탄화수소 (예를 들면, 7 개 이하의 탄소 원자 함유); 또는 전술한 것의 임의의 혼합물을 포함할 수 있다. 유리하게는, 할로겐화 가스에서 할로겐화 원자의 적어도 일부는 불소 원자여서 생체적합성 할로겐화 탄화수소 가스는 예를 들면, 브로모클로로디플루오로메탄, 글로로디플루오로메탄, 디클로로디플루오로메탄, 브로모트리플루오로메탄, 클로로트리플루오로메탄, 클로로펜타플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로메탄, 클로로트리플루오로에틸렌, 플루오로에틸렌, 에틸플루오라이드, 1,1-디플루오로에탄 및 퍼플루오로카본, 예를 들면 퍼플루오로메탄, 퍼플루오로에탄, 퍼플루오로프로판, 퍼플루오로부탄 (예를 들면, 퍼플루오로-n-부탄, 임의로는 퍼플루오로-이소-부탄과 같은 기타 이성체와의 혼합물), 퍼플루오로펜탄, 퍼플루오로헥산 및 퍼플루오로헵탄과 같은 퍼플루오로알칸; 퍼플루오로프로펜, 퍼플루오로부텐 (예를 들면, 퍼플루오로부트-2-엔) 및 퍼플루오로부타디엔과 같은 퍼플루오로알켄; 퍼플루오로부트-2-인과 같은 퍼플루오로알킨; 및 퍼플루오로시클로부탄, 퍼플루오로메틸시클로부탄, 퍼플루오로디메틸시클로부탄, 퍼플루오로트리메틸시클로부탄, 퍼플루오로시클로펜탄, 퍼플루오로메틸시클로펜탄, 퍼플루오로디메틸시클로펜탄, 퍼플루오로트리메틸시클로펜탄, 퍼플루오로메틸시클로헥산 및 퍼플루오로시클로헵탄과 같은 퍼플루오로시클로알칸 중에서 선택될 수 있다. 기타 할로겐화 가스는 메틸 클로라이드, 퍼플루오로아세톤과 같은 플루오르화 (예를 들면, 퍼플루오르화) 케톤 및 퍼플루오로디메틸 에테르와 같은 플루오르화 (예를 들면, 퍼플루오르화) 에테르를 포함한다. 퍼플루오르화 가스, 예를 들면 헥사플루오르화황 및 퍼플루오로프로판, 퍼플루오로부탄 및 퍼플루오로펜탄과 같은 퍼플루오로카본의 사용은 이러한 가스를 포함한 마이크로버블의 혈류에서 인지된 고도의 안정성 면에서 특히 유리할 수 있다.

예를 들어, 가스-함유 또는 가스-발생 제제를 제조함으로써 임의의 간단한 공정에 의해서 리포터를 제조할 수 있다. 대표적인 예로는 WO 9115244에 기재된 바와 같이, 가스와 계면활성제를 접촉시키고 이들을 수성 담체 존재하에 혼합함으로써; 또는 EP 512693A1에 기재된 바와 같이, 공동 마이크로캡슐을 얻기 위해서 가스의 존재하에 벽-생성 물질의 용액 또는 현탁액을 분무함으로써; US 5648095에 기재된 바와 같은 이중 에멀전 공정에 의한 고체 미세구의 제조; EP 681843A2에 기재된 바와 같이, 분사 건조 공정에 의한 공동 미세캡슐의 제조 공정; US 5469854에 기재된 바와 같은 가스 존재하의 지질을 함유하는 수용액을 흔들어서 가스-충전된 리포솜을 제조함으로써 가스 마이크로버블 현탁액을 제조하는 것이다.

리포터에 대한 목적하는 벡터의 적합한 부착 공정은 리포터 및 벡터 모두의 표면상의 반응기를 사용하여 적합한 링커로 수행된 리포터의 표면 변형을 포함한다. 공정의 임의의 단계에서 벡터 함유 물질과 리포터 물질을 물리적으로 혼합하는 것이 특별히 유리할 수도 있다. 그러한 공정은 배합물을 생성하거나 리포터에 벡터를 부착시킬 것이다. 임의의 공정 단계는 분리 후 예를 들어, 부유에 의해서 가스-함유 분자를 세척함으로써 리포터에 결합되지 않은 과량의 벡터를 제거할 수도 있다. 바람직한 측면은 필요하다면, 가스-함유 제제의 생성 전에 다른 리포터 분자와 미리 혼합할 수 있는 티올, 말레이미드 비오틴 등과 같은 관능기를 도입하는 리포펩티드 구조물을 사용하는 것이다. 벡터의 부착은 하기 기록된 링커 시약을 사용하여 수행할 수 있다.

목적하는 벡터에 대한 리포터 단위의 결합은 일반적으로 리포터 및(또는) 벡터에 위치한 하나 이상의 관능기와 상호작용을 포함하는 공유 또는 비공유 수단에 의해 성취될 수 있다. 이 목적을 위해 사용될 수 있는 화학적 활성 관능기의 예는 아미노, 히드록실, 술폰히드릴, 카르복실 및 카르보닐기 외에 탄수화물기, 비시날 디올, 티오에테르, 2-아미노알콜, 2-아미노티올, 구아니디닐, 이미다졸릴 및 페놀성기를 포함한다.

따라서, 리포터 및 벡터의 공유 커플링은 이러한 관능기와 반응할 수 있는 반응성 잔기를 포함하는 연결제를 사용하여 행할 수 있다. 술폰히드릴기와 반응할 수 있는 반응성 잔기의 예는 술폰히드릴기에 대해 특히 반응성을 나타내지만, 문헌[Gurd, F.R.N. in *Methods Enzymol.* (1967) 11, 532]에 기재된 바와 같이 이미다졸릴, 티오에테르, 페놀 및 아미노기를 변형시키기 위해 또한 사용될 수 있는 형태의 X-CH₂CO- (여기서, X=Br, Cl 또는 I임)의 α-할로아세틸 화합물을 포함한다. N-말레이미드 유도체는 또한 술폰히드릴기에 대해 선택적으로 여겨지지만, 특정 조건하에서 아미노기에 커플링시에 추가로 유용할 수 있다. N-말레이미드는 문헌[Kitagawa, T. et al. in *Chem. Pharm. Bull.* (1981) 29, 1130]에 기재된 바와 같이 리포터-벡터 결합을 위한 연결 시스템에 혼합되거나 문헌[Kovacic, P. et al. in *J. Am. Chem. Soc.* (1959) 81, 1887]에 기재된 바와 같은 버블 안정화를 위한 중합체 가교결합제로서 사용될 수 있다. 예를 들면, 문헌[Traut, T. et al. in *Biochemistry* (1973) 12, 3266]에 기재된 바와 같이 아미노기의 전환을 통해 티올기를 도입하는 2-이미노티올란과 같은 시약은 연결이 디설피드 브릿지의 형성을 통해 발생하는 경우 술폰히드릴 시약으로서 여겨질 수 있다. 따라서, 벡터 및 리포터 사이에 디설피드 변화에 의해 연결이 생길 수 있기 때문에 리포터 또는 벡터에 반응성 디설피드 결합을 도입하는 시약이 유용할 수 있으며; 이러한 시약의 예는 엘만 (Ellman) 시약 (DTNB), 4,4'-디티오디피리딘, 메틸-3-니트로-2-피리딜 디설피드 및 메틸-2-피리딜 디설피드 (문헌[Kimura, T. et al. in *Analyt. Biochem.* (1982) 122, 271]에 기재됨)를 포함한다.

아미노기와 반응할 수 있는 반응성 잔기의 예는 알킬화제 및 아실화제를 포함한다. 대표적인 알킬화제의 예는 다음을 포함한다:

i) 반응성 티올기의 존재하에 아미노기에 대한 특이성을 나타내는 α-할로아세틸 화합물이고, 예를 들면, 문헌[Wong, Y-H.H. in *Biochemistry* (1979) 24, 5337]에 기재된 바와 같이 X-CH₂CO- (여기서, X=Cl, Br 또는 I임)의 형태임;

ii) 마이클형 반응 또는 문헌[Smyth, D.G. et al. in *J. Am. Chem. Soc.* (1960) 82, 4600] 및 [Biochem. J. (1964) 91, 589]에 기재된 바와 같이 고리 카르보닐기에 첨가에 의한 아실화를 통해 아미노기와 반응

할 수 있는 N-말레이미드 유도체;

iii) 반응성 니트로할로방향족 화합물과 같은 아릴 할라이드;

iv) 문헌[McKenzie, J.A. et al. in J. Protein Chem. (1988) 7, 581]에 기재된 바와 같은 알킬 할라이드;

v) 아미노기와 슈프 염기 형성을 할 수 있으며, 형성된 부가물이 일반적으로 환원을 통해 안정화되어 안정한 아민을 수득하는 알데히드 및 케톤;

vi) 에피클로로히드린 및 비스옥시란과 같이 아미노, 술폰히드릴 또는 페놀성 히드록실기와 반응할 수 있는 에폭시드 유도체;

vii) 아미노, 술폰히드릴 및 히드록시기와 같은 친핵체에 대해 매우 반응성인 s-트리아진의 염소-함유 유도체;

viii) 고리 열림에 의해 아미노기와 같은 친핵체와 반응할 수 있는 s-트리아진 화합물 기재 아지리딘 (예를 들면, 문헌[Ross, W.C.J. in Adv. Cancer Res. (1954) 2, 1]에 기재됨);

ix) 스쿠아르산 디에틸 에스테르 (문헌[Tietze, L.F. in Chem. Ber. (1991) 124, 1215]);

x) 에테르 산소 원자에 의한 활성화에 의해 보통의 알킬 할라이드 보다 더욱 반응성인 알킬화제인 α -할로알킬 에테르 (문헌[Benneche, T. et al. in Eur. J. Med. Chem. (1993) 28, 463]).

대표적인 아미노-반응성 아실화제는 다음을 포함한다:

i) 각각 안정한 우레아 및 티오우레아 유도체를 형성하고 문헌[Schick, A.F. et al. in J. Biol. Chem. (1961) 236, 2477]에 기재된 바와 같이 단백질 가교결합을 위해 사용되는 이소시아네이트 및 이소티오시아네이트, 특히 방향족 유도체;

ii) 문헌[Herzig, D.J. et al. in Biopolymers (1964) 2, 349]에 기재되고, 형광 리포터기의 링커로의 도입에 유용할 수 있는 술폰닐 클로라이드;

iii) 산 할라이드;

iv) 니트로페닐에스테르 또는 N-히드록시숙신이미딜 에스테르와 같은 활성 에스테르;

v) 혼합, 대칭 또는 N-카르복시무수물과 같은 산 무수물;

vi) 문헌[Bodansky, M. et al. in 'Principles of Peptide Synthesis' (1984) Springer-Verlag]에 기재된 바와 같이 아미드 결합 형성에 유용한 기타 시약;

vii) 아실아지드 (여기서, 아지드기는 예를 들면, 문헌[Wetz, K. et al. in Anal. Biochem. (1974) 58, 347]에 기재된 바와 같은 질산나트륨을 사용하여 예비형성된 히드라지드 유도체로부터 발생함);

viii) 예를 들면, 문헌[Rasmussen, J.K. in Reactive Polymers (1991) 16, 199]에 기재된 바와 같이 비스아크릴아미드와 같은 중합체에 부착된 아즈락톤; 및

ix) 아미노기와 반응시 안정한 아미딘을 형성하는 이미도에스테르 (예를 들면, 문헌[Hunter, M.J. and Ludwig, M.L. in J. Am. Chem. Soc. (1962) 84, 3491]에 기재됨).

알데히드 관능기와 같은 카르보닐기는 친핵성 단백질 측쇄 관능기가 양성자화되는 pH에서 약한 단백질 염기와 반응할 수 있다. 약염기는 N-말단 시스테인 잔류물에서 찾을 수 있는 1,2-아미노티올을 포함하며, 이는 예를 들면, 문헌[Ratner, S. et al. in J. Am. Chem. Soc. (1937) 59, 200]에 기재된 바와 같이 알데히드기와 안정한 5원 티아졸리딘 고리를 선택적으로 형성한다. 페닐 히드라존과 같은 기타 약염기는 예를 들면, 문헌[Heitzman, H. et al. in Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1974) 71, 3537]에 기재된 바와 같이 사용될 수 있다.

알데히드 및 케톤은 또한 아민과 반응하여 슈프 염기를 형성할 수 있으며, 유리하게는 환원성 아민화를 통해 안정화될 수 있다. 알콕시아미노 잔기는 케톤 및 알데히드와 쉽게 반응하여 안정한 알콕사민을 생산할 수 있다(예를 들면, 문헌[Webb, R. et al. in Bioconjugate Chem. (1990) 1, 96]).

카르복실기와 반응할 수 있는 반응성 잔기의 예는 디아조아세테이트 에스테르 및 디아조아세트아미드와 같은 디아조 화합물을 포함하며, 이들은 높은 특이성으로 반응하여 에스테르기를 발생한다(예를 들면, 문헌[Herriot R.M. in Adv. Protein Chem. (1947) 3, 169]). O-아실우레아 형성과 아미드 결합 형성을 통해 반응하는 카르보디이미드와 같은 카르복실산 변형체가 또한 유용하게 사용될 수 있으며; 연결은 아민의 첨가를 통해 촉진될 수 있거나 직접 벡터-리포터 커플링을 일으킨다. 유용한 수용성 카르보디이미드는 1-시클로헥실-3-(2-모르폴리닐-4-에틸)카르보디이미드 (CMC) 및 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 (EDC)를 포함한다(예를 들면, 문헌[Zot, H.G. and Puett, D. in J. Biol. Chem. (1989) 264, 15552]). 기타 유용한 카르복실산 변형체는 우드워드(Woodwards) 시약 K와 같은 이속사졸롬 유도체; p-니트로페닐클로로포르메이트와 같은 클로로포르메이트; 1,1'-카르보닐디이미다졸과 같은 카르보닐디이미다졸; 및 N-(에톡시카르보닐)-2-에톡시-1,2-디히드로퀴놀린과 같은 N-카르보알콕시디히드로퀴놀린을 포함한다.

기타 유용한 반응성 잔기는 p-페닐렌디글리옥살과 같은 비시날 디온으로서, 이들은 구아니딘기(문헌[Wagner et al. in Nucleic acid Res. (1978) 5, 4065]); 및 친전자성 치환 반응을 할 수 있는 디아조늄 염(문헌[Ishizaka, K. and Ishizaka T. in J. Immunol. (1960) 85, 163])과 반응시키기 위해 사용할 수 있다. 비스-디아조늄 화합물은 아릴 디아민을 산성 용액 중에서 질산나트륨으로 처리하여 쉽게 제조한다. 리포터 및(또는) 벡터 중의 관능기가 바람직한 경우, 예를 들면 추가의 반응성 또는 선택성을 부여하기 위한 반응 전에 기타 관능기로 변환시킬 수 있다. 이를 위해 유용한 방법의 예는 디카르복실산 무수물과 같은 시약을 사용한 아민의 카르복실산으로의 변환; N-아세틸호모시스테인 티올락톤, S-아세틸

메르캅토숙신산 무수물, 2-이미노티올란 또는 티올-항유 숙신이미딜 유도체와 같은 시약을 사용한 아민의 티올로의 변환; α -할로아세테이트와 같은 시약을 사용한 티올의 카르복실산으로의 변환; 에틸렌이민 또는 2-브로보메틸아민과 같은 시약을 사용한 티올의 아민으로의 변환; 카르보디이미드와 이어서, 디아민과 같은 시약을 사용한 카르복실산의 아민으로의 변환; 및 토실 클로라이드와 같은 시약을 사용한 알콜의 티올로의 변환에 이어서, 티오아세테이트와 트랜스에스테르화하고 티올을 소듐 아세테이트로 가수분해하는 것을 포함한다.

벡터-리포터 커플링은 또한 제로-길이 연결제와 같은 효소를 사용하여 수행할 수 있으며; 따라서, 예를 들면 트랜스글루타미나제, 퍼옥시다제 및 크산틴 옥시다제가 연결된 생성물을 제조하기 위해 사용될 수 있다. 역 단백질분해는 또한 아마이드 결합 형성을 통한 연결을 위해 사용될 수 있다.

비공유 벡터-리포터 커플링은 안정한 금속 착물의 형태에서 킬레이트화 또는 아비딘/비오틴 결합과 같은 고친화성 결합 상호작용을 통해 예를 들면, 폴리리시닐-관능화 리포터 및 폴리글루타밀-관능화 리포터 사이의 정전 전하 상호작용에 의해 수행될 수 있다. 네가티브 대전된 막 표면에 비공유적으로 코팅된 폴리리신은 또한 전하 상호작용을 통해 세포에 대한 마이크로버블의 친화성을 비특이적으로 증가시킬 수 있다.

또한, 벡터는 인지질을 결합하기 위해 공지된 단백질 또는 펩티드 서열에 커플링될 수 있다. 많은 경우에 기타 단백질이 주로 인지질 헤드로 구성된 표면에 부착되는 반면에 인지질의 단일 분자는 트랜스-로카제와 같은 단백질에 부착할 수 있어서 인지질 미세구에 벡터를 부착하기 위해 사용할 수 있으며; 이러한 단백질의 한 예는 β 2-당단백질 I (Chonn, A., Semple, S.C. and Cullis, P.R., *Journal of Biological Chemistry* (1995) 270, 25845-25849)이다. 포스파티딜세린-결합 단백질은 문헌[Igarashi, K. et al. in *Journal of Biological Chemistry* 270(49), 29075-29078]에 기재되어 있다. 아빅신은 인지질 결합 단백질의 한 종류이고, 이들 중 많은 것이 특히 포스파티딜-세린에 결합한다[Raynal, P and H.B. Pollard. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins', *Biochim. Biophys. Acta* 1197: 63-93]. 이러한 포스파티딜세린-결합 단백질과 벡터의 결합은 포스파티딜세린-캡슐화 미세구에 벡터를 부착시키기 위해 사용될 수 있다. 결합 단백질의 아미노산 서열이 공지된 경우, 인지질-결합 단백질이 합성되거나 분리되고, 벡터와의 결합에 사용되며 분자내에 어디에나 위치할 수 있는 생물학적 활성을 피할 수 있다.

미세구-결합 분자용 분자 라이브러리의 직접 스크리닝에 의한 미세구의 표면 (또는 '막')에 특이적으로 결합하는 분자를 수득하는 것이 또한 가능하다. 예를 들면, 작은 단백질을 표시하는 파지 라이브러리는 이러한 선택을 위해 사용될 수 있다. 이러한 선택은 단순히 미세구를 파지 표시 라이브러리와 혼합하고, 부유 미세구에 파지 결합을 방출함으로써 이루어질 수 있다. 바람직한 경우, 이러한 선택은 '생리학적 조건' (예를 들면, 혈액내)에서 이루어져서 혈액 성분과 교차-반응하는 펩티드를 제거할 수 있다. 이러한 형태의 선택 과정의 장점은 완전한 부유 미세구에 부착된 결합 분자만이 상단으로 올라가기 때문에 미세구를 탈안정화하지 않는 결합 분자만이 선택되어 한다는 것이다. 또한, 탈안정화 단계가 선택되는 것도 가능할 수 있다. 또한, 이러한 선택은 전단 조건, 예를 들면 먼저 파지를 미세구와 반응시키고 이 미세구를 유동 조건하에서 항-파지 항체로 코팅된 표면을 통과시켜서 수행할 수 있다. 이 방법으로 생체 내에 존재하는 전단 조건을 억제할 수 있는 결합제를 선택하는 것이 가능할 수 있다. 이 방법으로 동정된 결합 잔기는 (화학적 결합 또는 펩티드 합성을 통해, 또는 재조합 벡터용 DNA-수준에서) 미세구에 임의의 벡터 분자를 부착하기 위한 일반적 수단으로 구성된 벡터 분자에 커플링될 수 있다.

펩티드를 포함하거나 커플링된 벡터, 막 삽입을 조절할 수 있는 요소를 함유한 리포펩티드 링커가 또한 유용할 수 있다. 한 예가 문헌[Leenhouts, J.M. et al. in *Febs Letters* (1995) 370(3), 189-192]에 기재되어 있다. 기지의 막 삽입 앵커/신호기로 구성된 생체 비활성 분자는 특정 용도를 위한 벡터로서 사용될 수 있으며 예는 문헌[Xie, Y. and Morimoto, T. in *J. Biol. Chem.* (1995) 270(20), 11985-11991]에 기재된 Na, K-ATPase α -서브유닛으로부터의 H1 소수성 분절이다. 이 앵커기는 또한 지방산(들) 또는 콜레스테롤일 수 있다.

커플링은 또한 비오틴을 위한 4 개의 고친화성 결합 부위를 갖는 아비딘 또는 스트렙타비딘을 사용하여 수행될 수 있다. 따라서, 아비딘은 벡터 및 리포터 모두가 비오틴화되는 경우 리포터에 벡터를 결합하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 예가 문헌[Bayer, E.A. and Wilchek, M. in *Methods Biochem. Anal.* (1980) 26, 1]에 기재되어 있다. 이 방법은 또한 리포터에 리포터의 연결, 버블 회합에 이어서 가능하게는 증가된 반향성을 촉진할 수 있는 과정으로 연장될 수 있다.

비공유 커플링은 또한 이중특이성 면역글로불린의 이관능성 성질을 이용할 수 있다. 이러한 분자는 두 개의 항체를 특이적으로 결합하여 이들을 연결할 수 있다. 예를 들면, 이중특이성 IgG 또는 화학적으로 처리된 이중특이성 F(ab)₂ 분절이 연결제로서 사용될 수 있다. 헤테로이관능성 이중특이성 항체는 또한 두 개의 상이한 항원을 연결하는 것으로 보고되었다(문헌[Bode, C. et al. in *J. Biol. Chem.* (1989) 264, 944] 및 [Staerz, U.D. et al. in *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1986) 83, 1453]). 유사하게는, 두 개 이상의 항원성 결정소를 갖는 임의의 리포터 및(또는) 벡터(문헌[Chen, Aa et al. in *Am. J. Pathol.* (1988) 130, 216]에 기재됨)는 항체 분자에 의해 가교결합될 수 있고, 잠재적으로 증가된 반향성의 다중-버블 가교-결합된 어셈블리를 형성한다.

추가적 연결 물질 (예를 들면, 카르보디이미드를 사용하거나 또는 효소적으로 유도된 아마이드 결합 형성시)을 도입하지 않고 두 개의 반응성 화학기의 직접 공유 결합을 유도하는 소위 제로-길이 연결제는 바람직한 경우 비공유 리포터-벡터 연결을 유도하는 비오틴/아비딘 시스템과 같은 치료제 및 소수성 또는 정전기적 상호작용을 유도하는 치료제로서 사용될 수 있다.

그러나, 대부분 통상적으로 연결제는 전술한 바와 같이 스페이서 요소로 연결된 두 개 이상의 반응성 잔기를 포함한다. 이러한 스페이서의 존재는 한 분자 또는 두 개의 상이한 분자내에서 특정 관능기와 반응하는 이관능성 링커를 허용하여 이러한 두 성분 사이에 결합을 형성하고 리포터-벡터 결합에 외부의 링커-유도물질을 도입한다. 연결제내 반응성 잔기는 동일 (호모이관능성 시약)하거나 상이(헤테로이관능성 시

약 또는 몇 개의 비슷하지 않은 반응성 잔기가 존재하는 경우 헤테로다관능성 시약)할 수 있으며, 임의의 화학 종 사이에서 분자끼리 또는 분자내의 공유 결합을 일으킬 수 있다.

연결체에 의해 도입된 외부 물질의 성질은 최종 생성물의 표적력 및 일반적 안정성에 대한 중요한 의미를 가질 수 있다. 따라서, 예를 들면, 생체분해성 또는 화학적으로 민감하거나 효소성 절단 부위를 혼합하는 스페이서 암(arm)을 함유한 불안정한 결합을 도입하는 것이 바람직하다. 또한, 이러한 스페이서는 예를 들면, 계면활성제로 작용하고 버블 안정성을 증가시키는 중합체성 성분을 포함할 수 있다. 이러한 스페이서는 예를 들면, 표면 가교결합을 증가시키기 위해 전술한 바와 같은 반응성 잔기를 포함할 수 있거나, 형광 프로브, 스피인 라벨 또는 방사성 물질과 같은 트래이서 원소를 포함할 수 있다.

스페이서 요소는 일반적으로 5 내지 30 Å의 거리로 링커의 반응성 잔기를 효과적으로 분리하는 지방족 사슬로 구성될 수 있다. 이들은 또한 폴리(에틸렌 글리콜)과 같은 거대분자 구조를 포함할 수 있다. 본 명세서에서 PEG로서 언급하고 있는 그러한 중합체 구조물은 단순한 중성의 폴리에스테르이고, 이들은 생체기술 및 생체의학 용도 (예를 들면, 문헌[Milton Harris, J. (ed) 'Poly(ethylene glycol) chemistry, biotechnical and biomedical applications' Plenum Press, New York, 1992] 참조)에서 많은 관심을 받아 왔다. PEG는 물을 포함한 대부분의 용매에 용해성이고 수성 환경에서 각각의 에틸렌 글리콜 분자에 결합된 2 개 또는 3 개의 물 분자로 고도로 수화되며; 이는 기타 중합체 또는 PEG-변형된 표면 상에 단백질의 흡수를 방지하는 효과를 갖는다. PEG는 비독성으로 공지되어 있고, 활성 단백질 또는 세포에 유해하지 않지만, 공유결합된 PEG는 비면역성 및 비항원성으로 공지되었다. 또한, PEG는 쉽게 변형되고, 그 자체의 화학 성질에 거의 영향을 주지 않는 기타 분자에 결합할 수 있다. 이들의 유리한 용해성 및 생물학적 성질은 PEG 및 PEG-폴리우레탄 및 PEG-폴리프로필렌과 같은 블록 공중합체를 포함하는 PEG의 공중합체의 다수의 가능한 사용으로부터 명백하다.

본 발명에 따라 사용된 PEG 스페이서에 적합한 분자량은 예를 들면, 120 달톤 내지 20 킬로달톤이다.

세망내피조직계 (RES)의 세포에 의한 입자의 흡수를 위한 주요 메카니즘은 혈액내 혈장 단백질에 의한 흡수인 작용이며; 이들은 RES에 의해 흡수되는 외부 입자를 마크한다. 본 발명에 따라 사용된 PEG 스페이서 요소의 생물학적 성질은 PEG화 리포솜에서 관찰되는 것과 유사한 방법으로 조영제 순환 시간을 증가시키기 위해 작용할 수 있다(문헌[Klibanov, A.L. et al. in FEBS Letters (1990) 268, 235-237] 및 [Blume, G. and Cevc, G. in Biochim. Biophys. Acta (1990) 1029, 91-97]참조).

기타 유용한 단백질 변형은 탈글리코시드화가 종종 간, 비장, 대식세포 등에 의해 덜 흡수되기 때문에 누라미나제, 엔도글리코시다제 또는 페리오데이드에 의한 부분 또는 완전한 탈글리코시드화를 포함하지만, 단백질의 네오-글리코시드화는 종종 간 및 대식세포에 의해 증가된 흡수를 일으킨다; 단백질 분해성 절단에 의해 절단된 형태의 제조는 감소된 크기 및 순환시 짧아진 반감기; 및 양이온화를 초래한다(예를 들면, 문헌[Kumagi et al. in J. Biol. Chem. (1987) 262, 15214-15219; Triguero et al. in Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86, 4761-4765; Pardridge et al. in J. Pharmacol. Exp. Therap. (1989) 251, 821-826 and Pardridge and Boado, Febs Lett. (1991) 288, 30-32]에 기재됨).

목적하는 영역에 대한 증가된 커플링 효율은 또한 PEG 스페이서 말단에 결합한 항체를 사용하여 성취될 수 있다(문헌[Maruyama, K. et al. in Biochim. Biophys. Acta (1995) 1234, 74-80] 및 [Hansen, C.B. et al. in Biochim. Biophys. Acta (1995) 1239, 133-144 참조]).

일부 경우에서 벡터(들)와 결합 또는 PEG가 스페이서로 작용하지 않는 동일한 분자에서 리포터에 직접 결합시 안정화제로서 PEG 성분을 포함하는 것이 유리하다고 여겨진다.

기타 대표적인 스페이서 요소는 폴리갈락투론산, 그리코사미노글리칸, 헤파리노이드, 셀룰로스와 같은 구조형 다당류 및 알기네이트, 키토산 및 카라기난과 같은 해양 다당류; 전분, 글리코겐, 덱스트란 및 아미노덱스트란과 같은 저장형 다당류; 리신, 글루탐산 및 아스파르트산의 단독 또는 공중합체와 같은 폴리아미노산 및 그의 메틸 및 에틸 에스테르; 및 효소 절단 부위와 결합할 수 있거나 결합할 수 없는 폴리펩티드, 올리고사카리드 및 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

일반적으로, 스페이서 요소는 비시날 글리콜, 아조, 술폰, 에스테르, 티오에스테르 또는 디술피드기와 같은 절단가능한 기를 포함할 수 있다. 화학식

$-(Z)_m.Y.X.C(R^1R^2).X.Y.(Z)_n-$ (여기서, X 및 Z는 -O-, -S- 및 -NR- (여기서, R은 수소 또는 유기기임)로부터 선택되고; Y는 각각 카르보닐, 티오카르보닐, 술폰, 포스포릴 또는 유사 산-형성기이고; m 및 n은 각각 0 또는 10이고; R¹ 및 R²는 각각 수소, 유기기 또는 -X.Y.(Z)_m-기이거나 함께 2가 유기기를 형성함)의 생체분해성 메틸렌 디에스테르 또는 디아미드기를 포함하는 스페이서가 유용할 수 있는데; 예를 들면, WO-A-9217436에 기재된 바와 같이 이러한 기는 예를 들면, 생체내에서 에스트라제의 존재하에 쉽게 생분해되지만, 이러한 효소의 부재하에서는 안정하다. 따라서, 이들은 치료제에 유리하게 연결되어 치료제의 느린 방출을 허용할 수 있다.

폴리[N-(2-히드록시에틸)메타크릴아미드]는 세포 및 조직과의 낮은 상호작용에 의한 유용한 스페이서 물질이다(문헌[Volfova, I., Rihova, B. and V.R. and Vetvicka, P. in J. Bioact. Comp. Polymers (1992) 7, 175-190] 참조). 주로 밀접하게 관련된 2-히드록시프로필 유도체로 구성된 유사한 중합체들의 실험은 단백질 식세포 시스템에 의해 다소 낮은 정도로만 세포흡수된다는 것을 나타냈다(문헌[Goddard, P., Williamson, I., Bron, J., Hutchkinson, L.E., Nicholls, J. and Petrak, K. in J. Bioact. Compat. Polym. (1991) 6, 4-24] 참조).

기타 유용한 중합체성 스페이서 물질은 다음을 포함한다:

i) 메틸 메타크릴레이트와 메타크릴산의 공중합체; 이들은 침식될 수 있으며(문헌[Lee, P.I. in Pharm. Res. (1993) 10, 980] 참조), 카복실레이트 치환체는 중성 중합체보다 고도의 팽윤을 일으킬 수 있음;

ii) 폴리메타크릴레이트와 생분해성 폴리에스테르의 블록 공중합체 (문헌[San Roman, J. and Guillen-

Garcia, P. in Biomaterials (1991) 12, 236-241] 참조);

iii) 시아노아크릴레이트, 즉 2-시아노아크릴산의 에스테르의 중합체 - 이들은 생분해성이고 선택적 약물 전달을 위한 나노입자의 형태로 사용되어 왔음(문헌[Forestier, F., Gerrier, P., Chaumard, C., Quero, A.M., Couvreur, P. and Labarre, C. in J. Antimicrob. Chemoter. (1992) 30, 173-179] 참조);

iv) 수용성이고 일반적으로 생체적합하게 여겨지는 폴리비닐 알콜(문헌[Langer, R. in J. Control. Release (1991) 16, 53-60] 참조);

v) 생체침식되는 것으로 언급된 비닐 메틸 에테르와 말레산 무수물의 공중합체(문헌[Finne, U., Hannus, M. and Urtti, A. in Int. J. Pharm. (1992) 78, 237-241] 참조);

vi) 폴리비닐피롤리돈, 예를 들면, 약 25,000 미만의 분자량을 가지고 신장에 의해 빨리 여과됨(문헌[Hespe, W., Meier, A. M. and Blankwater, Y. M. in Arzeim.-Forsch./Drug Res. (1977) 27, 1158-1162] 참조);

vii) 글리콜산, 락트산, 부티르산, 발레르산 및 카프로산과 같은 단쇄 지방족 히드록시산의 중합체 및 공중합체(문헌[Carli, F. in Chim. Ind. (Milan) (1993) 75, 494-9] 참조)이며, 이들의 분해 속도를 증가시키기 위해 방향족 히드록시산을 혼합하는 공중합체를 포함함(문헌[Imasaki, K., Yoshida, M., Fukuzaki, H., Asano, M., Kumakura, M., Mashimo, T., Yamanaka, H. and Nagai, T. in Int. J. Pharm. (1992) 81, 31-38] 참조);

viii) 에틸렌 글리콜 및 테레프탈산의 교대 단위로 구성된 폴리에스테르, 예를 들면, 다크론(Dacron[®])으로서 비분해성이지만 매우 생체적합함;

ix) 예를 들면, 폴리우레탄(문헌[Kobayashi, H., Hyon, S.H. and Ikada, Y. in 'Water-curable and biodegradable prepolymer'-J. Biomed. Mater. Res. (1991) 25, 1481-1494] 참조)과 혼합시 지방족 히드록시산 중합체(문헌[Younes, H., Nataf, P.R., Cohn, D., Appelbaum, Y.J., Pizov, G. and Uretzky, G. in Biomater. Artif. Cells Artif. Organs (1988) 16, 705-719] 참조)의 생분해성 분절을 포함하는 블록 공중합체;

x) 이식 조직에 대해 내성으로 공지되고, 예를 들면, 폴리(테트라메틸렌 글리콜), 폴리(프로필렌 글리콜) 또는 폴리(에틸렌 글리콜)를 포함하는 가요성 '연질' 분절 및 예를 들면, 4,4'-메틸렌비스(페닐렌 이소시아네이트)를 포함하는 방향족 '경질' 분절과 혼합될 수 있는 폴리우레탄(문헌[Ratner, B.D., Johnston, A.B. and Lenk, T.J. in J. Biomed. Mater. Res: Applied Biomaterials (1987) 21, 59-90; Sa Da Costa, V. et al. in J. Coll. Interface Sci. (1981) 80, 445-452 and Affrossman, S. et al. in Clinical Materials (1991) 8, 25-31] 참조);

xi) 가수분해가능한 에스테르 결합(문헌[Song, C. X., Cui, X. M. and Schindler, A. in Med. Biol. Eng. Comput. (1993) 31, S147-150] 참조)때문에 생분해성 에스테르로 여겨질 수 있고, 흡수성을 개선시키기 위한 글리콜리드 단위를 포함할 수 있는 폴리(1,4-디옥산-2-온)(문헌[Bezwada, R.S., Shalaby, S.W. and Newman, H.D.J. in Agricultural and synthetic polymers: Biodegradability and utilization (1990) (ed Glass, J.E. and Swift, G.), 167-174 - ACS symposium Series, #433, Washington D.C., U.S.A.-American Chemical Society] 참조);

xii) 토끼 연구 (문헌[Brem, H., Kader, A., Epstein, J.I., Tamargo, R.J., Domb, A., Langer, R. and Leong, K.W. in Sel. Cancer Ther. (1989) 5, 55-65] 참조) 및 래트 연구 (문헌[Tamargo, R.J., Epstein, J.I., Reinhard, C.S., Chasin, M. and Brem, H. in J. Biomed. Mater. Res. (1989) 23, 253-266] 참조)에서 독성 효과없이 뇌에서 약물의 조절된 방출에 유용한 것으로 나타난 세박산 (옥탄디오산)과 비스(4-카르복시-페녹시)프로판의 공중합체와 같은 폴리무수물;

xiii) 생체내에서 조절된 방출을 위해 사용되는 오르토-에스테르기를 함유한 생분해성 중합체(문헌[Maa, Y.F. and Heller, J. in J. Control. Release (1990) 14, 21-28] 참조); 및

xiv) 교대로 인 및 질소 원자로 구성된 무기 중합체인 폴리포스파젠(문헌[Crommen, J.H., Vandorpe, J. and Schacht, E.H. in J. Control. Release (1993) 24, 167-180] 참조).

다음 표는 본 발명에 따른 표적 추적가능한 치료제 제조에 유용할 수 있는 연결제 및 단백질 변형용 시약을 열거하였다.

헤테로이관능성 연결제

연결제	반응성 1	반응성 2	설명
ABH	탄수화물	광반응성	
ANB-NOS	-NH ₂	광반응성	
APDP(1)	-SH	광반응성	요오드화가능한 디술피드 연결제
APG	-NH ₂	광반응성	pH 7-8에서 Arg와 선택적으로 반응
ASIB(1)	-SH	광반응성	요오드화가능한
ASBA(1)	-COOH	광반응성	요오드화가능한
EDC	-NH ₂	-COOH	제로-길이 연결제
GMBS	-NH ₂	-SH	

술포-GMBS	-NH ₂	-SH	수용성
HSAB	-NH ₂	광반응성	

술포-HSAB	-NH ₂	광반응성	수용성
MBS	-NH ₂	-SH	
술포-MBS	-NH ₂	-SH	수용성
M ₂ C ₂ H	탄수화물	-SH	
MPBH	탄수화물	-SH	
NHS-ASA(1)	-NH ₂	광반응성	요오드화가능한
술포-NHS-ASA(1)	-NH ₂	광반응성	수용성, 요오드화가능한
술포-NHS-LC-ASA(1)	-NH ₂	광반응성	수용성, 요오드화가능한
PDPH	탄수화물	-SH	디설피드 연결제
PNP-DTP	-NH ₂	광반응성	
SADP	-NH ₂	광반응성	디설피드 연결제
술포-SADP	-NH ₂	광반응성	수용성 디설피드 연결제
SAED	-NH ₂	광반응성	디설피드 연결제
SAND	-NH ₂	광반응성	수용성 디설피드 연결제
SANPAH	-NH ₂	광반응성	
술포-SANPAH	-NH ₂	광반응성	수용성
SASD(1)	-NH ₂	광반응성	수용성 요오드화가능한 디설피드 연결제
SIAB	-NH ₂	-SH	
술포-SIAB	-NH ₂	-SH	수용성
SMCC	-NH ₂	-SH	
술포-SMCC	-NH ₂	-SH	수용성
SMPB	-NH ₂	-SH	
술포-SMPB	-NH ₂	-SH	수용성
SMPT	-NH ₂	-SH	
술포-LC-SMPT	-NH ₂	-SH	수용성
SPDP	-NH ₂	-SH	
술포-SPDP	-NH ₂	-SH	수용성
술포-LC-SPDP	-NH ₂	-SH	수용성
술포-SAMCA(2)	-NH ₂	광반응성	
술포-SAPB	-NH ₂	광반응성	수용성

(1)=요오드화가능한; (2)=형광

호모이관능성 연결제

연결제	반응성	설명
0	-NH ₂	
BMH	-SH	
BASED(1)	광반응성	요오드화가능한 디설피드 링커
BSCOES	-NH ₂	
술포-BSCOES	-NH ₂	수용성
DFDNB	-NH ₂	
DMA	-NH ₂	
DMP	-NH ₂	
DMS	-NH ₂	

DPDPB	-NH ₂	디설피드 링커
DSG	-NH ₂	
DSP	-NH ₂	디설피드 링커
DSS	-NH ₂	
DST	-NH ₂	
술포-DST	-NH ₂	수용성
DTBP	-NH ₂	디설피드 링커
DTSSP	-NH ₂	디설피드 링커
EGS	-NH ₂	
술포-EGS	-NH ₂	수용성
SPBP	-NH ₂	

비오틴화제

진단/치료제	반응성	설명
비오틴-BMCC	-SH	
비오틴-DPPE*		비오틴화 리포솜의 제조
비오틴-LC-DPPE*		비오틴화 리포솜의 제조
비오틴-HPDP	-SH	디설피드 링커
비오틴-히드라지드	탄수화물	
비오틴-LC-히드라지드	탄수화물	
요오도아세틸-LC-비오틴	-NH ₂	
NHS-이미노비오틴	-NH ₂	아비딘을 위해 감소된 친화성
NHS-SS-비오틴	-NH ₂	디설피드 링커
광반응가능한 비오틴	핵산	
술포-NHS-비오틴	-NH ₂	수용성
술포-NHS-LC-비오틴	-NH ₂	

DPPE=디팔미토일포스파티딜에탄올아민; LC=장쇄

단백질 변형용 진단/치료제

진단/치료제	반응성	기능
엘만 시약	-SH	정량화/검출/보호
DTT	-S.S-	환원
2-메르캅토에탄올	-S.S-	환원
2-메트캅틸아민	-S.S-	환원
트라우트(Traut) 시약	-NH ₂	-SH 도입
SATA	-NH ₂	보호된 -SH 도입
AMCA-NHS	-NH ₂	형광 표지
AMCA-히드라지드	탄수화물	형광 표지
AMCA-HPDP	-S.S-	형광 표지
SBF-클로라이드	-S.S-	-SH의 형광 검출
N-에틸말레이미드	-S.S-	-SH 블록
NHS-아세테이트	-NH ₂	-NH ₂ 블록 및 아세틸화
시트라콘산 무수물	-NH ₂	가역적으로 블록하고 네가티브 전하를 도입
DTPA	-NH ₂	킬레이터 도입
BNPS-스카톨	트립토판	트립토판 자기 절단
볼톤-헌터(Bolton-Hunter)	-NH ₂	요오드화가능한 기 도입

본 발명에서 사용되는 연결제는 통상적으로, 어느 정도의 특이적으로 백터를 리포터(들)에 연결시킬 수 있고, 또한 하나 이상의 치료학적 활성 제를 부착시키는데 사용될 수 있다.

본 발명에 따라 사용될 수 있는 초음파 화상 양식은 B-모드 화상 (예를 들면, 방출된 초음파 펄스의 기초

진동수, 그의 낮은 고조파 또는 높은 고조파 또는 방출된 펄스 및 이러한 고조파로부터 유도된 진동수의 합 또는 차로부터 발생된 신호 엔벨로프의 시간-변화 크기를 사용하여, 기초 진동수 또는 제2 고조파로부터 발생한 화상이 바람직함)과 같은 2 차원 및 3 차원 화상 기술, 컬러 도플러 화상 및 도플러 크기 화상, 및 마지막 2 개와 전술한 양식 중 임의의 것의 조합물을 포함한다. 놀랍게도 우수한 제2 고조파 신호는 본 발명에 따른 표적 단일층-안정화 미세구조로부터 수득하였다. 이동의 효과를 감소시키기 위해 심장 또는 신장과 같은 조직의 연속 화상은 적절한 동기화(synchronisation) 기술 (예를 들면, ECG에 대한 게이팅 또는 피검자의 호흡 이동)의 도움으로 수집될 수 있다. 정지 또는 지연된 마이크로버블을 수반하는 공명 진동수 또는 진동수 흡수에서 변화의 측정 또는 또한 조영제를 검출하기 위해 유용하게 제조될 수 있다.

본 발명은 바람직한 부위에 생성물의 벡터-매개 방향과 협력하여 치료제 약물 전달을 위한 도구를 제공한다. '치료제' 또는 '약물'은 살아있는 사람 또는 사람 아닌 동물에서 특정 질병에 유효한 효과를 갖는 치료제를 의미한다. 약물 및 초음파 조영제의 조합물이 예를 들면, WO-A-9428873 및 WO-A-9507072에 기재되어 있지만, 이러한 생성물은 특정 부위에 대한 친화성을 갖는 벡터가 부족하여 약물 방출 전 또는 중에 바람직한 부위에서 비교적 불량한 특정 지연을 나타낸다.

본 발명에 따라 사용된 치료제 화합물은 마이크로버블의 내부에서 캡슐화되거나 안정화 막에 부착 또는 혼합될 수 있다. 따라서, 본 발명의 치료제 화합물은 예를 들면, 공유 또는 이온 결합을 통해 막의 일부와 연결되거나 안정화 물질로 물리적으로 혼합되고, 특히 약물이 막 물질에 대해 유사한 극성 또는 용해도를 갖는 경우 몸에서 작용하기 전에 생성물로부터 누출되는 것을 방지한다. 약물의 방출은 단지 혈액과 습윤 접촉하고 투여되거나 기타 내부 또는 외부 영양, 예를 들면 효소 또는 초음파의 사용에 의한 촉매화된 용해 과정에 의해 개시될 수 있다. 외부 초음파를 사용한 가스-함유 미세입자의 파괴는 초음파 조영제에서의 현상으로 예를 들면, WO-A-9325241에 기재된 바와 같이 공지되어 있으며; 약물 방출의 속도는 변환기로부터 초음파 에너지의 특정 양을 사용하여 치료 용도의 형태에 따라 변할 수 있다.

본 발명의 치료제는 예를 들면, 전술한 바와 같은 적합한 연결체를 사용하여 캡슐화 막 표면에 공유적으로 결합할 수 있다. 따라서, 예를 들면 약물이 생체분해성 결합 또는 링커를 통해 결합된 인지질 또는 리포펩티드 유도체를 먼저 제조하고 이어서, 이 유도체를 전술한 바와 같이 리포터를 제조하기 위해 이 물질에 혼합할 수 있다.

본 발명의 약물 전달 조성물에 사용하기 적합한 대표적인 치료제는 임의의 공지된 치료제 약물 또는 디솔피드기를 생성하는 산화적 조건하에서 티올-함유 마이크로버블과 커플링할 수 있는 티올기를 함유한 그의 활성 동족체를 포함한다. 벡터(들)와 조합시 이러한 약물/벡터-변형된 마이크로버블은 표적 조직에 축적될 수 있으며; 환원된 글루타티온과 같은 환원제의 투여는 표적 세포 부근의 표적 마이크로버블로부터 약물 분자를 유리시켜서 약물의 국소 농도를 증가시키고, 치료 효과를 증가시킬 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 먼저 치료제 없이 제조하고 이어서, 사용 직전에 마이크로버블 상에 커플링하거나 코팅하여, 예를 들면 치료제를 수성 매질내 마이크로버블의 현탁액에 첨가하여 마이크로버블에 치료제를 접착 또는 부착할 수 있다.

기타 약물 전달 시스템은 표적 벡터와 함께 폴리-L-리신 또는 폴리-D-리신 사슬을 포함하는 리포펩티드 구조물로 도핑된 벡터-변형된 인지질 막을 포함한다. 리포터-매개 약물 전달 상 특별한 중요성을 갖는 유전자 치료/안티센스 기술에 적용하기 위해, 마이크로버블 담체는 양이온성 폴리리신과 정전기적 상호작용을 통해 DNA 또는 RNA와 농축된다. 이 방법은 표적 전달을 위해 사용된 벡터(들)가 폴리리신 담체 잔기에 직접 부착되지 않는다는 장점을 가진다. 이 폴리리신 사슬은 또한 지질 사슬의 존재에 의해 마이크로버블 막에 더욱 단단히 고정된다. 전달 효과를 증가시키기 위한 초음파의 사용이 또한 유용하게 여겨진다.

또한, 유리 폴리리신 사슬을 먼저 약물 또는 벡터 분자로 변형시키고 이어서, 표적 마이크로버블의 반대 표면에 농축시킨다.

본 발명에 따라 유용한 대표적이고 비제한적인 예는 빈크리스틴, 빈블라스틴, 빈데신, 부솔판, 콜로르암부실, 스피로플라틴, 시스플라틴, 카르보플라틴, 메토트레제이트, 아드리아마이신, 미토마이신, 블레오마이신, 시토신 아라비노사이드, 아라비노실 아데닌, 메르캅토프린, 미토탄, 프로카르바진, 다크티노마이신 (안티노마이신 D), 다우노루비신, 독소루비신, 히드로코콜라이드, 탁솔, 플리카마이신, 아미노글루테티미드, 에스트라무스틴, 플루타미드, 루프롤리드, 메게스트롤 아세테이트, 타모지펜, 테스톨락톤, 트릴로스탄, 암사크린 (m-AMSA), 아스파라기나제 (L-아스파라기나제), 에도포사이드, 인터페론 a-2a 및 2b와 같은 항신생물제, 헤마토프로피린 또는 전술한 것의 유도체와 같은 혈액 제품; 무라일펩티드와 같은 생물학적 반응 변형제; 케토코나졸, 니스타틴, 그리세오펜, 플루시토신, 미코나졸 또는 암포테리신 B와 같은 항진균제; 성장 호르몬, 멜라노사이트 자극 호르몬, 에스트라디올, 베글로메타손 디프로피오네이트, 베타메타손, 코르티손 아세테이트, 덱사메타손, 플루니솔리드, 히드로코르티손, 메틸프레드니솔론, 파라메타손 아세테이트, 프레드니솔론, 프레드니손, 트리암시놀론 또는 플루드로코르티손 아세테이트와 같은 호르몬; 시아노코발아민 또는 레티노이드와 같은 비타민; 알칼리성 포스파타제 또는 망간 슈퍼옥사이드 디스무타제와 같은 효소; 아멜레자녹스와 같은 항알러지제; 모노클로날 항체와 같은 조직 인자의 억제제 및 그의 Fab 분절, 합성 펩티드, 비펩티드 및 조직 인자 발현을 하강조절하는 화합물; GPIa, GPIb 및 GPIIb-IIIa, ADP 리포터, 트롬빈 리포터, 폰 빌레브란드(Von Willebrand) 인자, 프로스타글란딘, 아스파린, 티클로피딘, 글로피고그렐 및 레오프로와 같은 혈소판 억제제; FIIa, FVa, FVIIa, FVIIIa, FIXa, FXa, 조직 인자, 헤파린, 히루딘, 피롤로그, 아르가트로반, DEGR-rFVIIa 및 아넥신 V와 같은 응집 단백질 표적의 억제제; 피브리 형성의 억제제 및 t-PA, 우로키나제, 플라스민, 스트렙토키나제, rt-플라스미노겐 활성화제 및 r스타필로키나제와 같은 섬유소 분해 촉진제; 메드록시프로게스테론, 펜토산 폴리술페이트, 수라민, 탁솔, 탈리도미드, 안지오테틴, 인터페론-알파, 메탈로프로테이나제 억제제, 혈소판 인자 4, 소마토스타틴, 트롬보스폰딘과 같은 항혈관형성 인자; 프로레오닌올과 같은 순환성 약물; 글루타티온과 같은 대사성 강화제; p-아미노살리실산, 이소니아지드, 카프레오마이신, 술페이트, 시클로세진, 에탐부롤, 에티온아미드, 피라진아미드, 리팜핀 또는 스트렙토마이신 술페이트와 같은 항결핵제; 아실글비르, 아만타딘, 아지도티미딘, 리바비린 또는 비다라빈과 같은 항바이러스제; 딜티아젬, 니페디핀, 베라파밀, 에리트

리톨 테트라니트레이트, 이소소르비드 디니트레이트, 니트로글리세린 또는 펜타에리트리톨 테트라니트레이트와 같은 혈관 확장제; 다프손, 클로람페니콜, 네오마이신, 세파클로르, 세파드록실, 세팔렉신, 세프라딘, 에리트로마이신, 클린다마이신, 린코마이신, 아목시실린, 암피실린, 바캄피실린, 카르베니실린, 디클로자실린, 시클라실린, 피클로자실린, 헤타실린, 메티실린, 나프실린, 페니실린, 폴리미진 또는 테트라시클린과 같은 항생제; 디플루니살, 이부프로펜, 인도메타신, 메클레페나메이드, 메페남산, 나프로젠, 페닐부타존, 피록시캄, 톨메틴, 아스피린 또는 살리실레이트와 같은 소염제; 클로로퀸, 메트로니다졸, 퀴닌 또는 메글루민 안티모네이트와 같은 항원충제; 페니실아민과 같은 항류마티스제; 파레고릭과 같은 마취제; 코데인, 모르핀 또는 아편과 같은 아편제; 데스라시드, 디지톡신, 디고신, 디지탈린 또는 디지탈리스와 같은 심장 글리코시드; 아트라쿠리움 메실레이트, 갈라민 트리에티오디드, 헥사플루오레늄 브로마이드, 메도쿠린 요오다이드, 판쿠로늄 브로마이드, 숙시닐콜린 클로라이드, 투보쿠라린 클로라이드 또는 베클로늄 브로마이드와 같은 신경근육성 차단제; 아모바르비탈, 아모바르비탈 소듐, 아프로파르비탈, 부타바르비탈 소듐, 클로랄 히드레이트, 에트클로르비톨, 에티나메이드, 플루라제팜 히드로클로라이드, 글루테티미드, 메도트리메프라진 히드로클로라이드, 메티프릴론, 미다졸람 히드로클로라이드, 파르알데히드, 펜토바르비탈, 세코바르비탈 소듐, 탈부탈, 테마제팜 또는 트리아졸람과 같은 진정제; 푸피바카인, 클로로프로카인, 에티도카인, 리도카인, 메피바카인, 프로카인 또는 테트라카인과 같은 국소 마취제; 드로페리돌, 에토미데이트, 펜탈닐 시트레이트와 드로페리돌, 케타민 히드로클로라이드, 메도헥시탈 소듐 또는 티오펜탈 및 약제학적으로 허용가능한 염 (예를 들면, 히드로클로라이드 또는 히드로브로마이드와 같은 산 부가염 또는 나트륨, 칼슘 또는 마그네슘염과 같은 염기성 염) 또는 그의 유도체 (예를 들면, 아세티드)와 같은 전신 마취제를 포함한다. 치료제의 기타 예는 재조합 RNA 및 DNA를 포함하는 천연 또는 합성원의 핵산, RNA, 및 DNA와 같은 유전성 물질을 포함한다. DNA 암호화 특정 단백질은 많은 상이한 형태의 질환의 치료에 사용될 수 있다. 예를 들면, 종양 과사 인자 또는 인터루킨-2 유전자는 진행된 암을 치료하기 위해 제공될 수 있으며; 티미딘 키나아제 유전자는 난소암 또는 뇌종양을 치료하기 위해 제공될 수 있으며; 인터루킨-2 유전자는 신경아세포종, 악성 흑색종 또는 신경암을 치료하기 위해 제공될 수 있고; 인터루킨-4 유전자는 암을 치료하기 위해 제공될 수 있다.

소수성 상호작용을 통해 마이크로버블 막에 연결된 약물의 친유성 유도체는 마이크로버블의 일부로서 또는 예를 들면, 초음파의 사용에 의한 마이크로버블로부터의 방출 후에 치료적 효과를 나타낼 수 있다. 이 약물이 바람직한 물리적 성질을 가지지 않는 경우, 친유성기는 막에 약물을 고정시키기 위해 도입될 수 있다. 바람직하게는, 친유성기는 생체내에 분자의 효능에 영향을 주지 않거나 친유성기가 분열되어 활성 약물을 방출시키는 방법으로 도입되어야 한다. 친유성기는 약물 분자에 사용가능한 관능성기에 따라 다양한 화학적 수단에 의해 도입될 수 있다. 공유성 커플링은 적당하게 관능화된 친유성 화합물과 반응시킬 수 있는 약물 분자에서 관능기를 사용하여 행할 수 있다. 친유성 잔기의 예는 분자 및 비분자 알킬 사슬, 시클릭 화합물, 방향족 잔기 및 융합 방향족 및 비방향족 시클릭 시스템을 포함한다. 일부 경우에서 친유성 잔기는 콜레스테롤 또는 관련 화합물과 같은 적합하게 관능화된 스테로이드로 구성된다. 유도화에 특히 적합한 관능기의 예는 아미노, 히드록시 및 술폰히드릴기와 같은 친핵성기를 포함한다. 카프도프릴과 같은 술폰히드릴기를 함유하는 임의의 약물의 친유성 유도화를 위한 적합한 방법은 직접 알킬화, 예를 들면, 염기성 조건하에서 알킬 할라이드와의 반응 및 활성 카르복실산과의 반응에 의한 임의 에스테르 형성을 포함할 수 있다. 카르복실 관능성, 예를 들면 아테놀올 또는 클로록실산과의 반응에 의한 임의의 약물의 유도화의 대표적 인 예는 적합한 물리적 성질을 함유하는 아민 및 알콜과의 각각 커플링에 의한 아미드 및 에스테르 형성을 포함한다. 바람직한 실시 태양은 분해성 에스테르 결합을 형성함으로써 치료제 화합물의 콜레스테롤 부착을 포함한다.

본 발명의 바람직한 용도는 존재하는 혈관으로부터 분지하여 새로운 혈관이 생성되는 것인 맥관형성에 관한 것이다. 이 방법을 위한 1차 자극은 조직의 세포에 영양분 및 산소의 부적절한 공급 (저산소증)일 수 있다. 이 세포는 많은 맥관형성 인자를 분비함으로써 반응할 수 있는데; 하나의 예는 혈관 내피 성장 인자이다. 이러한 인자는 기저막의 단백질을 분해하는 단백질 분해 효소 뿐만 아니라 이러한 가능한 유해 효소의 작용을 제한하는 억제제의 분비를 개시한다. 부착의 손실 및 맥관형성 인자를 위한 리포터로부터의 신호의 조합된 효과는 내피 세포를 이동, 증식 및 재배열시키고, 최종적으로 신규 혈관 주위 기저막을 형성한다.

종양은 길이가 밀리미터 크기에 이르는 경우 그의 성장 속도를 유지하기 위해서 맥관형성을 개시해야만 한다. 맥관형성이 내피 세포 및 그의 환경에서 특성 변화를 수반하기 때문에 이 방법은 치료적 조절을 위한 유망한 표적이다. 맥관형성을 수반하는 형질변환은 또한 진단을 위해 매우 유망하며, 바람직한 실시예는 악성 질환이지만, 이 개념은 또한 염증 및 다양한 염증-관련 질환에서 커다란 유망성을 나타낸다. 이러한 인자는 또한 심근층의 경색 부분의 재혈관화에 관련되어 있으며 협착증이 단시간내 생기는 경우에 발생한다.

맥관형성에 관련된 다수의 공지된 리포터/표적을 하기 표에 나타냈다. 본 명세서에 기재된 표적 원리를 사용하여 맥관형성은 약제에서 사용시 대부분의 화상 양식에 의해 검출될 수 있다. 콘트라스트-개선된 초음파는 추가의 장점을 가질 수 있으며, 조영제는 혈관의 내부에 제한되는 미세구이다. 표적 항원이 많은 세포 형태에서 발견되는 경우라도, 이 미세구는 내피 세포에 배타적으로 부착된다.

소위 프로드러그가 또한 본 발명에 따른 치료제로 사용될 수 있다. 따라서, 약물은 그들의 물리화학적 성질을 바꾸기 위해 유도되고 리포터내로 내포를 위해 적용될 수 있으며; 이렇게 유도된 약물은 프로드러그로 여겨질 수 있고 일반적으로 유도화기의 절단이 약물의 활성 형태를 재발생할 때까지 불활성이다.

병리의 영역에 대한 프로드러그-활성화 효소를 함유한 가스 충전된 마이크로버블을 표적화함으로써 효소를 표적하는 화상일 수 있고 마이크로버블이 병리의 영역에 적당하게 표적되고 동시에 비표적 영역으로부터 사라지는 경우에 가시화시키는 것이 가능하다. 이 방법으로 개개의 환자에게 프로드러그의 주입을 위한 적합한 시간을 결정할 수 있다.

다른 대안은 프로드러그가 일부 외부 자극 후에만 활성화되는 시스템에서 동일한 마이크로버블내에 프로드러그, 프로드러그-활성화 효소 및 벡터를 혼합하는 것이다. 이러한 자극은 예를 들면, 전술한 바와 같은 종양-특이 프로테아제 또는 목적하는 표적이 성취된 후에 외부 초음파에 의해 마이크로버블의 파열일

수 있다.

치료제는 본 발명에 따라 예를 들면, 심장, 일반 혈관에서의 질환 또는 괴사성 영역 및 간, 비장, 신장 및 임파 시스템, 신체 공동 또는 위장 시스템과 같은 기타 부위에 쉽게 전달될 수 있다.

본 발명에 따른 생성물은 생체내 또는 시험관 내에서 표적 치료제 전달을 위해 사용될 수 있다. 명세서 후반에서 이러한 생성물은 혈액 또는 조직 샘플에서 상이한 질환의 진단용 키트 또는 상이한 성분의 특성화와 같은 시험관 내 시스템에서 유용할 수 있다. 샘플로부터 특정 혈액 성분 또는 세포를 분리하기 위해 시험관내 중합체 입자 (예를 들면, 단일분산 자기 입자)에 이들을 부착하기 위한 것과 유사한 기술이 부유 및 반복 세척에 의해 가스-함유 물질의 분리를 위해 본 발명의 치료제에서 리포터 단위의 저밀도를 사용하여 사용될 수 있다.

본 발명에 따른 다중-특이 표적 추적가능한 조영제를 생성하는데 유용하게 사용될 수 있는 벡터는 다음을 포함한다:

i) 매우 광범위한 표적을 위한 벡터로서 사용될 수 있고, 매우 높은 특이성, 고친화성 (바람직한 경우), 필요에 따라 변형 친화성의 가능성과 같은 유리한 성질을 갖는 항체. 항체가 생활성인지 아닌지는 특정 벡터/표적 조합에 따라 다르다. 통상적 항체 및 유전적으로 처리된 항체 두 가지 모두 사용될 수 있으며, 유전적으로 처리된 항체는 예를 들면, 친화성 및 특이성에 관한 특정 필요에 대한 항체의 허용된 처리를 허용한다. 사람 항체의 사용은 벡터 분자에 대항하는 가능한 면역 반응을 피하기 위해 바람직할 수 있다. 항체의 추가로 유용한 종류는 하나의 항체 분자내에 2 개의 상이한 표적 분자에 대한 특이성을 갖는 소위 이특이성 항체이다. 이러한 항체는 예를 들면, 버블 클러스터의 형성을 증진시키는데 유용하고, 또한 다양한 치료 목적, 예를 들면, 표적에 독성 잔기 운송을 위해 사용될 수 있다. 이특이성 항체의 다양한 특징이 문헌[McGuinness, B.T. et al. in Nat. Biotechnol. (1996) 14, 1149-1154; by George, A.J. et al. in J. Immunol. (1994) 152, 1802-1811; by Bonardi et al. in Cancer Res. (1993) 53, 3015-3021; and by French, R.R. et al. in Cancer Res. (1991) 51, 2353-2361]에 기재되어 있다.

ii) 세포 부착 분자, 그의 수용체, 시토킨, 성장 인자, 펩티드 호르몬 및 그의 조각. 이러한 벡터는 표적 분자 수용체와의 정상 생물학적 단백질-단백질 상호작용에 의존하고, 많은 경우에 표적과 결합시 생물학적 반응을 발생시키고 따라서, 생활성이며; 이들은 프로테오글리칸을 표적하는 벡터와 비교적 중요하지 않은 관계일 수 있다.

iii) 세포 부착 분자, 시토킨, 성장 인자 및 펩티드 호르몬에 대한 수용체의 비펩티드 효능제/길항제 또는 비생활성 결합제. 이 카테고리는 효능제나 길항제가 모두 아니지만, 유용한 표적력을 나타낼 수 있는 비생활성 벡터를 포함할 수 있다.

iv) 와트슨-크릭 또는 기타 형태의 염기-쌍지음을 통해 DNA 또는 RNA를 결합하는 올리고뉴클레오티드 및 변형된 올리고뉴클레오티드. DNA는 일반적으로 세포 손상의 결과로서 세포외 공간에만 존재하여 일반적으로 비생활성인 이러한 올리고뉴클레오티드는, 예를 들면 많은 상이한 병리적 조건과 관련된 괴사성 영역의 표적에 유용할 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 특정 DNA- 또는 RNA-결합 단백질, 예를 들면, 종양 세포 또는 활성화 면역 또는 내피 세포에서 매우 종종 고도로 과발현되거나 활성화되는 전사 인자에 결합되기 위해 디자인될 수 있다. 조합 라이브러리는 임의의 가능한 표적 분자에 특이적으로 결합하는 올리고뉴클레오티드를 선택하기 위해 사용될 수 있고 따라서, 표적용 벡터로서 사용될 수 있다.

v) DNA-결합 약물은 올리고뉴클레오티드와 유사하게 행동할 수 있지만, 세포에 의해 흡수되는 경우 생물학적 활성 및(또는) 독성 효과를 나타낼 수 있다.

vi) 생물학적 수용체에 결합하는 것으로 공지된 생활성 화합물을 포함하여 다양한 소분자. 그러한 벡터 또는 그들의 벡터는 동일한 표적에 결합하는 비생활성 화합물을 생성하는데 사용될 수 있다.

vii) 벡터 분자는 화상되는 영역/구조에 결합하는 분자를 (시험관내에서, 생체외 또는 생체내에서) 기능적으로 선택함으로써 정확한 분자성 표적을 반드시 알지 않고도 조합 라이브러리로부터 발생될 수 있다.

viii) 다양한 종류의 생물학적 수용체에 결합하기 위해 공지된 생활성 화합물을 포함하는 다양한 소분자. 이러한 벡터 또는 그의 표적은 동일한 표적에 비생활성 화합물 결합을 발생시키기 위해 사용될 수 있다.

ix) 글루코사미노글리칸 축쇄, 예를 들면, 더 큰 분자의 글루코사미노글리칸-결합 부분을 포함하는 헤파란 술페이트에 결합하는 단백질 또는 펩티드는 글루코사미노글리칸 축쇄에 결합시 생물학적 반응을 일으키지 않는다. 프로테오글리칸은 적혈구에서는 발견되지 않으며, 이러한 세포에 대한 바람직하지 않은 흡수를 제거한다.

표적된 초음파 화상을 위해 특히 관심있는 기타 펩티드 벡터 및 그의 리포펩티드는 다음과 같다: YRALVDTLK, YAKFRETLEDTRDRMY 및 RALVDTEFKVKQEAGAK와 같은 아테롬성 동맥경화성 플라크 결합 펩티드; NQDGFEEIPEEYLQ 및 GPRG와 같은 트롬부스 결합 펩티드, PLYKKIHKLLLES와 같은 혈소판 결합 펩티드; 및 콜레스테롤, α -멜라노사이트-자극 호르몬, 열에 안정한 엔테로톡신 1, 바소액티브 장 펩티드, 제3 종쇄 상보성-결정 영역으로부터의 합성 알파-M2 펩티드 및 종양 표적용 그의 동족체.

다음 표는 특정 형태의 표적에 표적될 수 있는 다양한 벡터 및 이러한 벡터를 포함하는 본 발명에 따른 표적 추적가능한 진단 및(또는) 치료제를 위해 사용되는 표시된 영역을 나타낸다.

단백질 및 펩티드 벡터 - 항체

벡터 형태	표적	설명/사용 영역	Ref
(일반적인) 항체	CD34	일반적인 혈관 질환, 정상 혈관벽 (예를 들면, 심근층), 활성화 내피, 면역 세포	
"	ICAM-1	"	

"	ICAM-2	"	
"	ICAM-3	"	
"	E-셀렉틴	"	
"	P-셀렉틴	"	
"	PECAM	"	
"	인테그린, 예를 들면, VLA-1, VLA-2, VLA-3, VLA-4, VLA-5, VLA-6, $\beta_1\alpha_7$, $\beta_1\alpha_8$, $\beta_1\alpha_v$, LFA-1, Mac-1, CD41a 등	"	
"	GlyCAM	임파절에서 혈관벽 (임파절에 대해 상당히 특이적)	
"	MacCam 1	"	
"	피브리린	트롬비	
"	조직 인자	활성화 내피, 종양	
"	미오신	괴사, 심근경색증	
"	CEA(암배의 항원)	종양	
"	유신	종양	
"	다중 약물 내성 단백질	종양	
"	전립선 특이 항체	전립선암	
"	카텝신 B	종양 (다양한 종의 프로테아제가 종종 다양한 종양에서 다소 특이적으로 과발현됨 -카텝신 B는 이러한 프로테아제)	
"	트랜스페린 수용체	종양, 혈관벽	
MoAb 9.2.27		종양 세포 성장시 상승조절된 항체	
"	VAP-1	부착 분자	
	밴드 3 단백질	식세포 활성화 중 상승 조절됨	
	CD44	종양 세포	
	β_2 -마이크로-글로불린	일반적인	
	MHC 중 1	일반적인	
항체	인테그린 $\alpha_v\beta_3$	종양; 맥관형성	c
항체	CD44	종양 세포	a
항체	β_2 -마이크로-글로불린	일반적인	b
항체	MHC 중 1	일반적인	b

a) Heider, K. H., M. Sproll, S. Susani, E. Patzelt, P. Beaumier, E. Ostermann, H. Ahorn, and G. R. Adolf, 1996. 'Characterization of a high-affinity monoclonal antibody specific for CD44v6 as candidate for immunotherapy of squamous cell carcinomas'. Cancer Immunology Immunotherapy 43: 245-253.

b) I. Roitt, J. Brostoff, and D. Male. 1985. Immunology, London: Gower Medical Publishing, p. 4.7

c) Stromblad, S., and D. A. Cheresh. 1996. 'Integrins, angiogenesis and vascular cell survival'. Chemistry & Biology 3: 881-885.

단백질 및 펩티드 벡터 - 세포 부착 분자 등

벡터 형태	수용체	설명/사용 영역	Ref
L-셀렉틴	CD4 MadCAM1 GlyCam 1	일반적인 혈관 질환, 정상 혈관벽 (예를 들면, 심근층), 활성화 내피, 임파절	

기타 셀렉틴	탄수화물 리간드 (시알릴 루이스 x) 헤파란 술페이트	일반적인 혈관 질환, 정상 혈관벽 (예를 들면, 심근층), 활성화 내피	
RGD-펩티드	인테그린	"	
PECAM	PECAM, 및 기타	내피, 면역계에서 세포	
인테그린, 예를 들면, VLA-1, VLA-2, VLA-3, VLA-4, VLA-5, VLA-6, $\beta_1\alpha_7$, $\beta_1\alpha_8$, $\beta_1\alpha_v$, LFA-1, Mac-1, CD41a 등	라미닌, 콜라겐, 피브로넥틴, VCAM-1, 트롬보스포딘, 비트로넥틴 등	내피, 혈관벽 등	
인테그린 수용체, 예를 들면, 라미닌, 콜라겐, 피브로넥틴, VCAM-1, 트롬보스포딘, 비트로넥틴 등	인테그린, 예를 들면, VLA-1, VLA-2, VLA-3, VLA-4, VLA-5, VLA-6, $\beta_1\alpha_7$, $\beta_1\alpha_8$, $\beta_1\alpha_v$, LFA-1, Mac-1, CD41a 등	면역계에서 세포, 혈관벽 등	
신경 세포 부착 분자 (N-CAM)	프로테오글리칸 N-CAM (동종친화성)		
RGD-펩티드	인테그린	맥관형성	c

시토킨/성장 인자/펩티드 호르몬 및 그의 분절을 포함하는 벡터

벡터 형태	수용체	설명/사용 영역	Ref
상피 성장 인자	EGF-수용체 또는 관련 수용체	종양	
신경 성장 인자	NGF-수용체	종양	
소마토스타틴	ST-수용체	종양	
엔도텔린	엔도텔린-수용체	혈관벽	
인터루킨-1	IL-1-수용체	염증, 상이한 종류의 활성화 세포	
인터루킨-2	IL-2-수용체	"	
케모킨 (약 20 개의 상이한 시토킨이 부분적으로 분배된 수용체)	케모킨 수용체, 프로테오글리칸	염증	
종양 괴사 인자	TNF-수용체	염증	
파라티로이드 호르몬	PTH-수용체	골 질환 신장 질환	
골 형태발생성 단백질	BMP-수용체	골 질환	
칼시토닌	CT-수용체	골 질환	
콜로니 자극 인자 (G-CSF, GM-CSF, M-CSF, IL-3)	상응하는 특정 수용체, 프로테오글리칸	내피	
인슐린양 성장 인자 I	IGF-I 수용체	종양, 기타 성장 조직	
아트리알 나트륨이뇨성 인자	ANF-수용체	신장, 혈관벽	
바소프레신	바소프레신 수용체	신장, 혈관벽	
VEGF	VEGF-수용체	내피, 맥관형성의 영역	
섬유아세포 성장 인자	FGF-수용체, 프로테오글리칸	내피, 맥관형성	
슈반(Schwann) 세포 성장 인자	프로테오글리칸 특이 수용체		

다양한 단백질 및 펩티드 벡터

벡터 형태	수용체	설명/사용 영역	Ref
스트렙타비딘	신장	신장 질환	
세균성 피브로넥틴-결합 단백질	피브로넥틴	혈관벽	

항체의 Fc-파트	Fc-수용체	단핵세포 대식세포 간	
트랜스페린	트랜스페린-수용체	종양 혈관벽	
스트렙토키나제/조직 플라 스미노겐 활성화제	트롬비	트롬비	
플라스미노겐, 플라스민	피브리	트롬비, 종양	
마스트 세포 프로테이나제	프로테오글리칸		
엘라스타제	프로테오글리칸		
리포프로테인 리파제	프로테오글리칸		
응집 효소	프로테오글리칸		
세포외 슈퍼옥시드 디스무 타제	프로테오글리칸		
헤파린 조인자 II	프로테오글리칸		
망막 생존 인자	프로테오글리칸 특이 수용체		
헤파린-결합 뇌 유사분열 물질	프로테오글리칸 특이 수용체		
아폴리포프로테인, 예를 들면, 아폴리포프로테인 B	프로테오글리칸 특이 수용체 (예를 들면, LDL 수용체)		
아폴리포프로테인 E	LDL 수용체 프로테오글리칸		
부착-증진 단백질, 예를 들면, 푸르푸린		프로테오글리칸	
바이러스성 코트 단백질, 예를 들면, HIV, 헤르페스		프로테오글리칸	
미생물성 어드헤신	'항원 85' 미코박테리아의 복합체	피브로박틴, 콜라겐, 피브리 노겐, 비트로박틴, 헤파란 술페이트	
β -아밀로이드 전구체	프로테오글리칸	알츠하이머 질환에서 β -아밀 로이드 축적물	
테나신, 예를 들면, 테나 신 C	헤파란 술페이트, 인테그린		

비펩티드 효능제/시토키닌의 길항제/성장 인자/펩티드 호르몬/세포 부착 분자를 포함하는 벡터

벡터 형태	수용체	설명/사용 영역	Ref
내피 길항제	내피 수용체	혈관벽	
데스모프레신 (바소프레 신 동족체)	바소프레신 수용체	신장 혈관벽	
데옥시톡신 (옥시토신 동족체)	옥시토신 수용체	생식 기관, 유선, 뇌	
안지오텐신 II 수용체 길항제 C-11974, TCV-116	안지오텐신 II 수용체	혈관벽 뇌 부신	
비펩티드 RGD-동족체	인테그린	면역계에서 세포 혈관벽 등	

항맥관형성 인자를 포함하는 벡터

벡터 형태	표적	설명/사용 영역	Ref
안지오테린	종양의 EC	플라스미노겐 분절	K
연골-유도된 억제제	종양의 EC		J
β -시클로옥시게네이스 테트라데카술페이트	종양, 염증		C
푸마길린 및 동족체	종양, 염증		E
인터페론- α	종양의 EC		K
인터페론- γ	종양의 EC		E

인터루킨-12	중양의 EC		E
리노미데	중양, 염증		A
메드록시프로게스테론	중양의 EC		K
메탈로프로테이나제 억제제	중양의 EC		K
펜토산 폴리설페이트	중양의 EC		K
혈소판 인자 4	중양의 EC		M
소마토스타틴	중양의 EC		K
수라민	중양의 EC		K
텍솔	중양의 EC		K
탈리도미드	중양의 EC		K
트롬보스폰딘	중양의 EC		K

맥관형성 인자를 포함하는 벡터

벡터 형태	표적	설명/사용 영역	Ref
산성 섬유아세포 성장 인자	중양의 EC		K
아데노신	중양의 EC		K
안지오제닌	중양의 EC		K
안지오텐신 II	중양의 EC		K
기저막 성분	중양	예를 들면, 테나신, 콜라겐 IV	M
염기성 섬유아세포 성장 인자	중양의 EC		K
브라디키닌	중양의 EC		K
칼시토닌 유전자-관련 펩티드	중양의 EC		K
상피 성장 인자	중양의 EC		K
피브린	중양		K
피브리노겐	중양		K
헤파린	중양의 EC		K
히스타민	중양의 EC		K
히알루론산 또는 그의 분절	중양의 EC		K
인터루킨-1 α	중양의 EC		K
라미닌, 라미닌 분절	중양의 EC		K
니코틴아미드	중양의 EC		K
혈소판 활성화 인자	중양의 EC		K
혈소판-유도 내피 성장 인자	중양의 EC		K
프로스타글란딘 E1, E2	중양의 EC		K
스페르민	중양의 EC		K
스페르민	중양의 EC		K
물질 P	중양의 EC		K
형질전환 성장 인자- α	중양의 EC		K
형질전환 성장 인자- β	중양의 EC		K
중양 과사 인자- α	중양의 EC		K
혈관 내피 성장 인자/혈관 투과성 인자	중양의 EC		K
비트로벡틴			A

맥관형성과 관련된 수용체에 대한 공지된 친화성을 갖는 것으로 인식된 맥관형성 인자 이외의 벡터 분자

벡터 형태	표적	설명/사용 영역	Ref
안지오포이에틴	중양, 염증		B
α_2 -항플라스민	중양, 염증		
조합 라이브러리, 화합물	중양, 염증	예를 들면: 분해 후 기저막에 결합하는 화합물	
엔도글린	중양, 염증		D
엔도시알린	중양, 염증		D
엔도스타틴 [콜라겐 분절]	중양, 염증		M
인자 VII 관련 항원	중양, 염증		D

피브리노겐	중양, 염증		ZC
섬유아세포 성장 인자, 염기성	중양, 염증		E
헤파토사이트 성장 인자	중양, 염증		I
인슐린양 성장 인자	중양, 염증		R
인터루킨	중양, 염증	예를 들면: IL-8	I
백혈병 억제 인자	중양, 염증		A
메탈로프로테이나제 억제제	중양, 염증	예를 들면, 바티마스타트	E
모노클로날 항체	중양, 염증	예를 들면: 맥관형성 인자 또는 그의 수용체 또는 섬유소용해성 시스템의 성분에 대한	
펩티드, 예를 들면, 시클린 RGD ₃ FV	중양, 염증		B, Q
태반 성장 인자	중양, 염증		J
태반 프로리페린-관련 단백질	중양, 염증		E
플라스미노겐	중양, 염증		M
플라스미노겐 활성화제	중양, 염증		D
플라스미노겐 활성화제 억제제	중양, 염증		U, V
혈소판 활성 인자 길항제	중양, 염증	맥관형성의 억제제	A
혈소판-유도 성장 인자	중양, 염증		E
플레이오트로핀	중양, 염증		ZA
프로리페린	중양, 염증		E
프로리페린 관련 단백질	중양, 염증		E
셀렉틴	중양, 염증	예를 들면, E-셀렉틴	D
SPARC	중양, 염증		M
백독(RGD-항유)	중양, 염증		Q
메탈로프로테이나제의 조직 억제제	중양, 염증	예를 들면, TIMP-2	U
트롬빈	중양, 염증		H
트롬빈-수용체-활성 테트라데카펩티드	중양, 염증		H
티미딘 포스포릴라제	중양, 염증		D
중양 성장 인자	중양, 염증		ZA

맥관형성과 관련된 수용체/표적

백터 형태	표적	설명/사용 영역	Ref
비글리칸	중양, 염증	데르마탄 술페이트 프로테오글리칸	X
CD34	중양, 염증		L
CD44	중양, 염증		F
콜라겐 I, IV, VI, VIII형	중양, 염증		A
데코린	중양, 염증	데르마탄 술페이트 프로테오글리칸	Y
데르마탄 술페이트 프로테오글리칸	중양, 염증		X
엔도텔린	중양, 염증		G
엔도텔린 수용체	중양, 염증		G
피브로넥틴	중양		P
Fik-1/KDR, Flt-4	중양, 염증	VEGF 수용체	D
FLT-1 (fms양 티로신 키나제)	중양, 염증	VEGF-A 수용체	O
헤파란 술페이트	중양, 염증		P
헤파토사이트 성장 인자 수용체 (c-met)	중양, 염증		I
인슐린양 성장 인자/만노스-6-포스페이트 수용체	중양, 염증		R

인테그린: β_3 및 β_5 , 인테그린 $\alpha_v \beta_3$, 인테그린 $\alpha_6 \beta_1$, 인테그린 α_6 , 인테그린 β_1 , 인테그린 $\alpha_2 \beta_1$, 인테그린 $\alpha_v \beta_3$, 인테그린 α_5 인테그린 $\alpha_v \beta_5$, 피브리린 수용체	중양, 염증	라미닌 수용체 피브로넥틴 수용체의 서브유닛	D, P
세포내 부착 분자-1 및 -2	중양, 염증		P

툽니모양 유전자 생성물	중양, 염증		T
Ly-6	중양, 염증	임파구 활성화 단백질	N
매트릭스 메탈로프로테이나제	중양, 염증		D
MHC 중 II	중양, 염증		
V자형 유전자 생성물	중양, 염증		T
오스테오펀틴	중양		Z
PECAM	중양, 염증	알리아스 CD31	P
플라스미노겐 활성화제 수용체	중양, 염증		ZC
혈소판-유도 성장 인자 수용체	중양, 염증		E
셀렉틴:E-, P-	중양, 염증		D
시알릴 루이스-X	중양, 염증	혈액군 항체	M
스트레스 단백질: 글루코스 조절된, 열 쇼크 웨일리즈 및 기타	중양, 염증	분자성 차폐론	
신데칸	중양, 염증		T
트롬보스폰딘	중양, 염증		M
TIE 수용체	중양, 염증	Ig- 및 EGF양 도메인을 갖는 티로신 키나제	E
조직 인자	중양, 염증		Z
메탈로프로테이나제의 조직 억제제	중양, 염증	예를 들면, TIMP-2	U
형질변형 성장 인자 수용체	중양, 염증		E
우로키나제형 플라스미노겐 활성화제 수용체	중양, 염증		D
혈관 세포성 부착 분자 (VCAM)	중양, 염증		D
혈관 내피 성장 인자 관련 단백질	중양, 염증		
혈관 내피 성장 인자-A 수용체	중양, 염증		K
폰 빌레브란트(von willebrand) 인자-관련 항체	중양, 염증		L

올리고뉴클레오타이드 벡터

벡터 형태	수용체	설명/사용 영역	Ref
반복 서열, 예를 들면 리보솜 RNA, A1u-서열에 대한 유전자에 대해 상보적인 올리고뉴클레오타이드.	괴사에 의해 제조될 수 있는 DNA	중양 심근경색증 괴사를 포함하는 모든 기타 질환	

질환-특이 돌연변이(예를 들면, 돌연변이된 종양유전자)에 대해 상보적인 올리고뉴클레오티드	관련 질환의 영역에서 과사에 의해 제조가능한 DNA	종양	
감염체의 DNA에 대해 상보적인 올리고뉴클레오티드	감염체의 DNA	바이러스성 또는 세균성 감염	
3중 또는 4중-나선 형성 올리고뉴클레오티드	전술한 예와 같음	전술한 예와 같음	
DNA- 또는 RNA-결합 단백질에 대한 인식 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드	DNA-결합 단백질, 예를 들면, 전사 인자 (종종 종양 또는 활성화 내피/면역 세포에서 과발현/활성화됨)	종양 활성화 내피 활성화 면역 세포	

변형 뉴클레오티드 벡터

벡터 형태	수용체	설명/사용 영역	Ref
포스포로티오에이트 올리고스	비변형 올리고스에 관한	비변형 올리고스에 관한	
2'-O-메틸 치환 올리고스	"	"	
환상 올리고스	"	"	
분해를 증가시키는 헤어핀 구조를 함유한 올리고스	"	"	
말단 포스포로티오에이트를 갖는 올리고스	"	"	
2'-플루오로 올리고스	"	"	
2'-아미노 올리고스	"	"	
올리고스에 결합된 DNA-결합 약물 (예를 들면, 하기 참조)	"	순올리고스와 비교시 증가된 결합 친화성	
펩티드 핵산 (PNA, 펩티드 골격을 갖는 올리고뉴클레오티드)	"	표준 올리고스에 비해 증가된 결합 친화성 및 안정성	

뉴클레오시드 및 뉴클레오티드 벡터

벡터 형태	수용체	설명/사용 영역	Ref
아데노신 또는 동족체	아데노신 수용체	혈관벽 심장	
ADP, UDP, UTP 및 기타	다양한 뉴클레오티드 수용체	많은 조직, 예를 들면, 뇌, 척수, 심장, 비장	

DNA-결합 약물을 포함하는 수용체

벡터 형태	수용체	설명/사용 영역	Ref
아크리딘 유도체 디스타마이신 네트롭신 액티노마이신 D 에키노마이신 블레오마이신 등	과사에 의해 제조가능한 DNA	종양, 심근경색증 및 과사 또는 세포로부터 DNA를 방출하는 기타 방법에 관련된 기타 모든 질환	

프로테아제 기질을 포함하는 수용체

벡터 형태	표적	설명/사용 영역	Ref
펩티드 또는 비펩티드성 기질	카텝신 B	종양, 다양한 종류, 예를 들면, 카텝신 B의 프로테아제를 다소 특이적으로 과발현시킬 수 있는 다양한 변종	

프로테아제 억제제를 포함하는 수용체

벡터 형태	표적	설명/사용 영역	Ref
펩티드 또는 비펩티드성 억제제, 예를 들면, N-아세틸-Leu-Leu-노르루시날	카텝신 B	종양, 다양한 종류, 예를 들면, 카텝신 B의 프로테아제를 다소 특이적으로 과발현시킬 수 있는 다양한 변종	
베스타틴([(2S,3R)-3-아미노-2-히드록시-4-페닐-부타노일]-L-루신 히드로클로라이드)	아미노펩티다제	종양, 예를 들면, 세포 표면 상	
페파블로크 (4-(2-아미노에틸)-벤젠술폰닐 플루오라이드 히드로클로라이드)	세린 프로테아제	종양, 혈관벽 등	
시판의 억제제, 예를 들면, 카프토프릴 에날라프릴 리시오노프릴	안지오텐신 변환 효소	내피 세포	
저특이성 비펩티드성 화합물	응집 인자	혈관벽 상해, 종양 등	
프로테아제 백신 (세포 외 프로테아제 억제제)	프로테오글리칸		
항트롬빈	프로테오글리칸, 응집 인자		

조합 라이브러리로부터의 벡터

벡터 형태	수용체	설명/사용 영역	Ref
발생 과정 중 결정된 구조를 갖는 항체	전술한 임의의 표적 - 또는 선택된 질환성 구조에 결합하는 벡터의 관능성 선택 제조시 모를 수 있음	관심있는 임의의 질환성 또는 정상 구조, 예를 들면, 트롬비, 종양 또는 심근층 혈관의 벽	
발생 과정 중 결정된 서열을 갖는 펩티드	"	"	
발생 과정 중 결정된 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드	"	"	
전술한 올리고스의 변형	"	"	
발생 과정 중 결정된 구조를 갖는 기타 화합물	"	"	

탄수화물 벡터

벡터 형태	수용체	설명/사용 영역	Ref
네오-글리코프로테인	대식세포	일반적 활성화/염증	
말단 갈락토스를 갖는 올리고사카라이드	아시알로-글리코프로테인 수용체	간	
히알루로난	아그레칸 (프로테오글리칸) '링크 단백질' 세포-표면 수용체: CD44		
만노스		혈액 뇌 배리어, 뇌종양 및 BBB에 변화를 일으키는 기타 질환	
세균성 글리코펩티드		"	

지질 벡터

벡터 형태	수용체	설명/사용 영역	Ref
LDL-유사 지질	LDL-수용체	동맥경화증	
혈소판 활성화 인자 (PAF) 길항제	PAF 수용체	염증의 진단	
염증의 프로스토킨란딘 길항제	프로스토킨란딘 수용체	염증의 진단	

소분자 벡터

벡터 형태	표적	설명/사용 영역	Ref
아드레날린	상응하는 수용체		
베타블로커	아드레날린성 베타-수용체	베타-1 블로커에 대한 심근총	
알파-블로커	아드레날린성 알파-수용체	혈관벽	
벤조디아제핀			
세로토닌-동족체	세로토닌-수용체		
항-히스타민	히스타민-수용체	혈관벽	
아세틸-콜린 수용체 길항제	ACh-수용체		
베라파밀	Ca ²⁺ -채널 블로커	심장 근육	
니페디핀	Ca ²⁺ -채널 블로커	심장 근육	
아밀로리데	Na ⁺ /H ⁺ -교환기	신장에서 이 교환을 블록하고 일반적으로 성장 인자에 의해 자극된 세포에서 상승조절된다.	
디지탈리스 글리코사이드	Na ⁺ /K ⁺ -ATP-ases	심근총 말단 혈관계, 중추 신경계	
트롬보제/ 프로스타글란딘 수용체 길항제 또는 효능제	트롬복산/프로스타글란딘 수용체	혈관벽, 내피	
글루타티온	글루타티온-수용체 루코트리엔-수용체	폐, 뇌	
비오틴	세포 표면 상 비오틴 수송 단백질		
플레이트	세포 표면 상 플레이트 수 송 단백질	종양	
리보플라빈	세포 표면 상 리보플라빈 수송 단백질		
메토트렉세이트	세포 표면 상 플레이트 수 송 단백질		
클로람부실	통상적인 전달기작		

<앞의 표에 대한 참고 문헌>

- A. Auerbach, W., and R. Auerbach. 1994. "Angiogenesis inhibition: a review". *Pharmac. Ther.* 63: 265-311.
- B. Barinaga, M. 1997. "Designing Therapies That Target Tumor Blood Vessels". *Science* 275 (Jan. 24): 482-484.
- C. Folkman, J., P. B. Weisz, M. M. Joullié, W. W. Li, and W. R. Ewing. 1989. "Control of Angiogenesis With Synthetic Heparin Substitutes". *Science* 243: 1490-1493.
- D. Fox, S. B., and A. L. Harris. 1997. "Markers of tumor angiogenesis: Clinical applications in prognosis and anti-angiogenic therapy". *Investigational New Drugs* 15 (1): 15-28.
- E. Gastl, G., T. Hermann, M. Steurer, J. Zmija, E. Gunsilius, C. Unger, and A. Kraft. May 1997.

"Angiogenesis as a target for tumor treatment". *Oncology* 54 (3): 177-184.

F. Griffioen, A. W., M. J. H. Coenen, C. A. Damen, S. M. M. Hellwig, D. H. J. Vanweering, W. Vooy, G. H. Blijham, and G. Groenewegen. 1 August 1997. "CD44 is involved in tumor angiogenesis; an activation antigen on human endothelial cells". *Blood* 90 (3): 1150-1159.

G. Hlatky, L., P. Hahnfeldt, and C. N. Coleman. 1996. "Vascular endothelial growth factor: environmental controls and effects in angiogenesis". *Brit. J. Cancer* 74 (Suppl. XXVII): S151-S156.

H. Maragoudakis, M. E., E. Pipili-Synethos, E. Sakkoula, D. Panagiotopoulos, N. Craniti, and J. M. Matsoukas. 1996. "Inhibition of TRAP-induced angiogenesis by the tripeptide Phe-Pro-Arg, a thrombin-receptor-derived peptide analogue". *Letters in Peptide Science* 3: 227-232.

I. Nguyen, M. 1997. "Angiogenic factors as tumor markers". *Investigational New Drugs* 15 (1): 29-37.

J. Ono, M., H. Izumi, S. Yoshida, D. Gtot, S. Jimi, N. Kawahara, T. Shono, S. Ushiro, M. Ryuto, K. Kohno, Y. Sato, and M. Kuwano. 1996. "Angiogenesis as a new target for cancer treatment". *Cancer Chemoter. Pharmacol.* 38 (Suppl.): S78-S82.

K. Passe, T. J., D. A. Bluemke, and S. S. Siegelman. June 1997. "Tumor angiogenesis: Tutorial on implications for imaging". *Radiology* 203 (3): 593-600.

- L. Saclarides, T. J. February 1997. "Angiogenesis in colorectal cancer". *Surgical Clinics of North America* 77 (1): 253.
- M. Sage, E. H. May 1997. "Pieces of eight: Bioactive fragments of extracellular proteins as regulators of angiogenesis". *Trends in Cell Biology* 7 (5): 182-186.
- N. Sagi-Assif, O., A. Traister, B. Z. Katz, R. Anavi, M. Eskenazy, and I. P. Witz. 1996. "TNF α and anti-Fas antibodies regulate Ly-6E.1 expression by tumor cells: A possible link between angiogenesis and Ly-6E.1". *Immunology Letters* 54: 207-213.
- O. Strawn, L. M., G. McMahon, H. App, R. Schreck, W. R. Kuchler, M. P. Longhi, T. H. Hui, C. Tang, A. Levitzki, A. Gazit, I. Chen, G. Keri, L. Orfi, W. Risau, I. Flamme, A. Ullirch, K. P. Hirth, and L. K. Shawyer. 1996. "Flk-1 as a Target for Tumor Growth Inhibition". *Cancer Res.* 56: 3340-3545.
- P. Stromblad, S., and D. A. Cheresh. December 1996. "Cell adhesion and angiogenesis". *Trends in Cell Biology* 6 (12): 462-468.
- Q. Stromblad, S., and D. A. Cheresh. November 1996. "Integrins, angiogenesis and vascular cell survival". *Chemistry & Biology* 3 (11): 881-885.
- R. Volpert, O., D. Jackson, N. Bouck, and D. I. H. Linzer. September 1996. "The insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor is required for proliferin-induced angiogenesis". *Endocrinology* 137 (9):

3871-3876.

S. Yoshida, O. M., T. Shono, H. Izumi, T. Ishibashi, H. Suzuki, and M. Kuwano. 1997. "Involvement of Interleukin-8, Vascular Endothelial Growth Factor, and Basic Fibroblast Growth Factor in Tumor Necrosis Factor Alpha-Dependent Angiogenesis". *Mol. Cell. Biol.* 17: 4015-4023.

T. Zimrin, A. B., M. S. Pepper, G. A. McMahon, F. Nguyen, R. Montesano, and T. Maciag. 1996. "An Antisense Oligonucleotide to the Notch Ligand Jagged Enhances Fibroblast Growth Factor-induced Angiogenesis <in vitro>". *J. Biol. Chem.* 271 (Dec. 20): 32499-3502.

U. Albini, A., R. Soldi, D. Giunciuglio, E. Giraud, R. Benelli, R. Primo, D. Noonan, M. Salio, G. Camussi, W. Rockl, and F. Bussolino. 1996. "The angiogenesis induced by HIV-1 Tat protein is mediated by the Flk-1/KDR receptor on vascular endothelial cells". *Nature Medicine* 2 (12 (Dec.)): 1371-1374.

V. Ferrara, N. 1996. "The biology of vascular endothelial growth factor". in *Molecular, Cellular and Clinical Aspects of Angiogenesis*, ed. M. E. Maragoudakis. New York: Plenum Press.

X. Jackson, R. L., S. J. busch, and A. J. Cardin. 1991. "Glycosaminoglycans: Molecular Properties, Protein Interactions, and Role in Physiological Processes". *Physiological Reviews* 71 (2): 481-435.

Y. Kinsella, M. G., C. K. Tsoi, H. T. Jarvelainen, and T. N. Wight. 1997. "Selective expression and processing

of biglycan during migration of bovine aortic endothelial cells - The role of endogenous basic fibroblast growth factor". *Journal of Biological Chemistry* 272: 318-325.

Z. Folkman, J. 1996. Tumor angiogenesis and tissue factor. *Nature Medicine* 2, 167-8

ZA. Relf, M., S. LeJeune, P.A. Scott, S. Fox, K. Smith, R. Leek, A. Moghaddam, R. Whitehouse, R. Bicknell and A.L. Harris. 1997. Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res.* 57, 963-9.

ZB. Carmeliet, P., L. Moons, M. Dewerchin, N. Mackman, T. Luther, G. Breier, V. Ploplis, M. Müller, A. Nagy, E. Plow, R. Gerard, T. Edgington, W. Risau, D. Collen. 1997. *Ann, N.Y. Acad. Sci.* 811, 191-206.

ZC. Van Hinsbergh, P. Koolwijk, R. Haanemaijer. 1997. "Role of fibrin and plasminogen activators in repair-associated angiogenesis: in vitro studies with human endothelial cells" *EXS* 79, 391-411.

Passe, T.J., D.A. Bluemke and S.S. Siegelman. 1997. *Radiology* 203: 593-600.

하기 비제한적인 실시예는 다중 수용체 특이성의 개념을 설명한다. 벡터, 스페이서 및 리포터의 다른 조합물 및 다중 벡터 도입을 유도하는 결합 기술도 또한 본 발명에서 중요하다고 생각된다. WO-A-9607434에 기재된 바와 같이, 현미경을 사용하여 생성물의 미세입자 특성의 확인을 수행하였다. 표준물과 비교하여 증가된 사운드 빔 감쇠를 나타내는 생성물의 현탁액에 대하여 넓은 밴드 트랜스듀서를 사용하여 초음파 전달 측정을 수행하였다. 현미경법 및(또는) 고정된 세포를 포함하는 유동 챔버를 사용하여, 예를 들어, 표적 구조물을 발현하는 세포 집락 및 표적을 발현하지 않는 추가의 세포 집락을 사용하여 발현하는 세포에 특이적으로 결합하는 표적된 제제의 활성을 연구할 수 있다. 방사성, 형광성 또는 효소-표지된 스트렙토아비딘/아비딘을 사용하여 비오틴 결합을 분석할 수 있다.

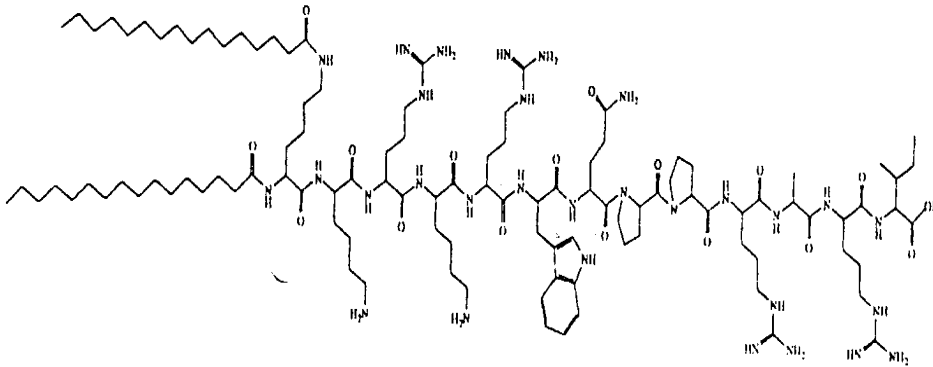
실시예

<실시예 1>

헤파린 술페이트 결합 펩티드(KRKR) 및 비브로넥틴 펩티드(WOPPRARI)를 함유하는 리포펩티드로 '도핑된' DSPS의 다중-특이 가스-함유 마이크로버블의 제조 및 생물학적 평가.

이 실시예는 직선 서열로 배열된 다중 펩티드 벡터를 포함하는 표적 마이크로버블의 제조에 관한 것이다.

a) 헤파린 술페이트 결합 펩티드(KRKR) 및 비브로넥틴 펩티드(WOPPRARI)로 이루어진 리포펩티드의 합성



1 밀리몰 아미노산 카트리지를 사용하여 0.1 밀리몰 스케일상에서 Fmoc-Ile-Wang 수지(Novabiochem)로 출발하는 ABI 433A 자동 펩티드 합성기에서 리포펩티드를 합성하였다. 커플링전에 HBTU를 사용하여 모든 아미노산 및 팔미트산을 예비 활성화시켰다. 5% 페놀, 5% EDT, 5% 아니솔 및 5% H₂O를 함유하는 TFA 중에서 2 시간 동안 수지로부터의 펩티드 및 측쇄 보호기의 동시 제거를 수행하여, 150 mg의 수율로 조질의 생성물을 얻었다. 9 mL/분 유속의 70 내지 100%의 농도구배(A=0.1% TFA/물 및 B=MeOH)를 사용하는 정제 HPLC(Vydac 218TP1022 칼럼)으로 40분에 걸쳐 조질의 생성물 40 mg 분액을 정제하였다. 건조 동결 후 순수한 물질 16 mg을 얻었다(분석 HPLC: 구배, 70 내지 100%B, 여기서, B=MeOH, A= 0.1% TFA/물, 칼럼- Vydac 218TP1022: 검출- UV 260 및 형광법, Ex₂₈₀, Em₃₅₀—생성물 보유 시간= 19.44 분). MALDI 질량 분광법을 사용하여 추가로, 생성물의 특성화를 수행하였다; M+H 예상치 2198, 실측치 2199

b) 헤파린 술페이트 결합 펩티드(KRKR) 및 비브로넥틴 펩티드(WOPPRARI)로 이루어진 다중-특이 리포펩티드로 '도핑된' DSPS의 가스-흡유 마이크로버블의 제조

DSPS(Avanti, 4.5 mg) 및 a)의 리포펩티드를 칭량하여 2개의 바이알 중에 넣고, 1.4% 프로필렌 글리콜 /2.4% 글리세롤 용액 0.8 ml을 각 바이알에 가하였다. 이 혼합물을 5분 동안 80 °C로 가온시켰다(가온시키는 동안 교반함). 시료를 실온으로 냉각시키고, 상부 공간을 퍼플루오로부탄 가스로 플라밍시켰다. 바이알을 캡 혼합기 중에서 45 초 동안 흔들고, 방배 마이크로버블을 롤링시켰다. 버블을 탈이온수로 여러번 세척하고, 쿨터(Coulter) 계수기(크기: 1 내지 3 미크론(87%), 3 내지 5 미크론(11.5%)) 및 파동 감쇠량(최대 감쇠수: 3.5 MHz)으로 분석하였다. 마이크로버블은 120 mmHg에서 안정하였다.

하기와 같이, MALDI 질량 분광 분석을 사용하여 DSPS 마이크로버블 중으로의 도입을 확인하였다. 약 0.05 내지 0.1 ml의 마이크로버블 현탁액을 깨끗한 바이알 중에 옮기고, 0.05 내지 0.1 ml의 메탄올을 가하였다. 현탁액을 30 초 동안 음파 파쇄시키고, 용액을 MALDI MS로 분석하였다. 리포펩티드에 대해서 양성 모드는 2200에서 M + H를 나타내었고, 예측치는 2198이었다.

c) 헤파린 술페이트 결합 펩티드(KRKR) 및 비브로넥틴 펩티드(WOPPRARI)로 이루어진 다중-특이 리포펩티드로 '도핑된' DSPS의 가스-흡유 마이크로버블의 시험관내 연구:

유동 조건하 내피 세포에정상 배꼽대(ATCC CRL-1998)로부터 유도된 사람 내피 세포계 ECV 304를 L-글루타민 200 mM, 페니실린/스테판토마이신 (10.000 U/ml 및 10.000 mcg/ml) 및 10% 소태아 혈청(Hyclone Lot no. AFE 5183)이 가해진 RPMI 1640 배지(Bio Whittaker)의 260 ml 눈크(Nunc) 배양 플라스크(chutney 153732) 중에서 배양하였다. 합류에 도달시, 세포를 1:5 내지 1:7의 분할비로 2차 배양하였다. 22 mm 직경의 커버 유리(BDH, Cat no. 406/0189/40)을 살균하고, 혈청을 갖는 0.5 ml 완전 배지 중의 세포를 상부에 가하기 전에 12 웰 배양 플레이트(Costar)의 바닥위에 놓았다. 세포가 합류에 달할 때, 커버슬립을 통상 제조된 유동 챔버 내에 놓았다. 챔버는 세포와 함께 커버슬립이 놓인 유리 플레이트 중에 새겨진 그루브(groove)로 이루어지고, 세포는 유동 채널을 형성하는 그루브와 접하고 있다. 섹션 b)의 초음파 마이크로버블을 유동 챔버를 통하여 섭씨 37 °C에서 유지된 저장고로부터 통과시키고, 페리스탈틱(peristaltic) 펌프를 사용하여 다시 저장고로 보내었다. 유속을 조절하여 생리학적으로 적절한 전단력을 촉진시켰다. 유동 챔버를 현미경에 놓고, 미세구 및 세포간의 상호작용을 직접 보았다. 현미경 위에 놓인 카메라를 컬러 비디오 프린터 및 모니터에 연결하였다. 세포상의 마이크로버블의 점차적인 축적이 일어났고, 이는 유속에 의존적이었다. 유속이 증가하면 세포는 커버슬립으로부터 탈리되기 시작하고 마이크로버블은 여전히 세포에 결합되어 있었다. 백터를 갖지 않은 대조 버블은 내피 세포에 부착하지 않았고, 최소 유동 조건하에서 세포로부터 사라졌다.

d) 개의 생체 실험

경우 1)

22 kg의 잡종 개를 펜토바르비탈로 마취시키고, 기계적으로 환기시켰다. 중간선 흉골절개로 가슴을 열고, 전방의 심막을 제거하고, 교질화된 실리콘 고무 스페이서 30 mm를 심장과 ATL HD1-3000 초음파 스캐너의 P-5 트랜스듀서 사이에 삽입하였다. 지연된 ECG 반응유발에 의해서 각 말단-시스템 중에 일단 영상화하는 간헐적인 단축에 스캐너를 고정시켰다. b)로부터의 마이크로버블 2 ml 전체 부피를 정맥 주사로 신속하게 주사하였다. 3 초 후, 영상화된 우심실이 콘트라스트 물질을 포함하고 있는 것이 보였고, 또 3 초 후, 좌심실이 또한 충전되고, 좌심실의 후방부가 희미하게 나타난 일시적인 감쇠 음영이 관찰되었다. 또한, 감쇠 음영이 진정되었을 때, 좌심실에서 멀리 떨어진 심장 부위에서 심근층의 명도가 실질적으로 증가하는 것이 보였다. 초기의 주사 후, 영상화된 조직 부위에서 초음파 조영제 버블을 파괴시키

는 공지된 방법을 사용하여 초음파 스캐너를 연속적이고 높은 프레임 속도와 높은 출력 파워 영상으로 고정시켰다. 몇 초 후, 스캐너를 다시 그의 초기값으로 조절하였다. 그 후, 심근층은 보다 어두워졌고, 기본값에 보다 가까워졌다. 영상화된 슬라이스를 새로운 위치로 이동시키면서 콘트라스트 효과를 다시 나타나게 하였고, 슬라이스를 다시 초기 위치로 이동시키면서 다시 기본값에 가까운 조직 명도가 나타나게 되었다.

경우 2)

제조에서 리포펩티드가 포함된 것을 제외하고, 상기 b)와 동일한 방법으로 제조된 마이크로버블 2 ml 전 체 부피를 상기와 같은 동일한 영상화 방법을 사용하여 주사하였다. 심근 에코 증가는 훨씬 덜 심하였고, 경우 1에서 관찰된 것 보다 더 짧은 지속 시간이었다. 좌심실 감쇠상이 끝난 시점에서, 또한 심근 콘트라스트 효과는 거의 대부분 손실되었고, 경우 1에서 관찰되지 않았던 것과 같이 좌심실의 전방 부에서 심근 에코는 증가하였다.

<실시에 2>

헤파린 술페이트 결합 펩티드(KRKR) 및 비브로백틴 펩티드(WOPPRARI)를 함유하는 리포펩티드 및 RGDC-Mal-PEG₂₀₀₀-DSPE로 '도핑된' DSPS의 다중-특이 가스-함유 마이크로버블

이 실시예는 다중 펩티드 벡터를 포함하는 표적 마이크로버블의 제조에 관한 것이다.

a) 3-말레이미도프로피오닐아미도-PEG₂₀₀₀-아실디스테아로일 포스파티딜에탄올아민(PE-PEG₂₀₀₀-Mal)의 합성

클로로포름/메탄올 (3:1)의 용액 중의 디스테아로일 포스파티딜 에탄올아민 (DSPE) (37.40 mg, 0.005 밀리몰), N-히드록시숙신아미도-PEG₂₀₀₀-말레이미드, NHS-PEG-MAL (100 mg, 0.25 밀리몰) 및 트리ethyl아민 (35 μ l, 0.25 밀리몰)의 혼합물을 실온에서 24 시간 동안 교반하였다. 감압하에서 용매를 증발시킨 후, 잔사를 플래쉬 크로마토그래피(클로로포름/메탄올, 8:2)에 의해서 정제하였다. 생성물은 92 mg (66 %)의 백색 왁스로서 얻어졌고, NMR 및 maldi-MS에 의해서 구조를 증명하였다.

b) RGDC의 합성

ABI 433A 자동화된 펩티드 합성기(0.25 밀리몰 스케일, Fmoc-Cyc(Trt)-Wang 수지)상에서 RGDC 펩티드를 합성하였다. HBTU를 사용하여 모든 아미노산을 활성화시켰다. 수지로부터 조절의 펩티드를 제거하고, 동시에 5 % EDT, 5 % 페놀 및 5 % 물을 함유하는 THF 중에서 탈보호하였다. 과량의 분해 용액을 증발시킨 후, 펩티드를 침전시키고, 공기 건조시키기 전에 디에틸 에테르로 여러번 연마하였다. 조절의 펩티드를 정제 Hplc로 정제하고, 순수 생성물을 포함하는 분획을 합하여 동결 건조시켰다. 분석 hplc 및 MALDI-MS 최종적인 특성화를 수행하였다.

c) 헤파린 술페이트 결합 펩티드(KRKR) 및 비브로백틴 펩티드(WOPPRARI)를 함유하는 리포펩티드 및 RGDC-Mal-PEG₃₄₀₀-DSPE로 '도핑되고', 포스파티딜세린-캡슐화된 다중-특이적 가스-충전된 마이크로버블의 제조

DSPS(Avanti, 4.5 mg), 실시예 1 a)로부터의 리포펩티드(0.5 mg) 및 섹션 a)로부터의 PE-PEG-MAL(0.5 mg)을 칭량하여 깨끗한 바이알 중에 넣고, 1.4 % 프로필렌 글리콜/2.4 % 글리세롤 용액 1.0 ml을 가하였다. 이 혼합물을 3 내지 5 분 동안 음파 파쇄시키고, 5 분 동안 80 °C로 가온시킨 후, 4.5 미크론 필터를 통하여 여과시켰다. 이 혼합물을 실온으로 냉각시키고, 상부 공간을 퍼플루오로부탄 가스로 플라싱시켰다. 바이알을 캡 혼합기 중에서 45 초 동안 흔들고, 3 분 동안 1000 rpm에서 마이크로버블을 원심 분리시켰다. 유동액을 펩티드 RGDC 1 mg를 포함하는 PBS 1 ml로 교환하고, pH를 8로 조정하였다. 결합 반응은 2 시간 동안 진행하였다. MALDI-MS에서 관찰된 바와 같이 모든 미반응된 RGDC가 유동액으로부터 제거될 때까지 버블을 PBS 중에서 세척한 후, 물로 세척하였다.

d) 시험관내 결합 분석

실시예 2 c)에서 설명된 시험관내 시험을 사용하여, 내피 세포에 마이크로버블의 결합을 유동 조건하에서 수행하였다. 세포상의 마이크로버블의 점차적인 축적이 일어났고, 이는 유속에 의존적이었다. 벡터를 갖지 않은 대조 버블은 최소 유동 조건하의 세포로부터 탈리되는 내피 세포에 부착하지 않았다.

<실시에 3>

티올화된 안티-CD62-Mal-PEG₂₀₀₀-PE 및 티올화된 안티-ICAM-1-Mal-PEG₂₀₀₀-PE 및 DSPS로 캡슐화된 다중-특이 가스-함유 마이크로버블

이 실시예는 표적된 초음파에 대한 다중 항체 벡터를 포함하는 표적 마이크로버블의 제조에 관한 것이다.

a) PE-PEG₂₀₀₀-Mal 및 DSPS로 캡슐화된 가스-함유 마이크로버블의 제조

DSPS(Avanti, 4.5 mg) 및 실시예 2 a)로부터의 PE-PEG₂₀₀₀-MAL(0.5 mg)을 칭량하여 깨끗한 바이알 중에 넣고, 1.4 % 프로필렌 글리콜/2.4 % 글리세롤 용액 1.0 ml을 가하였다. 이 혼합물을 5 분 동안 80 °C로 가온시킨 후, 4.5 미크론 필터를 통하여 여과시켰다. 이 혼합물을 실온으로 냉각시키고, 상부 공간을 퍼플루오로부탄 가스로 플라싱시켰다. 바이알을 캡 혼합기 중에서 45 초 동안 흔들고, 미세기후, 물로 세척하였다.

b) 안티-CD62 및 안티-ICAM-1 항체의 티올화

PBS 완충액(pH 7, 0.5 ml)중에 용해시킨 안티-CD62 및 안티-ICAM-1 항체 각 0.3 mg에 트라우트(Traut) 시약을 가하고, 이 용액을 실온에서 1 시간 동안 교반하였다. NAP-5 칼럼(Pharmacia)상의 개질된 단백질로부터 과량의 시약을 분리하였다.

b) DSPE-PEG₂₀₀₀-MAL 및 DSPS로 캡슐화된 다중-특이 가스-함유 마이크로버블에 티올화된 안티-CD62 및 안티-ICAM-1 항체의 결합

b)로부터의 혼합 티올화된 항체 0.5 mg 제조물을 a)로부터의 마이크로버블 분액에 가하고, 롤러 테이블상에서 결합 반응을 30 분 동안 수행하였다. 2000 rpm에서 5 분 동안 원심분리 후, 유동액을 제거하였다. 마이크로버블을 물로 3 회 세척하였다.

또한, 예를 들어, 보다 긴 PEG₃₄₀₀ 및 PEG₆₀₀₀, 또는 보다 짧은 PEG₆₀₀ 및 PEG₈₀₀을 포함하기 위해서 PEG 스페이서 길이는 다양할 수 있다. 또한, 티올화된 안티-CD34와 같은 제3의 항체의 부가를 들 수 있다.

<실시예 4>

피브로넥틴 펩티드 서열 NH₂F.N.F.R.L.K.A.G.O.K.I.R.F.G.G.G.W.O.P.P.R.A.I.OH 및 PS 결합 성분을 함유하는 융합 펩티드 및 폴리리신으로 비공유적으로 코팅된 DSPS의 다중-특이 가스-함유 마이크로버블

a) PS 결합 성분/피브로넥틴 펩티드 서열 NH₂F.N.F.R.L.K.A.G.O.K.I.R.F.G.G.G.W.O.P.P.R.A.I.OH의 합성

1 밀리몰 아미노산 카트리지를 사용하여 0.1 밀리몰 스케일상에서 Fmoc-Ile-Wang 수지로 출발하는 ABI 433A 자동 펩티드 합성기에서 펩티드를 합성하였다. 커플링 전에 HBTU를 사용하여 모든 아미노산을 예비 활성화시켰다. 5 % 페놀, 5 % EDT 및 5 % H₂O를 함유하는 TFA 중에서 2 시간 동안 수지로부터의 펩티드 및 측쇄 보호기의 제거를 동시에 수행하여, 302 mg의 수율로 조질의 생성물을 얻었다. 9 mL/분 유속의 20 내지 40 %의 농도구배(A=0.1 % TFA/물 및 B=0.1 % TFA/아세트오닐리드)를 사용하는 정제 HPLC(Vydac 218TP1022 칼럼)으로 40 분에 걸쳐 조질의 생성물 25 mg 분액을 정제하였다. 건조 동결 후 순수한 물질 10 mg을 얻었다(분석 HPLC; 구배, 20 내지 50 % B, 여기서, B=0.1 % TFA/아세트오닐리드, A= 0.01 % TFA/물, 칼럼- Vydac 218TP1022; 검출- UV 214 및 214 nm- 생성물 보유 시간= 12.4 분). MALDI 질량 분광법을 사용하여 추가로, 생성물의 특성화를 수행하였다; MH⁺ 예상치 2856, 실측치 2866

b) PS 결합 성분/피브로넥틴 단편 융합 펩티드 NH₂F.N.F.R.L.K.A.G.O.K.I.R.F.G.G.G.W.O.P.P.R.A.I.OH 및 폴리리신으로 비공유적으로 코팅된 DSPS의 마이크로버블의 제조

DSPS(Avanti, 5 mg)을 칭량하여 폴리-L-리신(Sigma, 0.2 mg) 및 상기 a)로부터의 펩티드(0.2 mg)와 함께 깨끗한 바이알 중에 넣었다. 이 바이알에 1.4 % 프로필렌 글리콜/2.4 % 글리세롤 용액 1.0 ml를 가하였다. 이 혼합물을 5 분 동안 80 °C로 가온시켰다. 이시료를 실온으로 냉각시키고, 상부 공간을 퍼플루오로부탄 가스로 플러싱시켰다. 바이알을 캡 혼합기 중에서 45 초 동안 흔들고, 3 분 동안 1000 rpm에서 마이크로버블을 원심분리시켰다. 물, PBS 및 물로 잘 세척한 후, 최종 용액을 MALDI-MS를 사용하여 폴리리신 및 펩티드에 대해서 시험하였다. 최종 세척 용액에서 폴리펩티드 물질은 관찰되지 않았다. 그 후, 아세트오닐리드(0.5 ml)를 가하고, 마이크로버블을 음파 파쇄로 파괴하였다. 그 후, MALDI-MS를 사용하여 폴리리신 및 PS-결합/피브로넥틴 융합 펩티드에 대한 생성되는 용액 분석을 수행하였다. 결과를 하기에 나타내었다.

	MALDI 예상치	MALDI 실측치
폴리-L-리신	786, 914, 1042, 1170	790, 919, 1048, 1177
DSPS-결합 단백질	2856	2866

PS 결합/피브로넥틴 융합 펩티드(-GGG-) 범위내 포함된 스페이서 요소는 또한 PEG₃₄₀₀ 또는 폴리알라닌(-AAA-)과 같은 다른 스페이서로 대체시킬 수 있다. 또한, 예비 표적 형태를 사용함으로써 DSPS 결합/피브로넥틴 단편 융합 펩티드가 먼저 피브로넥틴 펩티드 결합을 통하여 세포와 관련되도록 하는 것을 들 수 있다. 이는 PS 마이크로버블의 투여 후 PS 결합 펩티드에 결합함으로써 수행된다.

<실시예 5>

포스파티딜세린 및 비오틴-PEG₃₄₀₀-알라닌-콜레스테롤로 캡슐화되고, 스트렙타비딘/비오틴-엔도텔린-1 펩티드(비오틴-D-Trp-Leu-Asp-Ile-Trp.OH) 및 비오틴-피브린-안티 폴리머러트 펩티드(비오틴-GPRPPERHQS.NH₂)로 관능화된 다중-특이 가스-함유 마이크로버블

이 실시예는 비오틴화된 수용체 및 벡터 사이의 링커로서 스트렙타비딘을 사용함으로써 표적된 초음파 마이크로버블의 제조에 관한 것이다.

a) 비오틴-PEG₃₄₀₀-β-알라닌 콜레스테롤의 합성

클로로포름/메탄올 (2.6:1) 3 ml 중의 콜레스테롤-β-알라닌 염화수소(15 mg, 0.03 밀리몰) 용액에 트리 에틸아민(42 mL, 0.30 밀리몰)을 가하였다. 이 혼합물을 실온에서 10 분 동안 교반하고, 1.4-디옥산(1 ml)중의 비오틴-PEG₃₄₀₀-NHS(100 mg, 0.03 밀리몰)을 적가하였다. 실온에서 3 시간 동안 교반한 후, 이 혼합물을 증발 건조시키고, 잔사를 플래쉬 크로마토그래피로 정제하여 102 mg (수율 89 %)의 백색 결정을 얻었다. NMR 및 MALDI-MS에 의해서 구조를 입증하였다.

b) 비오틴화된 엔도텔린-1 펩티드(비오틴-D-Trp-Leu-Asp-Ile-Trp.OH)의 합성

1 밀리몰 아미노산 카트리지를 사용하여 0.1 밀리몰 스케일상에서 Fmoc-Trp(Boc)-Wang 수지로 출발하는 ABI 433A 자동 펩티드 합성기에서 펩티드를 합성하였다. 커플링 전에 HBTU를 사용하여 모든 아미노산을 예비 활성화시켰다. 5 % 아니솔 및 5 % H₂O를 함유하는 TFA 중에서 수지로부터의 펩티드 및 측쇄 보호기의 제거를 동시에 수행하여, 75 mg의 수율로 조질의 생성물을 얻었다. 9 mL/분 유속의 30 내지 80 %의 농도 구배(A=0.1 % TFA/물 및 B=0.1 % TFA/아세트오닐리드)를 사용하는 정제 HPLC(Vydac 218TP1022 칼럼)으로 40

분에 걸쳐 조질의 생성물 20 mg 분액을 정제하였다. 순수한 분획의 건조 동결 후 순수한 물질 2 mg을 얻었다(분석 HPLC: 구배, 30 내지 80 % B, 여기서, B=0.1 % TFA/아세트니트릴, A= 0.01 % TFA/물, 칼럼-Vydac 218TP1022: 검출- UV 214 nm- 생성물 보유 시간= 12.6 분). MALDI 질량 분광법을 사용하여 추가로, 생성물의 특성화를 수행하였다; M+H 예상치 1077, 실측치 1077

c) 비오틴-피브린-안티 폴리머러트 펩티드(비오틴-GPRPPERHQS.NH₂)의 합성

이 펩티드는 섹션 b)에서 설명한 것과 동일한 프로토콜을 사용하여 합성하고 정제하였다. 순수한 생성물을 hplc 및 MALDI 질량 분광법을 사용하여 특성화하였다.

d) 포스파티달세린 및 비오틴-PEG₃₄₀₀-β-알라닌-콜레스테롤로 캡슐화된 다중-특이 가스-함유 마이크로버블

DSPS(Avanti, 4.5 mg) 및 섹션 a)의 비오틴-PEG₃₄₀₀-β-알라닌 콜레스테롤(0.5 mg)을 칭량하여 바이알 중에 넣고, 1.4 % 프로필렌 글리콜/2.4 % 글리세롤 용액 0.8 ml을 각 바이알에 가하였다. 이 혼합물을 5 분 동안 80 °C로 가온시켰다(가온시키는 동안 교반함). 시료를 실온으로 냉각시키고, 상부 공간을 퍼플루오로부탄 가스로 플라싱시켰다. 바이알을 캡 혼합기 중에서 45 초 동안 흔들고, 방새 마이크로버블을 롤링시켰다. 마이크로버블 현탁액을 탈이온수로 여러번 세척하고, 쿨터 계수기 및 파동 감쇠량(최대 감쇠수: 3.5 MHz)으로 분석하였다.

e) 플루오레세인 표지된 스트렙타비딘 및 섹션 b) 및 c)로부터의 비오틴화된 펩티드의 결합

d)로부터의 마이크로버블 제조물에 PBS (1 ml) 중에 용해된 플루오레세인 결합된 스트렙타비딘(0.2 mg)을 가하였다. 버블을 실온에서 3 시간 동안 롤러 테이블 상에 놓았다. 물로 잘 세척하고 형광 현미경으로 분석한 후, 마이크로버블을 비오틴-엔도텔린-1 펩티드(0.5 mg) 및 비오틴-피브린-안티-폴리머러트 펩티드(0.5 mg)를 함유하는 PBS 1 ml 중에 인큐베이션하였다. 비결합된 펩티드를 제거하기 위해서 마이크로버블을 잘 세척하였다.

<실시예 6>

포스파티달세린, 및 스트렙타비딘/비오틴-엔도텔린-1 펩티드(비오틴-D-Trp-Leu-Asp-Ile-Trp.OH) 및 비오틴-피브린-안티 폴리머러트 펩티드(비오틴-GPRPPERHQS.NH₂)의 혼합물과 함께 스트렙타비딘 '샌드위치'를 제조하는데 사용되는 비오틴화된 리포펩티드로 캡슐화된 다중-특이 가스-함유 마이크로버블

a) 리포펩티드 디팔미토일-리시닐-트립토파닐-리시닐-리시닐-리시닐(비오틴)-글리신의 합성

1 밀리몰 아미노산 카트리지를 사용하여 0.1 밀리몰 스케일상에서 Fmoc-Gly-Wang 수지(Novabiochem)로 출발하는 ABI 433A 자동 펩티드 합성기에서 리포펩티드를 합성하였다. 커플링 전에 HBTU를 사용하여 모든 아미노산 및 팔미트산을 예비 활성화시켰다. 5 % 페놀, 5 % EDT, 5 % 아니솔 및 5 % H₂O를 함유하는 TFA 중에서 2 시간 동안 수지로부터의 펩티드 및 촉매 보호기의 제거를 동시에 수행하여, 150 mg의 수율로 조질의 생성물을 얻었다. 9 mL/분 유속의 70 내지 100 %의 농도구배(A=0.1 % TFA/물 및 B=MeOH)를 사용하는 정제 HPLC(Vydac 218TP1022 칼럼)으로 40 분에 걸쳐 조질의 생성물 40 mg 분액을 정제하였다. 건조 동결 후 순수한 물질 14 mg을 얻었다(분석 HPLC: 구배, 70 내지 100 %B, 여기서, B=MeOH, A= 0.1 % TFA/물, 칼럼-Vydac 218TP1022: 검출- UV 260 및 형광법, Ex280, Em350 - 생성물 보유 시간= 22 분). MALDI 질량 분광법을 사용하여 추가로, 생성물의 특성화를 수행하였다; M+H 예상치 1478, 실측치 1471

b) 섹션 a)로부터의 비오틴화된 리포펩티드 서열로 '도핑된' DSDP의 가스-함유 마이크로버블의 제조

DSPS(Avanti, 4.5 mg) 및 a)의 리포펩티드(0.5 mg)을 칭량하여 2 개의 각 바이알 중에 넣고, 1.4 % 프로필렌 글리콜/2.4 % 글리세롤 용액 0.8 ml을 각 바이알에 가하였다. 이 혼합물을 5 분 동안 80 °C로 가온시켰다(가온시키는 동안 교반함). 시료를 실온으로 냉각시키고, 상부 공간을 퍼플루오로부탄 가스로 플라싱시켰다. 바이알을 캡 혼합기 중에서 45 초 동안 흔들고, 방새 마이크로버블을 롤링시켰다. 마이크로버블 현탁액을 탈이온수로 여러번 세척하고, 쿨터 계수기 및 파동 감쇠량으로 분석하였다. 실시예 1 b)에 설명한 바와 같이 MALDI 질량 분광 분석법을 사용하여 DSPS 마이크로버블 중으로의 도입을 확인하였다.

c) 포스파티달세린 및 비오틴화된 리포펩티드로 캡슐화되고, 스트렙타비딘/비오틴-엔도텔린-1 펩티드(비오틴-D-Trp-Leu-Asp-Ile-Trp.OH)/비오틴-피브린-안티 폴리머러트 펩티드(비오틴-GPRPPERHQS.NH₂)로 관능화된 다중-특이 가스-함유 마이크로버블의 제조

b)로부터의 마이크로버블 제조물을 실시예 5 섹션 e)에서 설명된 것과 유사한 방식으로 처리하였다.

<실시예 7>

포스파티달세린, 및 스트렙타비딘/비오틴-엔도텔린-1 펩티드(비오틴-D-Trp-Leu-Asp-Ile-Trp.OH) 및 비오틴-피브린-안티 폴리머러트 펩티드(비오틴-GPRPPERHQS.NH₂)의 혼합물과 함께 스트렙타비딘 '샌드위치'를 제조하는데 사용되는 비오틴-DPPE로 캡슐화된 다중-특이 가스-충전된 마이크로버블

a) 비오틴 함유 마이크로버블의 제조

깨끗한 바이알 중의 포스파티달세린(Avanti, 5 mg) 및 비오틴-DPPE(0.6 mg, Pierce)의 혼합물에 물 (1 ml) 중의 5 % 프로필렌글리콜-글리세롤을 가하였다. 이 분산액을 5 분 동안 80 °C로 가온시키고 나서, 실온으로 냉각시켰다. 상부 공간을 퍼플루오로부탄 가스로 플라싱시키고, 바이알을 캡 혼합기 중에서 45 초 동안 흔들었다. 원심분리 후, 유동액을 제거하고, 생성된 마이크로버블을 물로 잘 세척하였다.

b) 포스파티달세린, 및 스트렙타비딘과 비오틴-엔도텔린-1 펩티드(비오틴-D-Trp-Leu-Asp-Ile-Trp.OH) 및 비오틴-피브린-안티 폴리머러트 펩티드(비오틴-GPRPPERHQS.NH₂)의 혼합물을 갖는 비오틴-DPPE로 캡슐화된 가스-충전된 마이크로버블의 결합

<실시예 8>

포스파티딜세린, 스트렙타비딘-Succ-PEG-DSPE 및 비오틴화된 사람 엔도텔리움 IgG 항체 및 비오틴화된 트랜스페린의 혼합물로 캡슐화된 다중-특이 가스-충전된 마이크로버블

a) Succ-PEG₃₄₀₀-DSPE의 합성

예를 들어, 나알, 알, 및 쉬로이트, 에이.제이.(Nayar, R. and Schroit)의 문헌[Biochemistry(1985) 24, 5967-71]에 기술된 것과 유사한 방법에 의해서 숙신산 무수물을 사용하여 NH₂-PEG₃₄₀₀-DSPE를 카르복실화하였다.

b) 포스파티딜세린 및 Succ-PEG₃₄₀₀-DSPE로 캡슐화된 가스-충전된 마이크로버블의 제조

포스파티딜세린(90 내지 99.9 몰%) 및 Succ-PEG₃₄₀₀-DSPE(10 내지 0.1 몰%)의 혼합물(5 mg)에 물(1 ml) 중에 5 % 프로필렌글리콜-글리세롤을 가하였다. 분산액을 5 분 동안 80 °C 이하로 가열시킨 후 상온으로 냉각시켰다. 분산액(0.8 ml)을 바이알(0.1 ml)로 옮기고, 상부 공간을 퍼플루오로부탄 가스로 플라싱시켰다. 바이알을 캡 혼합기 중에서 45 초 동안 흔들었다. 원심분리 후, 유동액을 물로 교환하고 세척을 반복하였다.

c) 포스파티딜세린 및 Succ-PEG₃₄₀₀-DSPE로 캡슐화된 가스-충전된 마이크로버블에 스트렙타비딘의 커플링

수용성 카프보이미드를 사용하는 표준 커플링 방법에 의해서 멤브레인의 Succ-PEG₃₄₀₀-DSPE에 스트렙타비딘을 공유적으로 결합하였다. 시료를 (10 내지 0.1 몰%)의 혼합물(5 mg)에 물(1 ml) 중에 5 % 프로필렌글리콜-글리세롤을 가하였다. 분산액을 5 분 동안 80 °C 이하로 가열시킨 후 상온으로 냉각시켰다. 분산액(0.8 ml)을 바이알(0.1 ml)로 옮기고, 상부 공간을 퍼플루오로부탄 가스로 플라싱시켰다. 바이알을 캡 혼합기 중에서 45 초 동안 흔들었다. 원심분리 후, 유동액을 물로 교환하고 세척을 반복하였다. 반응하는 동안 샘플을 롤러 테이블에 놓았다. 원심분리 후 유동액을 물로 교환하고, 세척을 반복하였다. 예를 들어, 형광 표지된 비오틴, 비오틴화된 항체(형광 표지된 제2 항체로 검출됨) 또는 비오틴화되고 형광성 또는 방사활성 표지된 올리고뉴클레오타이드에 결합하는 것으로 부착된 스트렙타비딘의 관능성을 분석하였다. 형광 현미경법 또는 섬광(scintillation) 계수법에 의해서 분석을 수행하였다.

d) 포스파티딜세린, 및 비오틴화된 트랜스페린과 사람 엔도텔리움 IgG 항체으로 비공유적으로 관능화된 스트렙타비딘-Succ-PEG₃₄₀₀-DSPE로 캡슐화된 다중-특이 가스-충전된 마이크로버블의 제조

바이엘(Bayer) 등의 문헌[Meth, Enzymol., 62, 308]에 서술된 방법을 사용하여 비오틴화된 사람 트랜스페린 및 사람 엔도텔리움 IgG 항체를 함유하는 용액 중에서 섹션 c)로부터의 마이크로버블을 인큐베이션하였다. 벡터-코딩된 마이크로버블을 상기 서술한 바와 같이 세척하였다.

<실시예 9>

포스파티딜세린/스트렙타비딘-Succ-PEG-DSPE 및 올리고뉴클레오타이드 비오틴-GAAAGGTAGTGGGGTCGTGTGCCGG 및 비오틴-GGCGCTGATGATGTTGTTGATTCTT로 캡슐화된 다중-특이 가스-충전된 마이크로버블

a) Succ-PEG₃₄₀₀-DSPE의 합성

실시예 8 a)에 설명한 바와 같다.

b) 포스파티딜세린 및 Succ-PEG₃₄₀₀-DSPE로 캡슐화된 가스-충전된 마이크로버블의 제조

실시예 8 b)에 설명한 바와 같다.

c) 포스파티딜세린 및 Succ-PEG₃₄₀₀-DSPE로 캡슐화된 가스-충전된 마이크로버블에 스트렙타비딘의 커플링

실시예 8 c)에 설명한 바와 같다.

d) 포스파티딜세린/스트렙타비딘-Succ-PEG-DSPE 및 올리고뉴클레오타이드 비오틴-GAAAGGTAGTGGGGTCGTGTGCCGG 및 비오틴-GGCGCTGATGATGTTGTTGATTCTT로 캡슐화된 다중-특이 가스-충전된 마이크로버블의 제조

섹션 c)로부터의 마이크로버블을 비오틴-GAAAGGTAGTGGGGTCGTGTGCCGG 및 비오틴-GGCGCTGATGATGTTGTTGATTCTT의 혼합물을 함유하는 용액 중에 인큐베이션하였다. 올리고뉴클레오타이드-코딩된 마이크로버블을 상기 설명한 대로 세척하였다. 버블에의 올리고뉴클레오타이드의 결합을 예를 들어, 버블 부착용 형광 표지된 올리고뉴클레오타이드를 사용하거나 표지된(형광 또는 방사활성) 상보적인 올리고뉴클레오타이드에 부착된 올리고뉴클레오타이드를 혼성화시킴으로써 검출하였다. 예를 들어, 부착된 올리고뉴클레오타이드에 대하여 상보적인 고정화된 DNA-함유 서열과 함께 버블을 혼성화함으로써 올리고뉴클레오타이드-포함 마이크로버블의 관능성을 분석하였다.

다른 유용한 실시예는 리보조말 DNA(하프라이드 게놈 당 많은 복사물)에 상보적인 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, 양 유전자에 상보적인 올리고뉴클레오타이드를 사용하였다.

<실시예 10>

포스파티딜세린, 및 피브로넥틴과 트랜스페린 단백질로 공유적으로 관능화된 포스파티딜에탄올아민으로 캡슐화된 다중-특이 가스-충전된 마이크로버블

a) 마이크로버블 제조

DSPS(Avanti, 4.5 mg) 및 DSPS(Avanti, 1.0 mg)을 칭량하여 깨끗한 바이알 중에 넣고, 1.4 % 프로필렌 글리콜/2.4 % 글리세롤 용액 1 ml을 가하였다. 이 혼합물을 5 분 동안 80 °C로 가온시키고 4.5 마이크론 필

터를 통하여 여과시켰다. 이 시료를 실온으로 냉각시키고, 상부 공간을 퍼플루오로부탄 가스로 플러싱시켰다. 바이알을 캡 흔하기 중에서 45 초 동안 흔들고, 마이크로버블을 증류수로 2 회 세척시킨 후, pH 9 의 0.1 M 나트륨 보레이트 중에 재현탁시켰다.

b) 피브로넥틴/트렌스페린의 변형

DSPS(0.5 mg) 및 트렌스페린(1.3 mg)을 PBS 중에 혼합시키고, DMSO 중의 NHS-플루오레신을 함유하는 용액을 가하였다. 혼합물을 실온에서 1 시간 동안 교반하고 나서, 단백질을 슈퍼덱스 200 칼럼상에서 정제하였다. pH 7.5의포스페이트 완충액 중의 플루오레신 표지된 단백질 혼합물을 동결 건조시켰다.

c) 마이크로버블 변형

b)로부터의 동결 건조된 생성물을 0.5 ml의 물 중에 재용해시키고, 플루오레신 표지된 피브로넥틴/트렌스페린 혼합물에 가교결합제 SDBP(Pierce) 0.1 밀리몰을 가하였다. 용액을 얼음상에서 2 시간 동안 인큐베이션하고, NAP-5 칼럼상에 로딩하고, PBS로 용출시켰다. 이에 a)로부터의 마이크로버블 현탁액 1 ml을 가하고, 실온에서 2 시간 동안 롤러 테이블 상에서 인큐베이션하였다. 마이크로버블을 유동시킴으로써 미반응된 물질을 제거한 후, 완충액을 물로 대체하였고, 이 과정을 3 회 반복하였다.

<실시예 11>

올리고뉴클레오티드 비오틴-GGCGCTGATGATGTTGTTGATTCTT 및 비오틴닐-엔도텔린-1 펩티드 비오틴-D-Trp-Leu-Asp-Ile-Trp.OH와 결합된 중합체 벽에 아비딘을 도입하는 다중-특이 공동(hollow) 중합체 분자의 제조

이 실시예는 표적/치료 용도를 위한 비-계면활성제에 부착된 다중 백터를 포함하는 중합체 초음파 조영제의 제조에 관한 것이다.

a) 중합체 벽에 아비딘을 도입하는 중합체 분자의 제조

하기 방법을 사용하여 수중유 에멀전의 오일동결 건조를 포함하는 방법에 의해서 아미빈을 포함하는 p73의 공동 중합체 분자(특히 WO 96/07434에 기재된 바와 같음)를 제조하였다: 60 °C에서 5 ml의 캄펜 중에 생분해성 중합체 p73[폴리(에틸렌 비스(16-히드록시헥사데카노에이트) 코 (아디프산))] 0.25 g을 용해시킴으로써 오일 용액을 제조하였다. 그 후, 60 °C에서 물 20 ml중의 α-(16-중합체 헥사데카노일록시헥사데카노일)-ω-메톡시폴리옥시에틸렌 에스테르 중합체 0.4 g을 용해시킴으로써 수용액을 제조하였다. 오일 용액(0.2 ml)을 비브리믹서(Capmix) 중에서 수용액 (0.8 ml)과 혼합하여 수중유 에멀전을 생성하였다. 에멀전을 드라이아이스 및 메탄올 중에서 동결시키고 나서, 200 mTorr의 압력에서 24 시간 동안 건조시켜 과량의 용매를 제거하였다. 분말은 1.0 ml 물을 가함으로써 공동 분자의 현탁액으로서 재구성되었다. 현미경 관찰, 쿨터 크기 분포, 음파 감쇠량 및 외부 압력에 대한 저항성에 의해서 생성되는 초음파 조영제를 확인하였다.

b) 비오틴-D-Trp-Leu-Asp-Ile-Trp.OH의 합성

실시예 5 b)에 설명한 바와 같다.

c) 아비딘을 도입하는 중합체 분자의 결합

a)로부터의 분자를 원심분리하고, 비오틴-GGCGCTGATGATGTTGTTGATTCTT 0.2 mg 및 상기 b)로부터의 비오틴-D-Trp-Leu-Asp-Ile-Trp.OH 0.2 mg와 결합된 함유하는 pH 7.5의 PBS 완충액 1 ml로 상등액을 대체하였다. 24 시간 동안 인큐베이션 후, 분자를 PBS 및 물로 잘 세척하였다.

<실시예 12>

다중-특이 표적을 위한 비오틴 함유 가스-충전된 알부민 미세구(GAM)의 관능화

a) 비오틴닐화된 알부민 미세구의 제조

알부민 5 mg/ml 중의 GAM 균질한 현탁액(6×10^6 분자/ml)를 사용하였고, 모든 제조 과정은 실온에서 수행하였다. 미세구의 부유(floatation)를 증가시키기 위해서 두 개의 10 ml 분액을 원심분리(170 x g, 5 분)하고, 남은 유동액 8 ml을 주의깊게 흡입하여 제거한 후, 동량의 공기-포화된 포스페이트 완충된 염수로 대체하고, 미세구를 재현탁시키기 위해서 침전물을 15 내지 20 분 동안 회전시켰다. 이 과정을 2 회 반복하였고, 그 후, 유리 미세구 관련 알부민의 극소량이 남을 것으로 생각된다. NHS-비오틴 50 μl(디메틸술폭시드 중의 10 mM)을 분액 중의 하나에 가하였다(최종 농도 50 μl); 나머지 (대조) 분액은 디메틸술폭시드의 50 μl을 받았다. 시료를 함유하는 튜브를 1 시간 동안 회전시킨 후, 미세구를 가교결합하기 위해서 50 % 수성 글루타르알데히드 20 μl 정도를 각 튜브에 가하였다. 더 회전시킨 후, 튜브를 방배 수직적으로 놓아 미세구가 이동 가능하게 하였다. 다음 날, 현탁액을 1 ml의 사람 혈청 알부민을 함유하는 포스페이트 완충된 염수(PBS/HSA)로 2 회 세척하고, 마지막 원심분리 후 PBS/HSA 중에 재현탁시켰다.

미세구 관련 비오틴의 존재를 결정하기 위해서, 고추 냉이 퍼옥시다제에 결합된 스트렙타비딘(스트렙-HRP)을 현탁액 모두에 가하고, 그 튜브를 1 시간 동안 회전시켜 반응시켰다. 그 후, 미세구를 3 회 세척하고, 0.1 mg/ml 페닐렌디아민 디히드로클로라이드 및 0.01 % 과산화수소를 함유하는 100 ml 시트레이트-포스페이트 완충액(pH 5) 중에 재현탁시키고, 10 분 동안 회전시켰다. 황록색 전개는 효소 존재의 표지이다. 하기 결과를 얻었다.

시료	색 전개
비오틴닐화된 구 + 스트렙-HRP	2 +
대조 구 + 스트렙-HRP	+

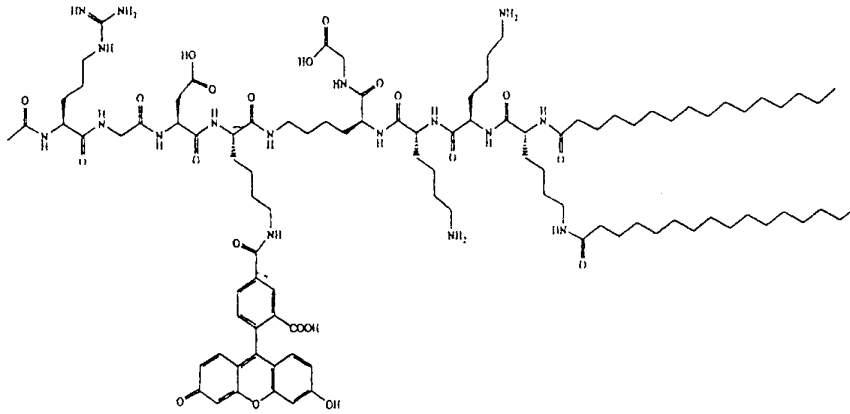
b) 다중-특이 가스-함유 미세분자

실시예 5), 6) 및 7)에 예시된 것과 유사한 방법으로 비오틴화된 미세구를 사용하여 다중-특이 표적 생성물을 제조하였다.

<실시예 13>

헤파린 술페이트 결합 펩티드/비브로넥틴 펩티드/RGD 펩티드 및 플루오레신으로 관능화된 DSPS의 다중-특이 가스-함유 마이크로버블

a) RGD 펩티드 및 플루오레신 리포터 군을 함유하는 리포펩티드의 합성: 디팔미토일-Lys-Lys-Lys-Lys[아세틸-Arg-Gly-Asp-Lys(플루오레신)]Gly.OH



시판용 아미노산 및 중합체를 사용하여 실시예 1)에서 설명한 대로 리포펩티드를 합성하였다. 5 % 페놀, 5 % EDT 및 5 % H₂O를 함유하는 TFA 중에서 수지로부터 리포펩티드를 분해하였다. 진공에서 증발시킨 후, 조 생성물을 침전시키고, 디에틸에테르로 연마하였다. 9 mL/분 유속의 60 내지 100 %의 농도구배(A=0.1 % TFA/물 및 B=0.1 % TFA/아세트니트릴)를 사용하는 정제 HPLC(Vydac 218TP1022 칼럼)으로 40 분에 걸쳐 조절의 생성물 40 mg 분액을 정제하였다. 동결건조 후 순수한 물질 10 mg을 얻었다(분석 HPLC: 구배, 60 내지 100 % B, 여기서, B=0.1 % TFA/아세트니트릴, A= 0.01 % TFA/물, 칼럼- Vydac 218TP1022: 검출-UV 260- 생성물 보유 시간= 20 내지 22 분). MALDI 질량 분광법을 사용하여 추가로, 생성물의 특성화를 수행하였다; M+H 예상치 1922, 실측치 1920

b) 헤파린 술페이트 결합 서열 및 비브로넥틴 펩티드를 함유하는 리포펩티드의 합성

실시예 1 a)에 기재된 합성 및 정제

c) 헤파린 술페이트 결합 펩티드, 비브로넥틴 펩티드, 아세틸-RGD 펩티드 및 플루오레신으로 관능화된 DSPS의 다중-특이 가스-함유 마이크로버블의 제조

DSPS(Avanti, 4 mg) 및 a)로부터의 리포펩티드 DSPS (0.5 mg, 0.2 밀리몰)을 칭량하여 2 개의 바이알 중에 넣고, 1.4 % 프로필렌 글리콜/2.4 % 글리세롤 용액 0.8 ml을 각 바이알에 가하였다. 이 혼합물을 5 분 동안 80 °C로 가온시켰다(가온시키는 동안 교반). 시료를 실온으로 냉각시키고, 상부 공간을 퍼플루오로부탄 가스로 플라싱시켰다. 바이알을 캡 혼합기 중에서 45 초 동안 흔들고, 방새 마이크로버블을 롤링시켰다. 버블을 탈이온수로 여러번 세척하고, 실시예 1b)에 기재된 MALDI-MS를 사용하여 분석하였다. 현미경 분석 후 마이크로버블은 1 내지 5 미크론 범위로 구성된 것으로 보였다. 또한, 마이크로버블은 형광을 띠었다.

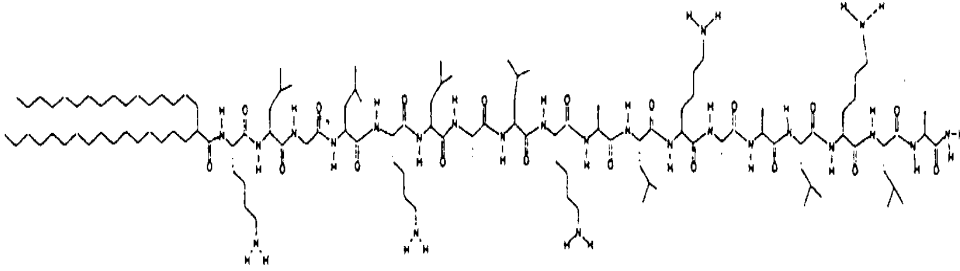
<실시예 14>

내피세포에 대하여 친화성을 갖는 리포펩티드로 '도핑되고', CD71 FITC-표지된 항-트랜스페린 수용체 항체 공유적으로 변형된 DSPS의 다중-특이 가스-함유 마이크로버블

이 실시예는 다중 벡터 표적된 초음파제의 제조에 관한 것이다.

a) 내피 세포 결합 리포펩티드의 합성: 2-n-헥사데실스테아릴-Lys-Leu-Ala-Leu-Lys-Leu-Ala-Leu-Lys-Ala-Leu-Lys-Ala-Ala-Leu-Lys-Leu-Ala-NH₂

하기 나타낸 리포펩티드는 1 밀리몰 아미노산 카트리지를 사용하여 0.1 밀리몰 스케일상에서 링크(Rink) 아마이드 수지로 출발하는 ABI 433A 자동 펩티드 합성기에서 합성하였다.



커플링 전에 HBTU를 사용하여 모든 아미노산 및 2-n-헥사데실스테아릴산을 예비 활성화시켰다. 5 % EDT 및 5 % H₂O를 함유하는 TFA 중에서 2 시간 동안 수지로부터의 펩티드 및 측쇄 보호기의 제거를 동시에 수행하여, 150 mg의 수율로 조질의 생성물을 얻었다. 9 mL/분 유속의 90 내지 100 %의 농도구배(A=0.1 % TFA/물 및 B=MeOH)를 사용하는 정제 HPLC(Vydac 218TP1022 칼럼)으로 50 분에 걸쳐 조질의 물질 40 mg 분액을 정제하였다. 건조 동결 후 순수한 물질 10 mg을 얻었다(분석 HPLC; 구배, 90 내지 100 % B, 여기서, B=MeOH, A= 0.01 % TFA/물, 칼럼- Vydac 218TP1022; 검출- UV 214 nm- 생성물 보유 시간= 23 분). MALDI 질량 분광법을 사용하여 추가로, 생성물의 특성화를 수행하였다; M+H 예상치 2869, 실측치 2373.

b) 내피세포 결합 리포펩티드 및 PE-PEG₂₀₀₀-Mal로 '도핑된' DSPS의 가스-함유 마이크로버블의 제조

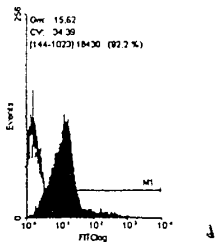
DSPS(Avanti, 4.5 mg) 및 a)로부터의 리포펩티드 DSPS (0.5 mg)을 실시예 2로부터의 PE-PEG₂₀₀₀-말레이미드 (0.5 mg)와 함께 칭량하여 깨끗한 바이알 중에 넣고, 1.4 % 프로필렌 글리콜/2.4 % 글리세롤 용액 1 ml를 각 바이알에 가하였다. 이 혼합물을 5 분 동안 80 °C로 가온시킨 후, 4.5 미크론 필터를 통하여 여과시켰다. 이 혼합물을 실온으로 냉각시키고, 상부 공간을 퍼플루오로부탄 가스로 플라싱시켰다. 바이알을 캡 혼합기 중에서 45 초 동안 흔들고, 마이크로버블을 증류수로 3 회 세척하였다.

c) FITC-표지된 항-트랜스페린 수용체 항체의 티올화

PBS 중의 FITC-표지된 CD71 항-트랜스페린 수용체 Ab (100 mg/mL, Becton Dickinson) 0.7 ml를 실온에서 1 시간 동안 트라우트 시약(0.9 mg, Pierce)로 변형시켰다. 과량의 시약은 NAP-5 칼럼(Pharmacia)상에서 변형된 단백질로부터 분리하였다.

d) 내피세포 결합 리포펩티드 및 PE-PEG₂₀₀₀-Mal로 '도핑된' DSPS의 가스-함유 마이크로버블에의 티올화된 FITC-표지된 항-트랜스페린 수용체 항체의 결합

상기 c)로부터 단백질 분획 0.5 ml 분액(총 2 ml)을 b)로부터의 마이크로버블에 가하고, 롤러 테이블상에서 결합 반응을 10 분 동안 수행하였다. 1000 rpm에서 3 분 동안 원심분리 후, 단백질 용액을 옮겨 단백질 용액 각각 1 ml 및 0.5 ml 분액으로 결합 반응을 2 회 반복하였다. 그 후, 버블을 증류수로 4 회 세척하고, 항체 존재하에 유동 세포측정기 및 현미경으로 시료를 분석하였다. 형광성 집락이 92 %를 넘는 것을 관찰하였다.



(집락의 92 % 형광을 나타내는 CD71 FITC-표지된 안티-트랜스페린 항체(채워진 곡선, 오른쪽)결합된 버블과 DSPS(왼쪽 곡선)의 네가티브 대조 마이크로버블의 유동 세포측정 비교)

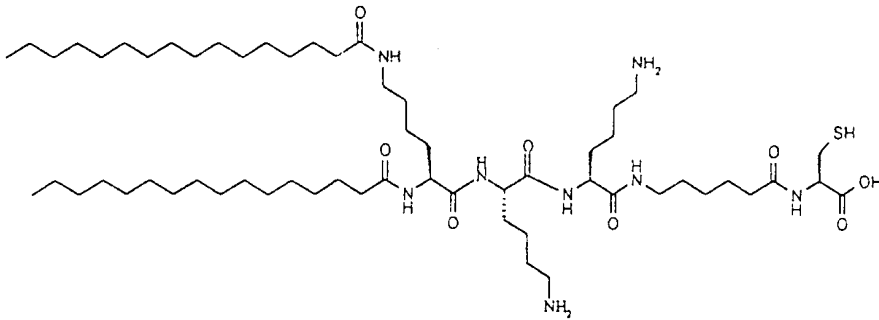
실시예 1 b)에 설명한 바와 같이 MALDI 질량 분광 분석법을 사용하여 리포펩티드의 마이크로버블 중으로의 도입을 확인하였다.

<실시예 15>

표적된 초음파 영상을 위한 다중-특이 트랜스페린/아비딘 코팅된 가스-함유 마이크로버블의 제조

이 실시예는 표적된 초음파/요법을 위한 다중 단백질 벡터를 함유하는 마이크로버블의 제조에 관한 것이다.

a) 티올 관능화된 지방 분자의 합성: 디팔미토일-Lys-Lys-Lys-Aca-Cys.OH.



상기 나타난 지방 구조는 1 밀리몰 아미노산 카트리지를 사용하여 0.25 밀리몰 스케일상에서 Fmoc-Lle-Wang 수지(Novabiochem)로 출발하는 ABI 433A 자동 펩티드 합성기에서 리포펩티드를 합성하였다. 커플링 전에 HBTU를 사용하여 모든 아미노산 및 팔미트산을 예비 활성화시켰다.

5 % EDT 및 5 % H₂O를 함유하는 TFA 중에서 2 시간 동안 수지로부터의 펩티드 및 측쇄 보호기의 제거를 동시에 수행하여, 250 mg의 수율로 조질의 생성물을 얻었다. 9 mL/분 유속의 90 내지 100 %의 농도구배 (A=0.1 % TFA/물 및 B=MeOH)를 사용하는 정제 HPLC(Vydac 218TP1022 칼럼)으로 50 분에 걸쳐 조질의 생성물 40 mg 분액을 정제하였다. 건조 동결 후 순수한 물질 24 mg을 얻었다(분석 HPLC; 구배, 70 내지 100 %B, 여기서, B=0.1 % TFA/아세트니트릴, A= 0.1 % TFA/물, 칼럼- Vydac 218TP1022; 검출- UV 214 nm--생성물 보유 시간= 23 분). MALDI 질량 분광법을 사용하여 추가로, 생성물의 특성화를 수행하였다; M⁺H 예상치 1096, 실측치 1099.

b) 티올 함유 지방 구조물로 '도핑된' DSPS의 가스-함유 마이크로버블의 제조

DSPS(Avanti, 4.5 mg) 및 a)로부터의 리포펩티드 DSPS (0.5 mg)을 칭량하여 깨끗한 바이알 중에 넣고, 1.4 % 프로필렌 글리콜/2.4 % 글리세롤 용액 0.8 ml을 각 바이알에 가하였다. 이 혼합물을 5 분 동안 80 °C로 가온시키고(가온시키는 동안 교반함), 고온인 동안 40 미크론 필터를 통하여 여과시켰다. 이 시료를 실온으로 냉각시키고, 상부 공간을 퍼플루오로부탄 가스로 플라싱시켰다. 바이알을 캡 혼합기 중에서 45 초 동안 흔들고, 마이크로버블을 롤러 테이블상에 방해 두었다. 버블을 탈이온수로 여러번 세척하고, 엘만 시약을 사용하여 티올기 도입에 대하여 분석하였다.

c) 플루오레세인-NHS 및 술포-SMPB와 함께 트랜스페린 및 아비딘의 변형

트랜스페린(Holo, 사람, 알파 테라퓨틱사) 2 mg 및 PBS (1 ml) 중의 아비딘(Sigma) 2 mg을 플루오레세인-NHS 0.5 mg(피어스) 및 술포-SMPB 1 mg(피어스)를 포함하는 DMSO 용액 0.5 ml를 가하였다. 혼합물을 실온에서 45 분 동안 교반한 후, 용출액으로서 PBS를 사용하는 세파덱스 200 칼럼을 통하여 통과시켰다. 단백질 분획을 수집하고, 사용전에 4 °C에서 보관하였다.

d) 변형된 트랜스페린/아비딘와 마이크로버블 결합

b)로부터의 티올 함유 마이크로버블에 변형된 트랜스페린/아비딘 단백질 용액 c) 1 ml을 가하였다. 용액의 pH를 9로 조절한 후, 결합 반응을 실온에서 2 시간 동안 수행하였다. 탈이온수로 잘 세척한 후, 쿨터 계수기(1 내지 7 미크론(81 %)) 및 형광 현미경(높은 형광성 마이크로버블가 관찰됨)로 분석하였다.

<실시에 16>

표적된 초음파 영상을 위하여 관능화된 가스-충전 마이크로버블의 제조

이 실시예는, 원리적으로 다중적인 세포 표적에 결합을 수행하는 이소피드 교환 반응을 이용하여 비특이 표적에 대한 표면상 반응기를 갖는 마이크로버블의 제조에 관한 것이다.

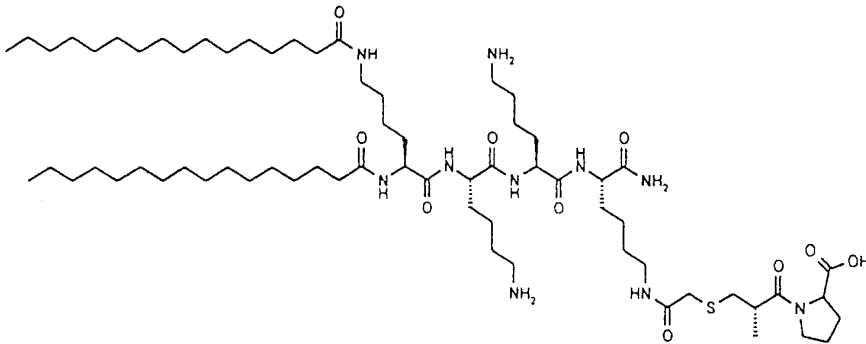
DSPS(Avanti, 5.0 mg) 및 실시예 15 a)로부터의 티올 함유 지방 구조물 (1.0 mg)을 칭량하여 깨끗한 바이알 중에 넣고, 1.4 % 프로필렌 글리콜/2.4 % 글리세롤 용액 0.8 ml을 각 바이알에 가하였다. 이 혼합물을 5 분 동안 80 °C로 가온시키고(가온시키는 동안 교반함), 고온인 동안 40 미크론 필터를 통하여 여과시켰다. 이 시료를 실온으로 냉각시키고, 상부 공간을 퍼플루오로부탄 가스로 플라싱시켰다. 바이알을 캡 혼합기 중에서 45 초 동안 흔들고, 마이크로버블을 롤러 테이블상에 방해 두었다. 버블을 탈이온수로 여러번 세척하고, 엘만 시약을 사용하여 티올기 도입에 대하여 분석하였다.

<실시에 17>

내피 세포 표적을 위한 리포펩티드 및 캅토프릴 함유 분자를 포함하는 DSPS의 다중-특이 가스-함유 마이크로버블

이 실시예는 조합된 표적 및 치료 용도를 위한 초음파제의 제조에 관한 것이다.

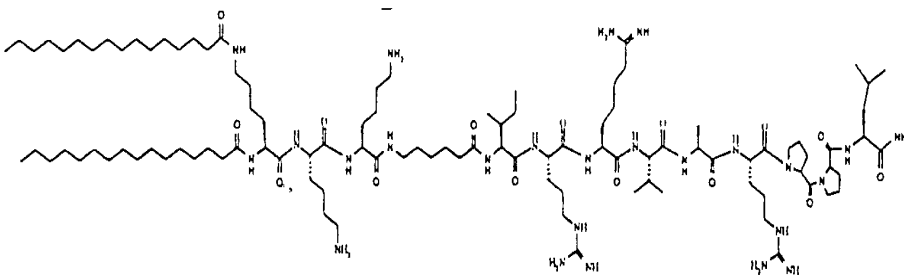
a) 티올 관능화된 지방 분자의 합성: 디팔미토일-Lys-Lys-Lys-Aca-Cys.OH.



상기 구조는 0.125 밀리몰 스케일상에서 보호된 링크 아마이드(Rink Amide) MBHA 수지로 출발하는 매뉴얼 질소 발포기를 사용하여 합성하였다. 모든 아미노산은 노바바이오켄(Novabiochem)사에서 구입하였고 팔미트산은 플루카(Fluka)사에서 구입하였다. 표준 TBTU/HOBt/DIEA를 사용하여 커플링을 수행하였다. 브로모아세트산을 DIC 예비활성화를 사용하여 대칭성 무수물로서 Lys의 축적을 통하여 커플링하였다. DMF에 용해된 캅토프릴(시그마)를 염기로서 DBU를 사용하여 고체상 위에 도입하였다.

5 % EDT, 5 % H₂O 및 5 % 에틸 메틸 솔피드를 함유하는 TFA 중에서 2 시간 동안 수지로부터의 펩티드 및 축적 보호기의 탈보호 제거를 동시에 수행하여, 250 mg의 수율로 조절의 생성물을 얻었다. 10 mL/분 유속의 70 내지 100 %B의 농도구배(A=0.1 % TFA/물 및 B=0.1 % TFA/아세트니트릴)를 사용하는 정제 HPLC(Vydac 218TP1022 칼럼)으로 60 분에 걸쳐 조절의 생성물 10 mg 분액을 정제하였다. 건조 동결 후 순수한 물질 2 mg을 얻었다(분석 HPLC; 구배, 70 내지 100 %B, 여기서, B=0.1 % TFA/아세트니트릴, A=0.1 % TFA/물, 칼럼- Vydac 218TP1022: 검출- UV 214 nm-보유 시간= 26 분). MALDI 질량 분광법을 사용하여 추가로, 생성물의 특성화를 수행하였다; MH⁺ 예상치 1265.

b) 내피 세포에 대하여 친화성을 갖는 리포펩티드의 합성: 디팔미토일-Lys-Lys-Lys-Aca-Ile-Arg-Arg-Val-Ala-Arg-Pro-Pro-Leu-NH₂



리포펩티드는 1 밀리몰 아미노산 카트리지를 사용하여 0.1 밀리몰 스케일상에서 링크 아마이드 수지(노바바이오켄)로 출발하는 ABI 433A 자동 펩티드 합성기에서 합성하였다. 커플링 전에 HBTU를 사용하여 모든 아미노산 및 팔미트산을 예비 활성화시켰다. 5 % 페놀, 5 % EDT 및 5 % H₂O를 함유하는 TFA 중에서 2 시간 동안 수지로부터의 펩티드 및 축적 보호기의 제거를 동시에 수행하여, 160 mg의 수율로 조절의 생성물을 얻었다. 9 mL/분 유속의 70 내지 100 %의 농도구배(A=0.1 % TFA/물 및 B=MeOH)를 사용하는 정제 HPLC(Vydac 218TP1022 칼럼)으로 40 분에 걸쳐 조절의 생성물 35 mg 분액을 정제하였다. 건조 동결 후 순수한 물질 20 mg을 얻었다(분석 HPLC; 구배, 20 내지 50 % B, 여기서, B=MeOH, A= 0.01 % TFA/물, 칼럼- Vydac 218TP1022: 검출- UV 214 및 260 nm- 생성물 보유 시간= 16 분). MALDI 질량 분광법을 사용하여 추가로, 생성물의 특성화를 수행하였다; MH⁺ 예상치 2050, 실측치 2055

c) 약물 전달을 위한 캅토프릴 함유 분자 및 내피 세포의 겨냥을 위한 리포펩티드를 함유하는 DSPS의 가스-함유 마이크로버블의 제조

DSPS(Avanti, 4.5 mg), a)로부터의 생성물 (0.5 mg) 및 b)로부터의 생성물 (0.5 mg)을 칭량하여 바이알 중에 넣고, 1.4 % 프로필렌 글리콜/2.4 % 글리세롤 용액 1.0 ml을 각 바이알에 가하였다. 이 혼합물을 5 분 동안 80 °C로 가온시켰다(가온시키는 동안 교반함). 이 시료를 실온으로 냉각시키고, 상부 공간을 퍼플루오로부탄 가스로 플라싱시켰다. 바이알을 캡 혼합기 중에서 45 초 동안 흔들고, 1 시간 동안 롤링시키고, 탈이온수로 잘 세척하였다. MALDI 질량 분석법에 의해 입증된 바와 같이 최종 세척액 중에서 출발 물질은 조금도 관찰되지 않았다. 실시예 1 b)에 설명한 바와 같이 MALDI 질량 분석법을 사용하여 섹션 a) 및 b)로부터의 생성물의 마이크로버블 중으로의 도입을 확인하였다.

d) 치료 용도를 위한 캅토프릴 함유 분자 및 내피 세포의 겨냥을 위한 리포펩티드를 함유하는 DSPS의 가스-함유 마이크로버블의 시험관내 연구

실시예 1 c)에서 서술한 시험관내 분석을 사용하여 유동 조건하에서 세포 결합을 조사하였다. 세포상 마이크로버블의 점차적인 축적은 유속에 의존하여 일어났다. 유속을 증가시키기에 따라 세포는 커버슬립으로

부터 이탈되기 시작하였고, 마이크로버블은 여전히 세포에 결합되어 있었다. 백터를 갖지 않은 대조 버블은 내피 세포에 부착하지 않았고, 최소 유동 조건하에서 세포로부터 사라졌다.

<실시예 18>

펩티드 항생제 폴리믹신 B 술페이트 및 세포막에 대한 친화성을 갖는 나선형 펩티드를 포함하는 리포펩티드로 로딩된 DSPS의 다중-특이 가스-함유 마이크로버블의 제조

조합된 표적 및 치료 용도를 갖는 다중 펩티드성 백터를 포함하는 표적된 마이크로버블의 제조에 관한 것이다.

a) 세포에 대한 친화성을 갖는 나선형 펩티드를 포함하는 리포펩티드의 합성: 헥사데실스테아릴-Lys-Leu-Ala-Leu-Lys-Leu-Ala-Leu-Lys-Ala-Leu-Lys-Ala-Ala-Leu-Lys-Leu-Ala-NH₂

실시예 14 a)에서 서술하였다.

b) 다중-특이 가스-함유 마이크로버블의 제조

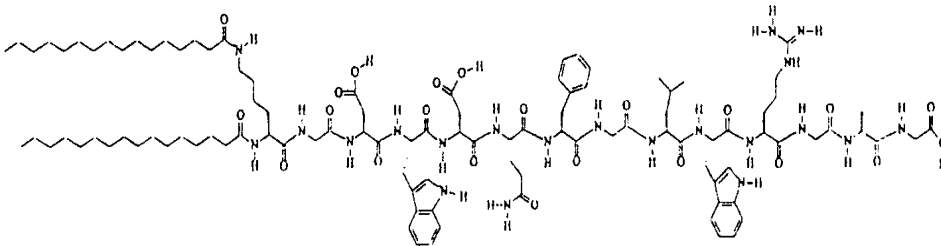
DSPS(Avanti, 5.0 mg), a)로부터의 리포펩티드 (0.3 mg) 및 폴리믹신 B 술페이트 b)로부터의 생성물 (0.5 mg)을 칭량하여 깨끗한 바이알 중에 넣고, 1.4 % 프로필렌 글리콜/2.4 % 글리세롤 용액 1.0 ml을 바이알에 가하였다. 이 혼합물을 3 내지 5 분 동안 음파 파쇄시키고, 5 분 동안 80 °C로 가온시킨 후, 4.5 미크론 필터로 여과하였다. 이 시료를 실온으로 냉각시키고, 상부 공간을 퍼플루오로부탄 가스로 플라싱시켰다. 바이알을 캡 혼합기 중에서 45 초 동안 흔들고, 3 분 동안 1000 rpm에서 마이크로버블을 원심분리시켰다. MALDI-MS에 의해서 침전물내 폴리믹신 B 술페이트 또는 리포펩티드를 검출되지 않을 때까지 마이크로버블을 물에서 세척하였다. 현미경 관찰 결과, 버블 집락의 크기 분포는 목적하는 바와 같이 1 내지 8 미크론임을 보였다. 세척된 버블(약 0.2 ml)에 메탄올(0.5 ml)을 가하고, 이 혼합물을 2 분 동안 음파옥에 놓았다. MALDI-MS에 의한 분석 후 생성되는 맑은 용액이 리포펩티드 및 폴리믹신 B 술페이트를 함유하고 있음을 알았다(예상치 1203, 실측치 1207).

<실시예 19>

약물 메토티렉세이트를 함유하는 분지된 구조로 변형되고, IL-1 수용체 결합 서열 함유 리포펩티드로 '도핑된' DSPS의 다중-특이 가스-함유 마이크로버블의 제조

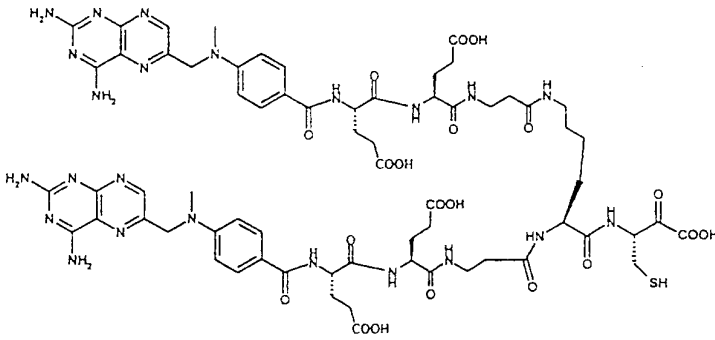
이 실시예는 표적/치료/약물 방출 용도를 위한 적다중 백터를 포함하는 표적된 마이크로버블의 제조에 관한 것이다.

a) 인터류킨-1 수용체 결합 펩티드를 포함하는 리포펩티드의 합성: 디팔미토일-Lys-Gly-Asp-Trp-Asp-Gln-Phe-Gly-Leu-Trp-Arg-Gly-Ala-Ala.OH



1 밀리몰 아미노산 카트리지를 사용하여 0.1 밀리몰 스케일상에서 Fmoc-Ala-Wang 수지(Novabiochem)로 출발하는 ABI 433A 자동 펩티드 합성기에서 리포펩티드를 합성하였다. 커플링전에 HBTU를 사용하여 모든 아미노산 및 팔미트산을 예비 활성화시켰다. 5 % 페놀, 5 % EDT, 5 % 아니솔 및 5 % H₂O를 함유하는 TFA 중에서 2 시간 동안 수지로부터 리포펩티드 및 측쇄 보호기의 제거를 동시에 수행하여, 150 mg의 수율로 조질의 생성물을 얻었다. 9 mL/분 유속의 90 내지 100 %의 농도구배(A=0.1 % TFA/물 및 B=MeOH)를 사용하는 정제 HPLC(Vydac 218TP1022 칼럼)으로 40 분에 걸쳐 조질의 생성물 30 mg 분액을 정제하였다. 건조동결 후 순수한 물질 4 mg을 얻었다(분석 HPLC: 구배, 90 내지 100 %B, 여기서, B=MeOH, A= 0.01 % TFA/물, 칼럼- Vydac 218TP1022: 검출- UV 214 nm-생성물 보유 시간= 23 분). MALDI 질량 분광법을 사용하여 추가로, 생성물의 특성화를 수행하였다; M+H 예상치 2083, 실측치 2088.

b) 티올 잔기를 포함하는 분지된 메토티렉세이트 코어구조의 합성:



0.1 밀리몰 스케일상에서 Fmoc-Cys(Trt) 텐타겔(Tentagel) 수지로 출발하는 ABI 433A 자동 펩티드 합성기에서 메토티렉세이트를 합성하였다. 5% EDT 및 5% H₂O를 함유하는 TFA 중에서 2 시간 동안 수지로부터 생성물 및 촉매 보호기의 탈보호 제거를 동시에 수행하여, 160 mg의 수율로 조절의 생성물을 얻었다. 9 mL/분 유속의 10 내지 30 %B의 농도구배(A=0.1% TFA/물 및 B=0.1% TFA/아세트니트릴)를 사용하는 정제 HPLC(Vydac 218TP1022 칼럼)으로 40 분에 걸쳐 조절의 생성물 30 mg 분액을 정제하였다. 건조 동결 후 순수한 물질 9 mg을 얻었다(분석 HPLC: 구배, 5 내지 50 %B, 여기서, B=0.1% TFA/아세트니트릴, A= 0.01% TFA/물, 칼럼- Vydac 218TP1022: 검출- UV 214 nm-생성물 보유 시간= 9.5 분). MALDI 질량 분광법을 사용하여 추가로, 생성물의 특성화를 수행하였다; M+H 예상치 1523, 실측치 1523.

c) 다중-특이 가스-함유 마이크로버블의 제조

DSPS(Avanti, 4.5 mg), 실시예 15 a)로부터의 티올 함유 리포펩티드 (0.5 mg) 및 a)로부터의 리포펩티드 (0.2 mg)을 칭량하여 깨끗한 바이알 중에 넣고, 1.4% 프로필렌 글리콜/2.4% 글리세롤 용액 1.0 ml을 바이알에 가하였다. 이 혼합물을 3 내지 5 분 동안 음파 파쇄시키고, 5 분 동안 80 °C로 가온시킨 후, 4.5 미크론 필터로 여과하였다. 이 시료를 실온으로 냉각시키고, 상부 공간을 퍼플루오로부탄 가스로 플라싱시켰다. 바이알을 캡 혼합기 중에서 45 초 동안 흔들고, 3 분 동안 1000 rpm에서 마이크로버블을 원심분리시키고, 침전물을 버렸다.

d) 티올화된 마이크로버블에의 메토티렉세이트 분지된 구조물의 결합

상기 b)로부터의 메토티렉세이트 구조물 제조물(0.5 mg)을 PBS pH 8.0 중에 용해시켰다. 이 용액을 c)로부터의 티올 함유 버블에 가하고, 디설피드 결합 생성을 16 시간 동안 수행하였다. PBS 및 물로 잘 세척한 후, 버블을 현미경법 및 MALDI 질량 분광법을 사용하여 분석하였다.

이는 또한, 메토티렉세이트 구조를 마이크로버블에 연결하는 디설피드 결합은 생체내에서 유리 약물 분자가 자유롭게 움직이는 것을 감소시킬 수 있는 것으로 생각된다. 이는 종양 특이 벡터와 함께 약물 전달 계이다. 글루타티온과 같은 생리학적으로 중요한 환원제를 사용하여 약물 방출을 수행할 수 있다.

<실시예 20>

플라스미드 pBR322로부터 플루오레세인 표지된 DNA 단편과 복합적인 폴리-L-리신으로 코팅된 마이크로버블의 제조

이 실시예는 유전자 요법/안티-센스 용도를 위한 마이크로버블의 제조에 관한 것이다. 예를 들어, 실시예 1에서 기재된 바와 같은 벡터 변형된 지질 구조물로 마이크로버블막을 추가로 도핑함으로써 특정 표적을 얻을 수 있다.

a) DSPS 가스-함유 마이크로버블의 제조

DSPS(Avanti, 4.5 mg)를 칭량하여 깨끗한 바이알 중에 넣었다. 1.4% 프로필렌 글리콜/2.4% 글리세롤 용액 1.0 ml을 바이알에 가하고, 이 혼합물을 5 분 동안 80 °C로 가온시켰다. 곧, 이 용액을 가온시킨 후, 4 미크론 필터로 여과하였다. 이 시료를 실온으로 냉각시키고, 상부 공간을 퍼플루오로부탄 가스로 플라싱시켰다. 바이알을 캡 혼합기 중에서 45 초 동안 흔들었다. 그 후, 버블을 탈이온수로 세척하고 침전물을 버렸다. 그 후, 마이크로버블을 물 0.5 ml 중에 재용해시켰다.

b) 폴리-L-리신/DNA 복합체의 제조 및 DSPS 마이크로버블의 로딩

깨끗한 바이알 중의 폴리-L-리신(70 내지 150 kD) 1 mg에 TE 완충액(10 mM 트리스-HCl, pH 8) 중에 용해된 플라스미드 pBR322(Biorad)플루오레세인 표지된 다이제스트 0.1 ml을 가하였다. 물을 가하고 pH를 8로 조절함으로써 이 용액을 총 0.6 ml로 제조하였다. 1 시간 동안 복합 반응을 수행하고, 폴리리신-DNA 용액 0.5 ml을 상기 a)로부터의 마이크로버블 현탁액에 가하였다. 1 시간 후, 현미경을 사용하여 버블이 형광을 띄고 있는 것을 보고, DNA의 존재를 확인하였다.

<실시예 21>

다브실화된(Dabsylated) 아테움 혈소판 결합 서열 및 RGDS로 이루어지는 분지된 코어 펩티드를 포함하는 다중-특이 가스-충전된 마이크로버블의 제조

이 실시예는 표적/약물 전달 및 약물 방출용 티올 함유 벡터로 변형시키기 위하여 표면에 티올기를 갖는 마이크로버블의 제조에 관한 것이다.

a) 분지된 펩티드 다브실-Tyr-Arg-Ala-Leu-Val-Asp-Thr-Ieu-Lys-Lys-(NH₂-Arg-Gly-Asp-Ser)-Gly-Cys-OH의

합체를 포함하는 가스-함유 분자

60 °C에서 유지된 (-)-캄펜 중의 비오틴-아미도카프로에이트-Ala 중합체 5 % w/w 용액 10 ml을 PEG 10000 메틸 에테르 16-헥사데카노일옥시헥사데카노에이트(WO-A-9607434에 기재된 대로 제조됨) 1 % w/w 수용액 30 ml에 가하였다. 로터 스테이터 믹서(rotor stator mixer)(Ultra Turax(등록상표) T25)를 몇 분 동안 느린 속도로 사용하여 혼합물을 유화시킨 후, 건조 빙/메탄올 육조 중에서 냉동시키고, 48 시간 동안 동결 건조시켜 백색 분말로서 표제 생성물을 얻었다.

e) 생성물의 음향 특성화 및 현미경법

WO-A-9607434에 기재된 것과 같은 광현미경을 사용하여 생성물의 미세입자 특성의 확인을 수행하였다. 3.5 MHz 넓은밴드 트랜스듀서를 사용하는 초음파 전달 측정 결과, 2 mg/mL 미만의 입자 현탁액은 5 dB/cm 이상의 음파 빔 감쇠를 나타내었다.

f) 다중-특이 미세입자

그 후, 실시예 5), 6) 및 7)에서 예시된 것과 유사한 비오틴닐화된 미세구를 사용하여 다중-특이 표적 생성물을 제조하였다.

<실시예 23>

올리고뉴클레오티드 비오틴-GAAAGGTAGTGGGGTCGTGTGCCGG 및 비오틴닐화된 피브린-안티-폴리머렌트 펩티드(비오틴-GPRPPERHQS.NH₂) 및 스트렙타비딘으로 관능화되고, 비오틴-PEG₃₄₀₀-아실-포스파티딜에탄올아민 및 DSPS로 캡슐화된 다중-특이 가스-함유 마이크로버블의 제조

a) 비오틴-PEG₃₄₀₀-아실-포스파티딜에탄올아민의 합성

클로로포름/메탄올(3:1) 용액 중의 디팔미토일 포스파티딜 에탄올아민(21.00 mg, 0.03 밀리몰), 비오틴-PEG-CO₂-NHS (100 mg, 0.03 밀리몰) 및 트리에틸아민(42 μ l, 0.30 밀리몰)의 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 교반하였다. 감압하에서 용매의 증발 후, 잔사를 플래시 크로마토그래피(메탈렌 클로라이드/메탄올/물, 40:8:1)하였다. 황색 검으로서 생성물 112 mg(94 %)을 얻었고, NMR 및 MALDI-MS에 의해서 구조를 입증하였다.

b) 가스 충전된 마이크로버블에의 플루오레세인-결합된 스트렙타비딘의 결합

실시예 5 a)에 기재된 바와 같이, DSPS 및 비오틴-PEG₃₄₀₀-아실-포스파티딜 에탄올아민을 혼합함으로써 가스-함유 마이크로버블을 제조하였다.

마이크로버블 현탁액을 0.2 ml 분액으로 분할하고, 플루오레세인 결합된 스트렙타비딘을 하기 표에 나타난 바와 같이 가하였다. PBS로 세척함으로써 과량의 단백질을 제거하기 전에 시료를 롤러 테이블상에서 15 내지 30 분 동안 실온에서 인큐베이팅하였다.

<결과>

분액 번호	가해진 스트렙타비딘(μ g/200:1 시료)	인큐베이션 시간(상온)	% 플루오레세인 입자	입자 평균 직경(미크론)
1	0		2.0	-
2	0		-	12(발포체)
3	0.2 (3×10^{-9} cm)	30 분	7.8	3.9
4	2 (3×10^{-8} cm)	30 분	26.2	4.2
5	10 (3×10^{-7} cm)	15 분	30.5	na
6	20 (3×10^{-7} cm)	30 분	97.9	5.2
7	40 (3×10^{-7} cm)	15 분	96.7	5.1
8 DSPS 대조	20 (3×10^{-7} cm)	15 분	0.6	3.7

시료를 유동 세포측정기 및 현미경으로 분석하였다. 그 결과를 상기 표에 요약하였다.

c) 올리고뉴클레오티드 비오틴-GAAAGGTAGTGGGGTCGTGTGCCGG 및 비오틴닐화된 피브린-안티-폴리머렌트 펩티드 비오틴-GPRPPERHQS와 스트렙타비딘 코팅된 마이크로버블의 결합

상기 분액 번호 6의 입자를 원심분리하고 상등액을 비오틴-GAAAGGTAGTGGGGTCGTGTGCCGG 0.2 mg 및 비오틴-GPRPPERHQS 0.2 mg를 함유하는 pH 7.5의 PBS 완충액 1 ml로 대체하였다(실시예 5 c). 24 시간 동안 인큐

베이션 후, 입자를 PBS 및 물로 잘 세척하였다.

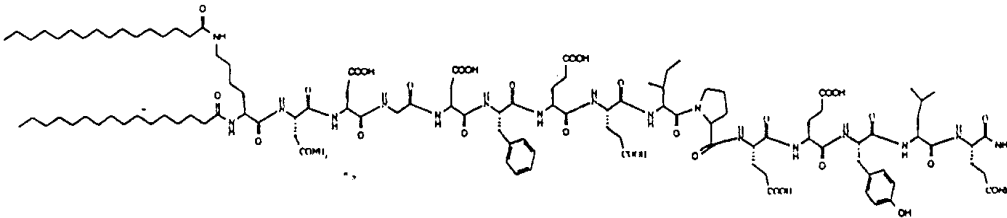
이러한 방법을 사용하여 다른 비오틴화된 벡터 또는 치료제는 스트렙타비딘 또는 아비딘 코팅된 마이크로버블에 결합될 수 있다.

<실시예 24>

혈전 용해 효소 조직 플라스미노겐 활성화자 및 혈전-표적 리포펩티드로 관능화되고, DSPS로 캡슐화된 마이크로버블의 제조

이 실시예는 치료학적 혈전 용해제를 함유하는 혈전 표적 US제의 제조에 관한 것이다.

a) 혈전(디팔미토일-Lys-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln.NH₂)에 대하여 친화성을 갖는 리포펩티드의 합성



이 리포펩티드는 1 밀리몰 아미노산 카트리지를 사용하여 0.1 밀리몰 스케일상에서 링크(Rink) 아미드 지지(노바바이오펜)로 출발하는 ABI 433A 자동 펩티드 합성기에서 합성하였다. 커플링 전에 HBTU를 사용하여 모든 아미노산을 예비 활성화시켰다. 5 % 페놀, 5 % EDT, 5 % 아니솔 및 5 % H₂O를 함유하는 TFA 중에서 2 시간 동안 수지로부터의 펩티드 및 측쇄 보호기의 동시 제거를 수행하여, 80 mg의 수율로 조질의 생성물을 얻었다. 정제 HPLC(Vydac 218TP1022 칼럼)으로 조질의 생성물 20 mg 분액을 정제하였다. 건조 동결 후 순수한 물질 6 mg을 얻었다. MALDI 질량 분광법 및 분석 HPLC를 사용하여 생성물을 특성화시켰다.

b) 술폰-SMPB로 조직 플라스미노겐 활성화자의 변형

t-PA(시그마) 0.1 mg을 함유하는 탄산암모늄 완충액 0.1 ml 용액을 물을 가하여 0.2 mL이 되도록 제조하였다. 이 용액에 0.05 ml DMSO에 용해된 술폰-SMPB (피어스) 0.4 mg을 가하였다. 단백질 용액을 실온에서 45 분간 정치한 후 수퍼덱스 200 칼럼상에서 정제하였다. 생성물을 PBS로 용출시켜 변형된 단백질 분획을 수집하였다.

c) 티올 함유 리포펩티드 및 DSPS/혈전 결합 리포펩티드로 캡슐화된 마이크로버블의 제조 및 변형된 조직 플라스미노겐 활성화자에의 결합

DSPS(Avanti, 5.0 mg)를 칭량하여 a)로부터의 리포펩티드 (0.5 mg) 및 실시예 15 a)로부터의 티올 함유 리포펩티드 (0.5 mg)를 깨끗한 바이알 중에 넣고, 1.4 % 프로필렌 글리콜/2.4 % 글리세롤 용액 1.0 ml을 가하고 이 혼합물을 2 분 동안 음파 파쇄시킨 후, 5 분 동안 80 °C로 가온시켰다. 용액을 가온시키고 나서, 곧 4 마이크론 필터를 통하여 여과시켰다. 이 시료를 실온으로 냉각시키고, 상부 공간을 퍼플루오로탄 가스로 플라싱시켰다. 바이알을 캡 혼합기 중에서 45 초 동안 흔들고, 마이크로버블을 탈이온수로 2 회 세척하였다. 침전물을 버리고, 상기 b)로부터의 단백질 용액 1 ml 분액으로 대체하였다. 1 시간 동안 결합 반응을 수행하였다. 버블을 원심분리한 후, 침전물을 또다른 단백질 용액 1 mL와 교환하였다. 모든 단백질 용액이 다 소모될 때까지 인큐베이션 단계를 반복하였다. 그 후, 마이크로버블을 물로 잘 세척하고, 쿨터 계수기로 분석하였다. 마이크로버블을 실시예 1 c)에서 기재된 유동 챔버 분석으로 시험하였다. 리포펩티드/DSPS 또는 DSPS 자체 중 하나를 포함하는 것보다 더 많은 수로 결합하는 단백질로 변형된 마이크로버블이 발견되었다.

이러한 마이크로버블의 표적/치료/초음파 활성을 시험관내 및 생체내 혈전생성 모델에서 평가할 수 있다.

<실시예 25>

치료학적 용도를 위한 아테놀롤을 함유한 리포펩티드 및 표적을 위한 헤파린 술포이트 결합 펩티드(KRKR) 및 비브로빅틴 펩티드(WOPPRARI)를 함유하는 리포펩티드 및 DSPS로 캡슐화된 다중-특이 PFB 가스 충전된 마이크로버블

a) 헤파린 술포이트 결합 펩티드(KRKR) 및 비브로빅틴 펩티드(WOPPRARI)로 이루어진 리포펩티드의 합성

실시예 1 a)에 기재된 합성 및 정제

b) 고체상 커플링에 적합한 보호된 아테놀롤 유도체의 합성

i) 메틸 4-[(2,3-에폭시)프로폭시]페닐아세테이트의 합성

메틸 4-[(2,3-에폭시)프로폭시]페닐아세테이트(4.98 g, 0.0 몰), 에피클로로히드린(23.5 ml, 0.30 밀리몰) 및 피리딘(121 μl, 1.5 밀리몰)의 혼합물을 85 °C에서 2 시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 냉각시키고, 과량의 에피클로로히드린을 증류 제거하였다(로터베이퍼). 잔사를 메틸 아세테이트에 용해시키고, 염수로 세척하고, 건조시켰다(Na₂SO₄). 용액을 여과시키고 농축시켰다. 어두운 잔사를 크로마토그래피하여(실리카, 헥산/에틸 아세테이트 7:3)하여 무색 오일을 2.25 g(34 %)를 얻었다. 구조를 ¹H(300

MHz) 및 ^{13}C NMR(75 MHz) 스펙트럼으로 관찰하였다.

ii) 메틸 4-[2-히드록시-3-[(1-메틸에틸)아미노-프로폭시]페닐아세테이트의 합성

메틸 4-[(2,3-에폭시)프로폭시]페닐아세테이트(2.00 g, 9.00 몰), 이소프로필아민(23 ml, 0.27 밀리몰) 및 물(1.35 ml, 74.7 밀리몰)을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 농축시키고(로터베이퍼) 오일 잔사를 클로로포름 중에 용해시키고 건조시켰다(Na_2SO_4). 여과 및 농축시켜 황색 오일을 정량적인 수율로 얻었고, 이를 다음 단계에서 추가 정제없이 사용하였다. 구조를 ^1H 및 ^{13}C NMR 분석으로 입증하였다.

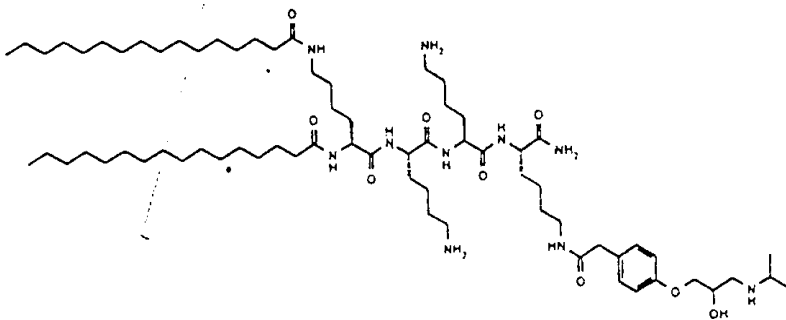
iii) 4-[2-히드록시-3-[(1-메틸에틸)아미놀-프로폭시]페닐아세트산 히드로클로라이드의 합성

6 M 염화수소(15 ml) 중의 메틸 4-[(2-히드록시-3-[(1-메틸에틸)아미노-프로폭시]페닐아세테이트(563 mg, 2.00 몰)를 100 °C에서 4 시간 동안 가열하였다. 반응 혼합물을 농축시키고(로터베이퍼) 잔사를 물에 용해시키고 동결 건조시켰다. 구조를 ^1H 및 ^{13}C NMR 분석으로 입증하였다. MALDI 질량 분광법으로 M+H 예상치 268이었다.

iv) N-Boc-4-[2-히드록시-3-[(1-메틸에틸)아미놀-프로폭시]페닐아세트산의 합성

물(2.0 ml) 중의 4-[2-히드록시-3-[(1-메틸에틸)아미놀-프로폭시]페닐아세트산 히드로클로라이드 용액(2.0 밀리몰)을 물/디옥산(2:1, 15 ml) 중의 중탄산나트륨(0.60 g, 7.2 밀리몰) 용액에 가하였다. 디옥산(5 ml) 중의 디-tert-부틸 디카르보네이트 용액(0.48 g, 2.2 밀리몰) 용액을 가하였다. 반응의 진행을 TLC 분석(실리카, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 85:10:5)으로 모니터링하였고, 전환이 종결될 때까지 얼마간의 디-tert-부틸 디카르보네이트를 가하였다. 반응 혼합물을 포타슘 히드로겐술페이트로 포화된 물에 붓고, 유기 물질을 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기상을 물 및 염수로 세척하고 건조하고(Na_2SO_4) 여과하여 조질의 물질 0.6 g을 얻었다. 생성물을 크로마토그래피(실리카, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 85:10:5)로 정제하였다. 용액을 농축시키고 잔사를 빙초산 중에 용해시키고 동결 건조시켰다. 백색 고체로 수율은 415 mg(56 %)였다. 구조를 ^1H 및 ^{13}C NMR 분석으로 확인하였다.

c) 아테놀올로 관능화된 리포펩티드의 합성



상기 나타낸 구조물은 노바바이오켄사로부터 입수한 아미노산, 플루카(Fluka)사에서 입수한 팔미트산 및 a)로부터의 화합물을 사용하여 0.125 밀리몰 스케일상에서 링크 아미드 MBHA 수지(노바바이오켄)로 출발하는 매뉴얼 질소 발포기를 사용하여 합성하였다. 표준 TBTU/HOBt/DIEA 프로토콜을 사용하여 커플링을 수행하였다.

5 % EDT 및 5 % H_2O 를 함유하는 TFA 중에서 2 시간 동안 수지로부터의 펩티드 및 측쇄 보호기의 탈보호 제거를 동시에 수행하였다. 조질의 물질을 에테르로부터 침전시키고, 10 mL/분 유속의 70 내지 100 %B의 농도구배(A=0.1 % TFA/물 및 B=0.1 % TFA/아세트니트릴)를 사용하는 정제 역상 크로마토그래피(Vydac 218TP1022 칼럼)으로 60 분에 걸쳐 조질의 물질을 정제하였다. 건조 동결 후 순수한 물질 38 mg을 얻었다(분석 HPLC; 구배, 70 내지 100 %B, 20 분, 여기서, B=0.1 % TFA/아세트니트릴, A= 0.1 % TFA/물, 유속 1 mL/분, 칼럼; Vydac 218TP54; 검출 UV 214 nm; 보유 시간 25 분). MALDI 질량 분광법(ACH 매트릭스)을 사용하여 추가로, 생성물의 특성화를 수행하였다; M+H 1258, 예상치 1257.

d) 헤파린 술페이트 결합 펩티드(KRKR), 비브로릭틴 펩티드(WOPPRAR1)로 이루어진 리포펩티드 및 아테놀올을 함유하는 리포펩티드를 포함하는 DSPS의 가스-충전된 마이크로버블의 제조

DSPS(Avanti, 5.0 mg), a)로부터의 생성물 (0.5 mg) 및 c)로부터의 생성물 (0.5 mg)을 칭량하여 바이알 중에 넣고, 1.4 % 프로필렌 글리콜/2.4 % 글리세롤 용액 1.0 ml을 바이알에 가하였다. 이 혼합물을 5 분 동안 음파 파쇄하고, 80 °C에서 5 분 동안 가열시켰다(가온시키는 동안 교반함). 이 용액을 여과시키고 냉각시켰다. 상부 공간을 퍼플루오로부탄 가스로 플라싱시켰다. 바이알을 캡 혼합기 중에서 45 초 동안 흔들고, 탈이온수로 잘 세척하였다.

실시에 1 b)에 설명한 바와 같이 MALDI 질량 분광 분석법을 사용하여 버블 중에서 아테놀올 함유 리포펩티드의 도입을 확인하였다.

e) 다중-특이 가스-충전된 마이크로버블의 시험관내 연구

실시에 1 c)에 설명한 바와 같이 마이크로버블 현탁액의 시험관내 연구를 수행하였다. 세포상의 마이크로버블의 점차적인 축적이 일어났고, 이는 유속에 따라 의존적이었다. 유속이 증가하면 세포는 커버슬립으로부터 탈리되기 시작하고 마이크로버블은 여전히 세포에 결합되어 있었다. 백터를 갖지 않은 대조 버

블은 내피 세포에 부착하지 않았고, 최소 유동 조건하에서 세포로부터 사라졌다.

<실시에 26>

진단 및 치료 용도를 위한 클로람부실의 콜레스테릴 에스테르를 포함하는 DSPS의 PFB 가스 충전된 마이크로버블

이 실시예는 내피 세포상의 세포 수용체의 다중성의 비-특이적 변형에 관한 것이다.

a) 콜레스테릴 4-[4-비스(2-클로로에틸)아미노]-페닐]부타노에이트의 합성

DIC(170 μ l, 1.10 밀리몰)을 건조 디클로로메탄(15 ml) 중의 클로람부실(시그마, 669 mg, 2.20 밀리몰) 용액에 가하였다. 이 혼합물을 0.5 시간 동안 실온에서 교반하고, 디클로로메탄(10 ml) 중의 콜레스테릴(알드리치, 387 mg, 1.00 밀리몰) 및 DMAP(122 mg, 1.00 밀리몰)용액에 가하였다. 반응 혼합물을 밤새 교반하거나, 5 % 중탄산나트륨에 부었다. 이 상을 분리하고, 유기상을 염수로 세척하고, 건조시켰다(MgSO₄). 용액을 여과 및 농축시키고, 생성물을 칼럼 크로마토그래피(실리카, 클로로로름)로 정제하여 무색 오일 560 mg을 83 % 수율로 얻었다. 생성물을 MALDI 질량 분광법(ACH 매트릭스)을 사용하여 특성화하여 예상한 대로 674에서 M⁺를 얻었다. 추가로, ¹H(500 MHz) 및 ¹³C NMR(125 MHz) 스펙트럼을 사용하여 특성화하고, 구조를 관찰하였다.

b) 진단 및 치료 용도를 위한 클로람부실의 콜레스테릴 에스테르를 포함하는 DSPS의 가스-함유 마이크로버블의 제조

DSPS(Avanti, 4.5 mg) 및 a)로부터의 생성물(0.5 mg)의 혼합물을 바이알 중에 넣고, 1.4 % 프로필렌 글리콜/2.4 % 글리세롤 용액 1.0 ml을 이 바이알에 가하였다. 이 혼합물을 5 분 동안 음파 파쇄하고, 80 °C에서 5 분 동안 가열시키고(가온시키는 동안 교반함) 냉각시켰다. 상부 공간을 퍼플루오로부탄 가스로 플라싱시켰다. 바이알을 캡 혼합기 중에서 45 초 동안 흔들고, 탈이온수로 잘 세척하였다. MALDI 질량 분광 분석법에 의해 입증된 바와 같이 최종 세척액 중에서 출발 물질이 조금도 관찰되지 않았다. 하기와 같은 MALDI 질량 분광 분석법에 의해서 클로람부실의 콜레스테릴 에스테르의 마이크로버블 중으로의 도입을 확인하였다: 약 50 μ l의 마이크로버블을 약 100 μ l의 90 % 메탄올을 포함하는 깨끗한 바이알에 옮겼다. 혼합물을 30 초 동안 음파 파쇄하고, MALDI 질량 분광 분석법에 의해서 분석한 결과 a)로부터의 구조물과 일치하는 668에서 M⁺를 얻었다.

종양 특이 벡터와 함께 이러한 마이크로버블은 표적된 약물 전달제로서 유용한 것으로 생각된다.

<실시에 27>

진단 및 치료 용도를 위한 클로람부실의 콜레스테릴 유도체 및 아테놀올을 함유하는 리포펩티드를 포함하는 DSPS의 다중-특이 가스 충전된 마이크로버블

a) 고체상 커플링에 적합한 보호된 아테놀올 유도체의 합성

실시에 25 섹션 b)에 설명한 바와 같다.

b) 아테놀올로 관능화된 리포펩티드의 합성

실시에 25 섹션 c)에 설명한 바와 같다.

c) 콜레스테릴 4-[4-비스(2-클로로에틸)아미노]-페닐]부타노에이트의 합성

실시에 25 섹션 b)에 설명한 바와 같다.

d) 클로람부실의 콜레스테릴 에스테르 및 아테놀올을 포함하는 DSPS의 마이크로버블의 제조

DSPS(Avanti, 5.0 mg), b)로부터의 생성물(0.5 mg) 및 c)로부터의 생성물(0.5 mg)의 혼합물을 바이알 중에 넣고, 1.4 % 프로필렌 글리콜/2.4 % 글리세롤 용액 1.0 ml을 이 바이알에 가하였다. 이 혼합물을 5 분 동안 음파 파쇄하고, 80 °C에서 5 분 동안 가온시켰다(가온시키는 동안 교반함). 용액을 여과 냉각시켰다. 상부 공간을 퍼플루오로부탄 가스로 플라싱시켰다. 바이알을 캡 혼합기 중에서 45 초 동안 흔들고, 탈이온수로 잘 세척하였다. 실시에 1c)에 기재된 바와 같이, MALDI 질량 분광 분석법에 의해서 아테놀올 함유 리포펩티드의 마이크로버블 중으로의 도입을 확인하였다.

e) 진단 및 치료 용도를 위한 클로람부실의 콜레스테릴 유도체 및 아테놀올을 함유하는 리포펩티드를 포함하는 DSPS의 다중-특이 PFB 가스-함유 마이크로버블의 시험관내 연구

실시에 1 c)에서 설명한 시험관내 연구를 사용하여 유동 조건하에서 세포 결합을 평가하였다. 세포상의 마이크로버블의 점차적인 축적이 일어났고, 이는 유속에 의존적이었다. 유속이 증가하면 세포는 커버슬립으로부터 탈리되기 시작하고 마이크로버블은 여전히 세포에 결합되어 있었다. 벡터를 갖지 않은 대조버블은 내피 세포에 부착하지 않았고, 최소 유동 조건하에서 세포로부터 사라졌다.

<실시에 28>

치료 용도를 위한 캅토프릴의 친유성 티올 에스테르 및 세포 표적을 위한 아테놀올을 함유하는 리포펩티드를 포함하는 DSPS의 다중-특이 가스-충전된 마이크로버블

a) 고체상 커플링에 적합한 보호된 아테놀올 유도체의 합성

실시에 25 섹션 b)에 설명한 바와 같다.

b) 아테놀올로 관능화된 리포펩티드의 합성

실시에 25 섹션 c)에 설명한 바와 같다.

c) 캄토프릴의 콜란산 티올 에스테르의 합성

디클로로메탄(5 ml)중의 5-β-콜란산(시그마, 361 mg, 1.00 밀리몰) 및 DIC(77 μl, 0.50 밀리몰)의 혼합물을 10 분 동안 교반하고 나서, 디클로로메탄(10 ml)중의 캄토프릴(시그마, 130 mg, 0.600 밀리몰) 및 DBU(180 μl, 1.20 밀리몰) 용액에 가하였다. 반응 혼합물을 밤새 교반하고, 희석된 염산 중에 부었다. 클로로포름(30 ml)을 가하였다. 상을 분리하고, 유기상을 물 및 염수로 세척하고, 건조하였다(MgSO₄). 여과 및 농축 후, 조질의 생성물을 크로마토그래피(실리카, 클로로포름/메탄올/아세트산, 95:4:1)하였다. 생성물을 아세토니트릴/물/에탄올 혼합물로부터 생성물을 건조 동결하였다. 회백색 고체 137 mg, 수율 49 %로 얻었다. 구조를 ¹H(500 MHz) 및 ¹³C NMR(125 MHz) 스펙트럼으로 입증하였다. MALDI 질량 분광법을 사용하여 추가로, 생성물의 특성화를 수행하여, m/z 584에서 포지티브 모드 M+H 피크를 얻었다.

d) 치료 용도를 위한 캄토프릴의 친유성 티올 에스테르 및 세포 표적을 위한 아테놀올을 함유하는 리포펩티드를 포함하는 DSPS의 가스-충전된 마이크로버블의 제조

DSPS(Avanti, 5.0 mg), b)로부터의 생성물 (0.5 mg) 및 c)로부터의 생성물 (0.5 mg)의 혼합물을 바이알 중에 넣고, 1.4 % 프로필렌 글리콜/2.4 % 글리세롤 용액 1.0 ml을 이 바이알에 가하였다. 이 혼합물을 5 분 동안 음파 파쇄하고, 80 °C에서 5 분 동안 가온시키고(가온시키는 동안 교반함) 냉각시켰다. 상부 공간을 퍼플루오로부탄 가스로 플라싱시키고, 바이알을 캡 혼합기 중에서 45 초 동안 흔들고, 탈이온수로 잘 세척하였다. MALDI 질량 분광 분석법에 의해 입증된 바와 같이 최종 세척액 중에서 출발 물질은 조금도 관찰되지 않았다. 하기와 같은 MALDI 질량 분광 분석법에 의해서 b) 및 c)로부터의 화합물의 마이크로버블 중으로의 도입을 확인하였다: 약 50 μl의 마이크로버블을 약 100 μl의 90 % 메탄올을 포함하는 깨끗한 바이알에 옮겼다. 혼합물을 30 초 동안 음파 파쇄하고, MALDI 질량 분광 분석법(ACH-매트릭스)에 의해서 분석한 결과, b) 및 c)로부터의 구조물과 각각 일치하는 피크를 얻었다.

e) d)로부터의 가스-함유 마이크로버블의 시험관내 연구

실시에 1 c)에서 서술한 시험관내 분석을 사용하여 유동 조건하에서 세포 결합을 조사하였다. 세포상 마이크로버블의 점차적인 축적은 유속에 의존하여 일어났다. 유속을 증가시킴에 따라 세포는 커버슬립으로부터 이탈되기 시작하였고, 마이크로버블은 여전히 세포에 결합되어 있었다. 백터를 갖지 않은 대조 버블은 내피 세포에 부착하지 않았고, 최소 유동 조건하에서 세포로부터 사라졌다.

<실시에 29>

진단 및 치료 용도를 위한 클로람부실의 콜레스테릴 유도체 및 비오틴아미드-PEG-β-Ala-콜레스테롤을 함유하는 포스파티딜세린의 가스-충전된 마이크로버블

a) N-Boc-β-알라니네이드의 합성

DIC(510 μl)를 불활성 대기하에서 디클로로메탄(15 ml) 중의 Boc-β-Ala-OH(1.25 g, 6.60 밀리몰)에 가하였다. 반응 혼합물을 30 분 동안 교반하고, 디클로로메탄(15 ml) 중의 콜레스테롤(1.16 g, 3.00 밀리몰) 및 DMAP (367 mg, 3.00 밀리몰) 용액을 포함하는 플라스크로 옮겼다. 반응 혼합물을 2 시간 동안 교반하고 나서, 포타슘 히드로겐술페이트 수용액과 혼합하였다. 상을 분리하고, 유기상을 클로로포름으로 추출하였다. 합한 유기상을 포타슘 히드로겐술페이트 수용액 및 물로 세척하고, 건조시켰다(MgSO₄). 여과 및 농축시키고, 조질생물을 칼럼 크로마토그래피(실리카, 클로로포름/메탄올 99:1)로 정제하여 백색 고체 1.63 g을 97 % 수율로 얻었다. ¹H NMR(500 MHz)로 구조를 확인하였다.

b) 콜레스테릴 β-알라니네이드 히드로클로라이드의 합성

1,4-디옥산(5 ml) 중 1 M 염산 중의 a)로부터의 화합물(279 mg, 0.500 밀리몰) 용액을 실온에서 4 시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축시켜 콜레스테릴 β-알라니네이드 히드로클로라이드를 다량 얻었다. ¹H NMR(500 MHz) 분석 및 MALDI 질량 분광법을 사용하여 구조를 확인하고, 482에서 M+Ha 피크를 얻었다(예상치 481).

c) 비오틴-PEG₃₄₀₀-β-Ala-콜레스테롤

클로로포름/액상 메탄올(2.6:1, 3 ml)중의 콜레스테릴 β-알라니네이드 히드로클로라이드 (15 mg, 0.03 밀리몰) 용액에 트리에틸아민(42 μl, 0.30 밀리몰)을 가하였다. 혼합물을 실온에서 10 분 동안 교반하고, 1,4-디옥산(1 ml) 중 비오틴-PEG₃₄₀₀-NHS(100 mg, 0.03 밀리몰) 용액을 적가하였다. 실온에서 3 시간 동안 교반한 후, 혼합물을 증발 건조시키고, 잔사를 플래쉬 크로마토그래피로 정제하여 백색 결정 102 mg(수율 89 %)를 얻었다. NMR 분석 및 MALDI 질량 분광법을 사용하여 구조를 입증하였다.

d) 콜레스테릴 4-[4-[비스(2-클로로에틸)아미노]페닐]부타노에이드의 합성

DIC(170 μl, 1.10 밀리몰)를 건조 디클로로메탄(15 ml) 중의 클로람부실(시그마, 669 mg, 2.20 밀리몰) 용액에 가하였다. 이 혼합물을 0.5 시간 동안 실온에서 교반하고, 디클로로메탄(10 ml) 중의 콜레스테롤(알드리치, 387 mg, 1.00 밀리몰) 및 DMAP (122 mg, 1.00 밀리몰)용액에 가하였다. 반응 혼합물을 밤새 교반하니까, 5 % 중탄산나트륨에 부었다. 상을 분리하고, 유기상을 염수로 세척하고, 건조시켰다(MgSO₄). 용액을 여과 및 농축시키고, 생성물을 칼럼 크로마토그래피(실리카, 클로로포름)로 정제하여 무색 오일 560 mg을 83 % 수율로 얻었다. 생성물을 MALDI 질량 분광법을 사용하여 특성화하여 예상한 대로 674에서 M+H를 얻었다. 추가로, ¹H(500 MHz) 및 ¹³C (125 MHz) NMR 분석법을 사용하여 특성화하고 구조를 입증하였다.

e) 가스-충전된 마이크로버블의 제조

DSPS(Avanti, 5.0 mg), c)로부터의 생성물 (0.5 mg) 및 d)로부터의 생성물 (0.5 mg)의 혼합물을 바이알

중에 넣고, 1.4 % 프로필렌 글리콜/2.4 % 글리세롤 용액 1.0 ml을 이 바이알에 가하였다. 이 혼합물을 5 분 동안 음파 파쇄하고, 80 °C에서 5 분 동안 가온시키고(가온시키는 동안 교반함) 냉각시켰다. 상부 공간을 퍼플루오로부탄 가스로 플라싱시키고, 바이알을 캡 혼합기 중에서 45 초 동안 흔들고, 탈이온수로 잘 세척하였다. MALDI 질량 분광 분석법에 의해 입증된 바와 같이 최종 세척액 중에서 출발 물질은 조금도 관찰되지 않았다.

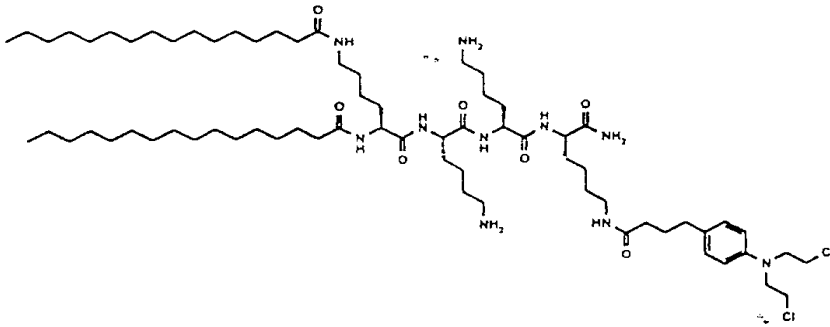
실시에 1 b)에 기재된 바와 같이 MALDI 질량 분광 분석법에 의해서 c) 및 d)로부터의 화합물의 버블 종류의 도입을 확인하였다.

<실시예 30>

진단 및 치료 용도를 위한 클로람부실을 함유하는 리포펩티드를 포함하는 DSPS의 가스-충전된 마이크로버블

이 실시예는 세포 표면 분자의 다중성에 대하여 비특이적 친화성을 갖는 관능화된 마이크로버블의 제조에 관한 것이다.

a) 클로람부실을 함유하는 리포펩티드의 제조



상기 구조는 0.125 밀리몰 스케일상의 Fmoc 보호된 링크 아마이드 MBHA 수지(노바바이오켄)로 출발하는 매뉴얼 질소 발포기를 사용하여 합성하였다. 표준 아미노산은 노바바이오켄사에서 구입하였고 팔미트산은 플루카사에서 구입하였다. 표준 TBTU/HOBt/DIEA 프로토콜을 사용하여 커플링을 수행하였다. 클로람부실(시그마)을 DIC 예비활성화를 사용하여 대칭성 무수물로서 Lys의 측쇄를 통하여 커플링하였다.

5 % EDT, 5 % H₂O 및 5 % 에틸 메틸 솔피드를 함유하는 TFA 중에서 2 시간 동안 수지로부터의 펩티드 및 측쇄 보호기의 탈보호 제거를 동시에 수행하였다. 10 mL/분 유속의 70 내지 100 %B의 농도구배(A=0.1 % TFA/물 및 B=0.1 % TFA/아세트니트릴)를 사용하는 정제 액상 크로마토그래피(Vydac 218TP1022 칼럼)으로 60 분에 걸쳐 조절의 생성물 10 mg 분액을 정제하였다. 건조 동결 후 순수한 물질 30 mg을 얻었다(분석 HPLC; 구배, 70 내지 100 %B, 여기서, B=0.1 % TFA/아세트니트릴, A= 0.1 % TFA/물, 1 mL/분의 유속, 칼럼- Vydac 218TP54: 검출- UV 214 nm-보유 시간= 26.5 분). MALDI 질량 분광법을 사용하여 추가로, 생성물의 특성화를 수행하였다; M+H 1295, 예상치 1294.

b) 진단 및 치료 용도를 위한 클로람부실을 함유하는 리포펩티드를 포함하는 가스-충전된 마이크로버블의 제조

DSPS(Avanti, 4.5 mg) 및 a)로부터의 생성물 (0.5 mg)의 혼합물을 바이알 중에 넣고, 1.4 % 프로필렌 글리콜/2.4 % 글리세롤 용액 1.0 ml을 이 바이알에 가하였다. 이 혼합물을 5 분 동안 음파 파쇄하고, 80 °C에서 5 분 동안 가온시키고(가온시키는 동안 교반함) 냉각시켰다. 상부 공간을 퍼플루오로부탄 가스로 플라싱시키고, 바이알을 캡 혼합기 중에서 45 초 동안 흔들고, 탈이온수로 잘 세척하였다. MALDI 질량 분광 분석에서 최종 세척액 중에서 a)로부터의 화합물은 조금도 관찰되지 않았다.

하기와 같은 MALDI 질량 분광 분석법에 의해서 클로람부실을 함유하는 리포펩티드의 마이크로버블 종류의 도입을 확인하였다: 약 50 μ l의 마이크로버블을 약 100 μ l의 90 % 메탄올을 포함하는 깨끗한 바이알에 옮겼다. 혼합물을 30 초 동안 음파 파쇄하고, MALDI 질량 분광 분석법(ACH-매트릭스)에 의해서 분석한 결과, 1300에서 M+H 피크, 예상치 1294 및 M+Ha 피크 1324, 예상치 1317이었다.

c) 클로람부실을 함유하는 리포펩티드로 '도핑된' DSPS의 가스-함유 마이크로버블의 시험관내 연구

실시에 1 c)에 설명한 시험관내 유동 분석을 사용하여 마이크로버블을 평가하였다. 세포상의 마이크로버블의 점차적인 축적이 일어났고, 이는 유속에 따라 의존적이었다. 유속이 증가하면 세포는 커버슬립으로부터 탈리되기 시작하고 마이크로버블은 여전히 세포에 결합되어 있었다. 백터를 갖지 않은 대조 버블은 내피 세포에 부착하지 않았고, 최소 유동 조건하에서 세포로부터 사라졌다.

<실시예 31>

진단 및 치료 용도를 위한 아테놀올을 함유하는 리포펩티드 및 캅토프릴의 친유성 유도체를 포함하는 DSPS의 가스-충전된 마이크로버블

a) 고체상 커플링에 적합한 보호된 아테놀올 유도체의 합성

실시에 25 b)에 기재된 바와 같다.

b) N-[(S)-3-헥사데실티오-2-메틸프로피오닐]프롤린의 합성

DIEA(188 μ l, 1.10 밀리몰)을 테트라히드로푸란(5 ml) 중의 요오도헥사데칸(176 mg, 0.500 밀리몰), 캅토

프릴(120 mg, 0.550 밀리몰) 및 DBU(165 μ l, 1.10 밀리몰)의 용액에 가하였다. 이 혼합물을 2 시간 동안 70 °C에서 가열하고 농축시켰다. 잔사를 포타슘 히드로겐술페이트로 포화된 물에 붓고, 유기 물질을 클로로포름으로 추출하였다. 유기상을 물로 세척하고 건조하였다(MgSO₄). 생성물을 크로마토그래피(실리카, CHCl₃/MeOH/AcOH 85:10:5)로 정제하고, 동결 건조시켜 백색 고상 물질 105 mg(48 %)를 얻었다. ¹H(500 MHz) 및 ¹³C NMR(125 MHz) 스펙트럼으로 입증하고, 추가로 MALDI 질량 분광법을 사용하여 특성화하여 예상한 대로 m/z 440에서 네가티브 모드에서 M-H를 얻었다.

c) 진단 및 치료 용도를 위한 아테놀올을 함유하는 리포펩티드 및 캅토프릴의 친유성 유도체를 포함하는 DSPS의 가스-충전된 마이크로버블의 제조

DSPS(Avanti, 4.5 mg), b)(0.5 mg) 및 c)로부터의 생성물의 혼합물을 바이알 중에 넣고, 1.4 % 프로필렌 글리콜/2.4 % 글리세롤 용액 1.0 ml을 이 바이알에 가하였다. 이 혼합물을 5 분 동안 음파 파쇄하고, 80 °C에서 5 분 동안 가온시키고(가온시키는 동안 교반) 냉각시켰다. 상부 공간을 퍼플루오로부탄 가스로 플라싱시키고, 바이알을 캡 혼합기 중에서 45 초 동안 흔들고, 달이온수로 잘 세척하였다. MALDI 질량 분광 분석에서 최종 세척액 중에서 리포펩티드를 함유하는 b) 또는 c)의 화합물은 조금도 관찰되지 않았다. 실시예 1 b)에서 설명된 바와 같이, MALDI 질량 분광 분석법에 의해서 리포펩티드를 함유하는 b) 또는 c)의 화합물의 버블 중으로의 도입을 확인하였다.

d) 진단 및 치료 용도를 위한 아테놀올을 함유하는 리포펩티드 및 캅토프릴의 친유성 유도체를 포함하는 DSPS의 가스-함유 마이크로버블의 시험관내 연구

실시예 1 c)에 설명한 시험관내 유동 분석을 사용하여 마이크로버블을 평가하였다. 세포상의 마이크로버블의 점차적인 축적이 일어났고, 이는 유속에 따라 의존적이었다. 유속이 증가하면 세포는 커버슬립으로부터 탈리되기 시작하고 마이크로버블은 여전히 세포에 결합되어 있었다. 백터를 갖지 않은 대조 버블은 내피 세포에 부착하지 않았고, 최소 유동 조건하에서 세포로부터 사라졌다.

<실시예 32>

내피 세포에 결합하는 다중-특이 리포펩티드를 포함하는 DSPS 마이크로버블에 의한 내피 세포의 부유화(floatation)

이 실시예는 본 발명이 세포 분리에 사용될 수 있다는 것을 나타내기 위하여 수행하였다.

정상적인 배꼽대(umbilical cord)(ATCC CRL-1998)로부터 유도된 사람 내피 세포계 ECV 304를 L-글루타민 200 mM, 페니실린/스트렙토마이신 (10,000 U/ml 및 10,000 mcg/ml) 및 10 % 소태아 혈청(Hyclone Lot no. AFE 5183)이 가해진 RPMI 1640 배지(Bio Whitaker)의 눈크(Nunc) 배양 플라스크(chutney 153732) 중에서 배양하였다. 트립신화 후, 세포를 1:5 내지 1:7의 분할비로 2 차 배양하였다. 트립신화된 합류 배양액으로부터의 세포 2 ml을 5 개의 원심분리용 튜브 세트에 가하고, DSPS의 대조 마이크로버블, 실시예 1의 마이크로버블 또는 실시예 14 a)로부터의 내피 세포 결합 리포펩티드로 도핑된 DSPS의 마이크로버블을 튜브 당 2, 4, 6, 8 또는 10 ml 버블을 가하였다. 400 g에서 5 분 동안 원심분리 후, 튜브 바닥의 세포 쿨터 계수기로 세었다. 4 개 이상의 마이크로버블의 세포에의 결합은 부유화를 일으킨다는 것을 알았다. 또한, 내피 세포 결합 리포펩티드 버블에 의해서 모든 세포가 부유되는 반면, 실시예 1로부터의 마이크로버블과 함께 약 50 %가 부유되었다.

<실시예 33>

PFB 가스-충전된 마이크로버블의 유전자 전달

이 실시예는 유전자 전달을 위한 표적된 마이크로버블의 제조에 관한 것이다.

a) 폴리-L-리신으로 코팅된 DSPS 리포펩티드 버블/PFB 가스의 제조

DSPS(Avanti, 4.5 mg) 및 17 b)로부터의 리포펩티드(0.5 ml)를 칭량하여 2 개의 2 ml 바이알에 넣었다. 물 중 프로필렌 글리콜/글리세롤(4 %) 0.8 ml을 각 바이알에 가하였다. 이 용액을 5 분 동안 80 °C로 가열시키고, 흔들었다. 그 후, 이 용액을 상온으로 냉각시키고, 상부 공간을 퍼플루오로부탄 가스로 플라싱시켰다. 바이알을 캡 혼합기(Capmixer)(Espe Capmix, 4450 진동/분) 중에서 45 초 동안 흔들고, 5 분 동안 롤러 테이블상에 놓았다. 바이알 중의 내용물을 혼합하고, 시료를 5 분 동안 2000 rpm에서 원심분리하고 세척하였다. 침전물을 제거하고 동량의 증류수를 가하였다. 세척 공정을 1 회 반복하였다.

폴리-L-리신 HBr(시그마, 20.6 mg)을 물 2 ml 중에 용해시키고, 물 2 ml 이하로 분액(0.4 ml)을 제조하였다. 희석된 폴리-L-리신 용액 1.2 ml을 DSPS-리포펩티드 버블 현탁액 0.12 ml에 가하였다. 인큐베이션 후, 과량의 폴리리신을 물로 잘 세척함으로써 제거하였다.

b) 세포의 트랜스펙션

내피 세포(ECV 304)를 6개의 웰 중에서 균일 부합류층으로 배양하였다. RPMI 배지 중의 5 μ g DNA(CLONTECH사로부터의 녹색 증가된 형광 단백질 백터) 및 a)로부터의 50 μ l 마이크로버블 현탁액을 최종 부피 250 μ l로 제조하였다. 혼합물을 15 분 동안 실온에서 방치하고 나서, 완전 RPMI 배지 1 ml을 가하였다. 세포 배양 접시로부터 배지를 제거하고 DNA-마이크로버블 혼합물을 세포에 가하였다.

c) 초음파 처리

15 분 인큐베이션 후, 선택된 웰을 1 MHz, 0.5 W/cm²의 연속 파장 초음파에 30 초 동안 노출시켰다.

세포를 세포 배양기 내(37 °C)에서 배양하였다.

d) 인큐베이션 및 검사

세포를 세포 배양 인큐베이터(37 °C) 내에서 약 4 시간 30 분 동안 더 인큐베이션하였다. 그 후, DNA-마

이크로버블을 포함하는 배지를 흡입에 의해서 제거하고, 완전 RPMI 배지 2 ml을 가하였다. 시험 전에 세포를 40 내지 70 시간 동안 인큐베이팅하였다. 그 후, 배지의 대부분을 제거하고, 세포를 현광 현미경으로 검사하였다. 그 결과를, DNA 또는 DNA-폴리리신이 세포에 가해진 대조 실험으로부터의 결과와 비교하였다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

수성 담체액 중 가스 함유 또는 가스-발생 물질로 이루어진 리포터의 현탁액을 포함하며, 표적과 함께 2 가지 형태 이상의 결합쌍을 형성할 수 있는 것을 특징으로 하는 표적 추적가능한 진단 및(또는) 치료적 활성제.

청구항 2

제1항에 있어서, 가스가 공기, 질소, 산소, 이산화탄소, 수소, 불활성 가스, 플루오르화황, 헥사플루오르화셀레늄, 저분자량 탄화수소, 케톤, 에스테르, 할로겐화 저분자량 탄화수소 또는 이들의 임의의 혼합물을 포함하는 것을 특징으로 하는 진단 및(또는) 치료적 활성제.

청구항 3

제2항에 있어서, 가스가 퍼플루오르화 케톤, 퍼플루오르화 에테르 또는 퍼플루오로카본을 포함하는 것을 특징으로 하는 진단 및(또는) 치료적 활성제.

청구항 4

제2항에 있어서, 가스가 헥사플루오르화황 또는 퍼플루오로프로판, 퍼플루오로부탄 또는 퍼플루오로펜탄을 포함하는 것을 특징으로 하는 진단 및(또는) 치료적 활성제.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 내응집성 표면막, 필모겐 단백질, 중합체 물질, 비중합성 및 비중합가능한 벽-형성 물질 또는 계면활성제로 안정화된 가스 마이크로버블을 포함하는 것을 특징으로 하는 진단 및(또는) 치료적 활성제.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 계면활성제가 하나 이상의 인지질을 포함하는 것을 특징으로 하는 진단 및(또는) 치료적 활성제.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 계면활성 물질의 75 % 이상이 전체 순 전하를 개별적으로 띠는 인지질 분자를 포함하는 것을 특징으로 하는 진단 및(또는) 치료적 활성제.

청구항 8

제7항에 있어서, 필름-형성 계면활성 물질의 75 % 이상이 포스파티딜세린, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딜이노시톨, 포스파티드산 및 카르디올리핀 중에서 선택된 하나 이상의 인지질을 포함하는 것을 특징으로 하는 진단 및(또는) 치료적 활성제.

청구항 9

제8항에 있어서, 인지질의 80 % 이상이 포스파티딜세린을 포함하는 것을 특징으로 하는 진단 및(또는) 치료적 활성제.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가스-함유 또는 가스-발생 물질을 2 종 이상의 벡터 또는 2 개 이상의 결합 위치에 결합가능한 하나의 벡터에 결합시키는 것을 특징으로 하는 진단 및(또는) 치료적 활성제.

청구항 11

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가스-함유 또는 가스-발생 물질이 하나 이상의 세포 표면 수용체에 대하여 친화성을 갖는 하나 이상의 표적 벡터에 결합되어 있고, 치료 반응을 유도하기 위해서 수용체계에 결합할 수 있는 잔기를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 진단 및(또는) 치료적 활성제.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터(들)가 항체; 세포 부착 분자; 세포 부착 분자 수용체; 시토킨; 성장 인자; 펩티드 호르몬 및 그의 단편; 비펩티드 효능제/길항제, 및 세포 부착 분자, 시토킨, 성장 인자 및 펩티드 호르몬에 대한 수용체의 비생활성 결합제; 올리고뉴클레오티드 및 변형된 올리고뉴클레오티드; DNA-결합 약물; 프로테아제 기질/억제제; 조합성 라이브러리로부터 생성된 분자; 생활성 소분자; 및 세포-표면 프로테오글리칸에 결합하는 단백질 및 펩티드로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 진단 및(또는) 치료적 활성제.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터(들)가 진단/치료제가 상호작용하지만 표적에 고정적으로 결합하지 않는 농도에서 표적에 대한 친화성을 갖는 것을 특징으로 하는 진단 및(또는) 치료적 활성제.

청구항 14

제13항에 있어서, 벡터(들)가 세포 부착 단백질용 리간드 및 내피 세포 표면상의 상응하는 리간드를 갖는 세포 부착 단백질로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 진단 및(또는) 치료적 활성제.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터(들)가 표적에 쉽게 노출되지 않게 위치되는 것을 특징으로 하는 진단 및(또는) 치료적 활성제.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터가 아비딘-비오틴 및(또는) 스트렙타비딘-비오틴 상호작용에 의해 리포터에 커플링되거나 연결되는 것을 특징으로 하는 진단 및(또는) 치료적 활성제.

청구항 17

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터(들)가 리포터에 공유적으로 커플링되거나 연결되는 것을 특징으로 하는 진단 및(또는) 치료적 활성제.

청구항 18

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터(들)가 정전하 상호작용을 통해 리포터에 비공유적으로 커플링되거나 연결될 수 있는 것을 특징으로 하는 진단 및(또는) 치료적 활성제.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 방사성이거나 X-선 조영제, 광 영상화 프로브 또는 스핀 라벨로서 유효한 잔기를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 진단 및(또는) 치료적 활성제.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 치료제 화합물을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 진단 및(또는) 치료적 활성제.

청구항 21

제20항에 있어서, 치료제 화합물이 항신생물제, 혈액 제품, 생물학적 반응 변형제, 항진균제, 호르몬 또는 호르몬 동족체, 비타민, 효소, 항알러지제, 조직 인자 억제제, 혈소판 억제제, 응집 단백질 표적 억제제: 피브리린 형성 억제제, 섬유소 분해 촉진제, 항맥관형성제, 순환성 약물, 대사성 강화제, 항결절제, 항비루스제, 혈관 확장제, 항생제, 소염제, 항원충제, 항류머티스제, 마취제, 아편제, 심장 글리코시드, 신경근육성 차단제, 진정제, 국소 마취제, 전신 마취제 또는 유전성 물질인 것을 특징으로 하는 진단 및(또는) 치료적 활성제.

청구항 22

제20항 또는 제23항에 있어서, 치료제 화합물이 디술피드기를 통해 리포터에 공유적으로 커플링되거나 연결되는 것을 특징으로 하는 진단 및(또는) 치료적 활성제.

청구항 23

제20항 또는 제21항에 있어서, 친유성 또는 친유성 유도 치료제 화합물이 소수성 상호작용을 통해 리포터에 연결되는 것을 특징으로 하는 진단 및(또는) 치료적 활성제.

청구항 24

i) 선택된 표적에 대한 친화성을 갖는 예비표적 벡터를 포함하는 제1 투여 조성물; 및
ii) 상기 예비표적 벡터에 대한 친화성을 갖는 벡터를 포함하는, 제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 청구된 진단 및(또는) 치료적 활성제를 포함하는 제2 투여 조성물을 포함하는 것을 특징으로 하는 배합 제제.

청구항 25

제24항에 있어서, 예비표적 벡터가 모노클로날 항체인 것을 특징으로 하는 배합 제제.

청구항 26

i) 제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 청구된 진단 및(또는) 치료적 활성제를 포함하는 제1 투여 조성물; 및
ii) 상기 진단 및(또는) 치료적 활성제를 그의 표적으로부터 치환하거나 이탈시킬 수 있는 물질을 포함하는 제2 투여 조성물을 포함하는 것을 특징으로 하는 배합 제제.

청구항 27

i) 제22항에 청구된 진단 및(또는) 치료적 활성제를 포함하는 제1 투여 조성물; 및

ii) 상기 제1 투여 조성물의 진단 및(또는) 치료적 활성제 중의 치료제 화합물 및 리포터를 커플링하거나 연결시키는 디술피드기를 환원적으로 절단할 수 있는 환원제를 포함하는 제2 투여 조성물을 포함하는 것을 특징으로 하는 배합 제제.

청구항 28

가스-함유 또는 가스-발생 물질로 이루어진 리포터에 커플링 또는 연결시키는 것을 포함하며, 표적과 함께 2 가지 형태 이상의 결합쌍을 형성할 수 있는 것을 특징으로 하는 제1항에 정의된 표적 추적가능한 진단 및(또는) 치료적 활성제의 제조 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 치료제 화합물이 또한 리포터와 배합되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 청구된 진단 및(또는) 치료적 활성제의 표적 추적가능한 초음파 조영제로서의 용도.

청구항 31

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 청구된 진단 및(또는) 치료적 활성제를 사람 또는 사람이 아닌 동물체에 투여하고 상기 사람 또는 동물체의 적어도 일부에서 초음파, 자기 공명, X-선, 방사선촬영 또는 광영상을 발생시키는 것을 포함하는, 사람 또는 사람이 아닌 동물체의 증강된 영상을 발생시키는 방법.

청구항 32

제31항에 있어서,

- i) 선택된 표적에 대한 친화성을 갖는 예비표적 벡터를 상기 사람 또는 동물체에 투여하는 단계; 및
- ii) 상기 예비표적 벡터에 대한 친화성을 갖는 벡터를 포함하는, 제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 청구된 진단 및(또는) 치료적 활성제를 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 예비표적 벡터가 모노클로날 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 34

제31항에 있어서,

- i) 제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 청구된 진단 및(또는) 치료적 활성제를 상기 사람 또는 동물체에 투여하는 단계; 및
- ii) 상기 진단 및(또는) 치료적 활성제를 그의 표적으로부터 치환 또는 이탈시킬 수 있는 물질을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 35

제31항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 진단 및(또는) 치료적 활성제가 치료제 화합물을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 치료제 화합물이 디술피드기를 통해 리포터에 공유적으로 커플링되거나 연결되고, 이 디술피드기를 환원적으로 절단할 수 있는 환원제를 포함하는 조성물이 후속적으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 37

표적을 나타내는 세포를 유동 챔버에 고정되게 위치시키며, 담체액 중 제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 정의된 진단 및(또는) 치료적 활성제의 현탁액을 상기 챔버로 통과시키고, 상기 세포에 대한 상기 진단 및(또는) 치료적 활성제의 결합을 시험하는 것으로 이루어진, 진단 및(또는) 치료적 활성제에 의한 시험관내 표적 추적성의 검사 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 담체액의 유속이 생체내에서 일어나는 전단 속도를 나타내도록 조절되는 것을 특징으로 하는 방법.