



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT

85442

C (15) Patentti myönnetty
Patent beviljat 07 01 1985

(51) Kv.1k.5 - Int.c1.5

A 61K 49/00

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	854488
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	14.11.85
(24) Alkupäivä - Löpdag	28.03.85
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	14.11.85
(44) Nähtävaksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	15.01.92
(86) Kv. hakemus - Int. ansökan	N085/00017
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
29.03.84 GB 8408127 P	

(71) Hakija - Sökande

1. Nyegaard & Co A/S, Nycoveien 2, Oslo, Norge, (NO)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Jacobsen, Trond, Parelusveien 15, Oslo, Norge, (NO)
2. Klaveness, Jo, Skoeyen Terrasse 15, Oslo, Norge, (NO)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Ferromagneettisten ainehiukkasten käyttö NMR-varjoaineen valmistamiseksi
Användning av ferromagnetiska materialpartiklar för framställning av ett NMR-kontrastmedel

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 71564 (A 61K 49/00), US A 4335094 (G 01N 33/56), WO A 83/03920 (H 01F 1/09)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee menetelmää ferromagneettisten hiukkasten, jotka edullisesti on sisällytetty biologisesti siedettävään polymeeriin tai päällystetty sellaisella ja jotka pidetään dispersiona fysiologisesti hyväksyttävässä dispergointiväliaineessa, käyttämiseksi varjoaineina NMR-kuvauksessa diagnostisoinnissa käytettäväksi soveltuvien kuvien muodostamiseksi. Toisin kuin paramagneettiset NMR-varjoaineet, ferromagneettiset NMR-varjoaineet antavat erityisen hyvän kontrastin T_2 :sta riippuvissa kuvissa.

Uppfinningen avser ett förfarande för användning av ferromagnetiska partiklar, vilka lämpligen inbäddats i eller överdragits med en biotolerant polymer och hålls i dispersion i ett fysiologiskt godtagbart dispersionsmedium, som kontrastmedel vid NMR-avbildning för åstadkommande av bilder, vilka kan utnyttjas för diagnos. Till åtskillnad från paramagnetiska NMR-kontrastmedel ger ferromagnetiska NMR-kontrastmedel synnerligen god kontrast i de T_2 -avhängiga bilderna.

Ferromagneettisten ainehiukkasten käyttö NMR-varjoaineen valmistamiseksi

5 Tämä keksintö koskee ferromagneettisten ainehiukkasten käyttöä NMR-varjoaineen valmistamiseen.

10 NMR:n käyttö lääketieteellisenä diagnostisena keinona, erityisesti kuvausmenetelmänä, on lisääntynyt 1970-luvun alkupuolelta lähtien. Tämä menetelmä tekee mahdolliseksi pehmeiden kudosten hyvän resoluution ja erottumisen ilman mahdollisesti haitallisen säteilyn käyttöä. Useita vuosia radiologit uskoivat, että pehmeiden kudosten NMR-kuvauksessa saavutettavan hyvän kontrastin takia ei varjoaineiden käyttö olisi välttämätöntä.

15 Viime aikoina on kuitenkin havaittu, että paramagneettisia komplekseja voidaan edullisesti käyttää tehostuneen kontrastin saavuttamiseen NMR-kuvauksessa ja siten laajentaa tämän menetelmän diagnostista käyttökelpoisuutta.

20 Monien atomien ytimillä on spiniksi kutsuttu ominaisuus, joka liittyy pieneen magneettiseen momenttiin. Ulkoisen magneettikentän poissa ollessa on magneettisten momenttien orientaatioiden jakautuma sattumanvarainen. Staattisen magneettikentän läsnä ollessa ydinmagneettiset momentit kääntyvät kentän suunnan mukaan, ja kentässä
25 vallitsee nettosuuntautuminen.

Kuten R.S. First kuvaa teoksessa "Nmr on medicine in the 1980's" (1983), NMR-kuvauksessa potilas asetetaan staattiseen kenttään ja annetaan lyhyt radiotaajuuspulssi potilasta ympäröivän käämin kautta. Radiotaajuus eli RF-signaali valitaan niiden nimenomaisten ytimien (esimerkiksi ^1H , ^{19}F) mukaan, jotka on määrää saattaa resonoi-
30 maan. RF-pulssi saa magneettiset momentit suuntautumaan uuden kentän mukaisesti ja suuntautumaan faasissa, ja pulssin loppuessa momentit palaavat alkuperäiseen suunta-
35 jakautumaan staattisen kentän suhteen ja presessiofaasien

sattumanvaraiseen jakautumaan, jolloin ne antavat ydinmagneettisen resonanssisignaalin, joka voidaan ottaa vastaan vastaanottokäämillä. NMR-signaali on tavallisesti peräisin ^1H :sta ja se edustaa tutkittavan kudoksen protonitiheyskarttaa.

5

Kaksi muutakin arvoa voidaan määrittää, kun RF-pulssi kytketään pois ja ydinmagneettiset momentit relaksoituvat eli palaavat tasapaino-orientaatioihin ja -faaseihin. Nämä ovat T_1 ja T_2 , spin-hilarelaksaatioaika ja spinspinrelaksaatioaika. T_1 edustaa aikaa, joka on karakteristinen palaamiselle tasapainojakautumaan, ts. ydinmagneettisten momenttien tasapainosuuntautumiseen kentässä. T_2 edustaa puolestaan aikaa, joka on karakteristinen palaamiselle ydinmagneettisten momenttien sattumanvaraiseen presessiofaasijakautumaan.

10

15

Muodostuva NMR-signaali sisältää siten informaatiota protonitiheydestä, T_1 :stä ja T_2 :sta, ja muodostettavat kuvat ovat yleensä tulosta mainittuun informaatioon perustuvasta monimutkaisesta tietokoneella tehtävästä datarekonstruktiosta.

20

Varjoaineiden mahdollista käyttöä NMR-kuvauksen diagnostisen käyttökelpoisuuden laajentamiseen käsittelee R. C. Brasch julkaisussa Radiology 147 (1983) 781. Vaikka käytettävissä on lukuisia menetelmiä NMR-kontrastin parantamiseksi, eivät monet, kuten kudoksen lämpötilan, viskositeetin tai vesipitoisuuden manipulointi, selvästikään ole kliinisesti toteutettavissa ja edullisin tunnettu menetelmä näyttää olevan paramagneettisten varjoaineiden käyttö spinhilarelaksaatioajan T_1 lyhentämiseksi.

25

30

Paramagneettinen aine on aine, joka sisältää yhden tai useampia perushiukkasia (elektroneja, protoneja tai neutroneja), joilla on spin, jonka vaikutusta ei kumoa toinen hiukkanen, jolla on samanlainen spin. Nämä hiukkaset muodostavat pienen magneettikentän, joka pystyy olemaan vuorovaikutuksessa sen lähellä olevien ydinmagneet-

35

tisten dipolien kanssa ja aiheuttamaan dipolin reorientaation, ts. ydinspinin ja presessiofaasin muutoksen.

Koska elektronin muodostama magneettikenttä on paljon suurempi kuin protonin tai neutronin muodostama, 5 käytetään paramagneettisina NMR-varjoaineina käytännössä vain ioneja, molekyyliä, radikaaleja tai komplekseja, jotka ovat paramagneettisia sen ansiosta, että ne sisältävät yhden tai useamman parittoman elektronin.

Paramagneettisten ionien ja kompleksien kontrasti- 10 vaikutus on pääasiassa T_1 :n lyhenemisen seurausta (vertaa DE-hakemusjulkaisu 3 129 906). Kuten R. C. Brasch [Radiology 147 (1983) 781] kuvaa, aiheuttavat paramagneettiset stabiilit radikaalit myös hieman T_2 :n lyhenemistä. T_1 :n suhteellinen lyheneminen on kuitenkin suurempi kuin T_2 :n.

15 Paramagneettisten varjoaineiden käyttöä NMR-kuvauksessa on tutkittu laajasti, ja on ehdotettu tällaisten aineiden liuosten ja kolloidisten dispersioiden oraalista ja parenteraalista antoa diagnostisen kuvauksen yhteydessä.

20 NMR-kuvauksessa käytettäväksi ei tähän asti ole kuitenkaan ollut saatavissa varjoaineita, joilla on kyky selektiivisesti parantaa erilaisten kudostyyppien välistä kontrastia T_2 -kuvassa.

25 Nyt on yllättävästi havaittu, että ferromagneettisia hiukkasia sisältäviä dispersioita voidaan käyttää varjoaineina NMR-kuvauksessa, jolloin kontrastin saamiseen T_2 :n merkittävä lyheneminen (joihin liittyy yleensä pienempi T_1 :n suhteellinen lyheneminen).

30 Ferromagneettiset hiukkaset sisältävät atomeja, joiden magneettiset momentit (seurausta atomien parittomista elektroneista) ovat Weissin alueiksi kutsutuissa tiloissa yhdensuuntaisia. Ferromagnetismi on siten yhteisvaikutusilmiö toisin kuin paramagnetismi ja sitä voi esiintyä vain atomien yhteenliittymissä ts. hiukkasissa.

35 Ferromagneettisilla hiukkasilla on kyky magnetoitua, ts. hiukkanen, joka sisältää suuren määrän atomeja,

voi muodostaa nettomagneettikentän jopa ulkoisen kentän poissa ollessa. Sen sijaan paramagneettisissa hiukkasis-
sa, jotka sisältävät suuria atomimääriä, yksittäisten pa-
ramagneettisten atomien magneettiset dipolit asettuvat
5 sattumanvaraisesti ulkoisen kentän poissa ollessa eivätkä
siten muodosta nettokenttää.

Tämä kyky magnetoitua ja muodostaa suhteellisen
voimakas magneettikenttä on tärkein syy sille, miksi fer-
romagneettisten hiukkasten käyttöä varjoaineina NMR-ku-
vauksessa oltaisiin voitu pitää kontraindikoituna, eri-
10 tyisesti diagnostisessa kuvauksessa in vivo.

Niinpä NMR-spektroskopiassa, josta teknisen alueen
NMR-kuvaus on kehitetty, ferromagneettisten hiukkasten
läsnäolo on tunnettu epätarkkuuslähde, eikä ole epätaval-
15 lista käyttää magneettia pienten ferromagneettisten hiuk-
kasten poistamiseen näytteistä, jotta vältettäisiin se-
mitatun spektrin resoluution huononeminen, joka on seu-
rausta hiukkasten aiheuttamien paikallisten kenttäepäho-
mogeenisuuksien läsnäolosta näytteessä.

20 Samoin, jos ferromagneettiset hiukkaset magnetoit-
tavat, voidaan niiden odottaa kerääntyvän yhteen. Niinpä
vaikka paramagneettiset varjoaineet voivat saavuttaa suu-
rin piirtein yhtenäisen paramagneettisten keskusten ja-
kautumisen olivatpa ne sitten liuoksessa tai kolloidises-
25 sa dispersiossa, voitaisiin pitää todennäköisenä, että
ferromagneettisten hiukkasten dispersio voisi muodostaa
yhteenliittymiä eikä siten jakautuisi tasaisesti. Paren-
teraalisesti annettavien dispersioiden ollessa kyseessä
olisi tällaisen kerääntymisen ilmenemistä pidetty vaaral-
30 lisena potilaalle, eikä ferromagneettisten hiukkasten
käyttöä olisi siten pidetty soveltuvana.

Ferromagneettisen hiukkasen muodostaman kentän
voimakkuus on lisäksi niin paljon suurempi kuin paramag-
neettisten hiukkasten muodostaman, että olisi odotettu,
35 että kontrastivaikutus, jonka saa NMR-kuvassa aikaan

näytteessä tutkimuksen aikana olevien ferromagneettisten hiukkasten läsnäolo, ulottuisi niin kauas, että se todennäköisesti hämärtäisi kuvassa ferromagneettisia hiukkasia sisältävän ja tällaisia hiukkasia sisältämättömän kudoksen rajan, esimerkiksi verisuonien tai ruoansulatuskanavan seinämät laskimonsisäisesti ja vastaavasti suun kautta annettujen hiukkasten ollessa kyseessä.

P. Mansfield ja P. G. Morris ovat teoksessa "Advances on Magnetic Resonance - Supplement 2", toim. J. S. Waugh, Academic Press 1982, s. 234 ehdottaneet kolloidisten, puhtaasta raudasta koostuvien hiukkasten antamista suun kautta rauta-aterian muodossa, niin että sen etenemistä voitaisiin seurata syntyneen voimakkaan paikallisen epähomogeenisuuden avulla. Julkaisussa ei kuitenkaan ole viitteitä siitä, että T_1 tai T_2 tulisi määrittää tai että rautahiukkaset kyllästäisivät kudokset verrattuna muihin ferromagneettisesta materiaalista muodostuvan tulpan kulkiessa ruoansulatusjärjestelmän läpi.

Suun kautta annettavissa olevia hiukkasmaisia ferromagneettisia koostumuksia ehdotetaan myös GB-patenttijulkaisussa 1 339 537, vaikkakin niiden ehdotettu käyttötarkoitus on röntgenvarjoaineena tavanomaisten bariumatrioiden sijasta.

Tiettyjen ferromagneettisten polymeerihukkasten käyttöä diagnostisiin ja terapeuttisiin tarkoituksiin ehdotetaan laajasti kansainvälisessä hakemusjulkaisussa WO 83/03920, jossa kuvataan monodispergoitujen ferromagneettisten polymeerihukkasten valmistusta. Tämä julkaisu viittaa tällaisten hiukkasten käyttöön solujen erotukseen (in vitro), jolloin sentrifugoimalla tehtävä erotus voidaan korvata paljon yksinkertaisemmalla magneettisella uutolla. Ehdotetaan myös, että tällaisia hiukkasia voidaan käyttää kantajina lääkeaineille, jotka voidaan siten kuljettaa haluttuun kohtaan magneettikenttää käyttämällä.

R.S. Newbower [IEEE Transactions on magnetics Mag 9 (1973) 447] ja M.P. Perry [Proceedings Int. Adv. Course Workshop (1977)] ovat kuvanneet terapeuttisia ja diagnostisia sovellutuksia, joissa ferromagneettisten hiukkasten muodostama stabiili kolloidinen dispersio johdetaan verenkiertoon. Hiukkaset voidaan ohjata magneettisesti verisuonen toimintahäiriöön, esimerkiksi aivovaltimon pullistumaan, ja pitää ne siellä magneettisen kentän avulla vaurion korjaamiseksi. Vaihtoehtoisesti voidaan asettamalla pysyvä magneetti valtimon ympärille aiheuttaa ferromagneettisten hiukkasten muodostama tulppa, joka pysäyttää veren virtaamisen valtimossa; tämä saattaa olla edullista leikkauksen aikana, jossa valtimo voisi vaurioitua suljettaessa se puristamalla. Injektoidun dispersion käyttötarkoituksena on lisäksi veren virtauksen seuraaminen, koska dispersio voidaan havaita pelkän magneettisen susceptibiliteettinsä avulla.

Aiemmin ei kuitenkaan ole ehdotettu sitä, että ferromagneettisia hiukkasia voitaisiin käyttää T_2 -varjoaineina NMR-kuvauksessa.

Tämä keksintö koskee ferromagneettisten ainehiukkasten käyttöä NMR-varjoaineen valmistamiseen käytettäväksi ihmisen tai muun eläimen eilmistölle käytettävässä diagnoosimenetelmässä, jossa muodostetaan T_2 :sta riippuva kuva ja tehdään diagnoosi mainitun kuvan avulla.

Keksinnön mukaisesti käytettävien ferromagneettisten hiukkasten T_2 :a lyhentävä vaikutus on erityisen kiinnostava ja vaikka NMR-kuvausta voidaan käyttää erillisten intensiteetti-, T_2 - ja T_1 -kuvien muodostukseen, on saavutettavissa huomattava säästö tarvittavassa tietokoneajassa ja -kapasiteetissa tuottamalla pelkkä T_2 -kuva tai T_2 -kuva ja joko T_1 - tai intensiteettikuva.

Kontrastivaikutuksen suhteellinen suuruus riippuu useista näytteeseen liittymättömistä tekijöistä, kuten hiukkastiheydestä, hiukkasten ferromagneettisuussisällös-

tä ja keskimääräisestä hiukkaskoosta. Yleissääntönä on, että sekä T_1 :n että T_2 :n lyheneminen, joka saavutetaan käyttämällä varjoainetta, kasvaa näiden tekijöiden mukana. T_2 :n ja T_1 :n suhteellinen lyheneminen saattaa kuitenkin olla erityisen herkkä ferromagneettisuussisällölle ja hiukkaskoolle kasvavan ferromagneettisuussisällön aiheuttaessa suhteellisesti suuremman T_2 :n lyhenemisen ja T_2 :n suhteellisen lyhenemisen ollessa pienempi hiukkaskoon pienetessä.

10 Ferromagneettisten hiukkasten keskimääräinen koko on mielellään alle 50 μm , edullisesti 0,002 - 50 μm ja edullisemmin noin 0,1 - 20 μm . Parenteraalista antamista varten ferromagneettisten hiukkasten keskimääräinen koko on edullisesti 0,1 - 10 μm , kun taas suoraan ruoansulatuskanavaan (esimerkiksi oraalisesti) tai virtsarakkoon, 15 kohtuun, sappitiehyeeseen tai korvasylkirauhasen tiehyeseen antamista varten on erityisen edullinen alue 5 - 20 μm . Hiukkasten ferromagneettisen aineen pitoisuus on sopivasti 0,1 - 100 paino-%, edullisesti 0,5 - 50 paino-%.

20 Ferromagneettiset hiukkaset voivat olla mitä tahansa ferromagneettista materiaalia, kuten puhdasta rautaa, tai magneettista rautaoksidia, kuten magnetiittia, $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$:a mangaani-, koboltti- tai nikkeliferriittiä, ja niillä voi haluttaessa olla ei-ferromagneettinen päällyste tai matriisi, esimerkiksi polymeeripäällyste, esimerkiksi näytteen ja hiukkasten välisen kemiallisen reaktion välttämiseksi dispergoitumisen edistämiseksi. Kun halutaan käyttää hiukkasia, joilla on polymeeripäällyste tai matriisi, johon ferromagneettinen materiaali on jakautettu, valmistetaan hiukkaset edullisesti J. Ugelstadin et al. [katso esimerkiksi kansainvälinen hakemusjulkaisu W0/03920] menetelmän mukaisesti. Ollakseen soveltuvia rutiinikuvaamiseen in vivo, hiukkaset eivät saisi olla radioaktiivisia.

35

NMR-kuvaus on erityisen arvokas diagnostisena välineenä, koska se tekee mahdolliseksi kuvata kudoksia ja elimiä in vivo. Erilaisilla elimillä ja erilaisilla kudoksilla, esimerkiksi samassa elimessä olevilla syöpä- ja normaalikudoksella, on erilaiset karakteristiset protoni-intensiteetit ja T_1 - ja T_2 -relaksaatioajat. Siten ferromagneettiset varjoaineet ovat erityisen käyttökelpoisia NMR-kuvausdiagnoosissa.

Ferromagneettisen varjoaineen anto voi tapahtua parenteraalisesti soveltuvasti injektoimalla (esimerkiksi laskimonsisäisesti), oraalisesti (esimerkiksi nielemällä), rektaalisesti tai viemällä katetrin kautta virtsarakkoon, kohtuun, sappitiehyeseen tai korvasylkirauhasen tiehyeseen. Antaminen sellaisiin elimistön kohtiin, joista varjoaine voi poistua elimistöstä kulkematta elimistön kudoksen läpi, esimerkiksi antaminen suoleen, virtsarakkoon, kohtuun, jne., on kuitenkin edullista. Kun kuvattava elin on maksa, perna, luuydin jne., on laskimonsisäinen antaminen edullista. Eläinkokeissa on havaittu, että laskimonsisäisesti annettujen ferromagneettisten hiukkasten eliminoituminen verestä on äärimmäisen nopeaa.

Ferromagneettiset hiukkaset voivat olla vapaita ferromagneettisia hiukkasia tai ei-ferromagneettiseen matriisiin sijoitettua tai sellaisella päällysteellä peitettyä ferromagneettista materiaalia. Parenteraalista antoa varten päällyste- tai matriisimateriaali on edullisesti biologisesti hajoava polymeeri, kun taas suoraan ruoansulatuskanavaan tai virtsarakkoon, kohtuun jne. tapahtuvaa antamista varten materiaali on edullisesti biologisesti siedettävissä oleva polymeeri ja erityisen edullisesti biologisesti hajoamaton polymeeri, esimerkiksi selluloosajohdannainen.

Keksinnön mukaisesti valmistettu varjoaine, jos se tarkoitettu parenteraalisesti annettavaksi, on edullisesti dispersio steriilissä, fysiologisesti hyväksyttävässä

väliaineessa, esimerkiksi isotoonisessa vesiliuoksessa, joka voi sisältää pinta-aktiivisia aineita, kuten esimerkiksi polysorbaatti 80:ä. Parenteraalista antoa varten ferromagneettiset hiukkaset ovat edullisesti sisällytetyinä biologisesti hajoavaan polymeeriin, jonka hajoamistuotteet ovat fysiologisesti hyväksyttäviä, tai päällystettyinä sellaisella polymeerillä.

Keksinnön mukaisesti valmistettu varjoaine, jos se on tarkoitettu annettavaksi suoraan ruoansulatuskanavaan (esimerkiksi suun kautta) tai virtsarakkoon, kohtuun jne., on edullisesti dispergoituna fysiologisesti hyväksyttävään väliaineeseen, esimerkiksi vesiliuokseen, joka sisältää pinta-aktiivisia aineita ja/tai viskositeettia nostavia aineita, kuten esimerkiksi selluloosajohdannaisia.

Käyttämällä tällaista viskositeettia nostavaa ainetta voidaan varjoaine saada peittämään ruoansulatuskanavan seinämät ja tehdä siten mahdolliseksi suolista otettujen kuvien kontrastin parantaminen. Käytettäessä suun kautta annettavia, paramagneettisia varjoaineita ei ole helppo saada aikaan kontrastin paranemista ruoansulatuskanavan mahalaukun jälkeisissä osissa.

Kun varjoaine on tarkoitettu annettavaksi suoraan ruoansulatuskanavaan (esimerkiksi suun kautta) tai virtsarakkoon, kohtuun jne., on erityisen edullista, että ferromagneettisten hiukkasten ominaispaino on suunnilleen sama kuin ympäröivän nesteen (maha- ja suolistonesteiden tai virtsan), ja hiukkaset, joiden ominaispaino on noin 1,07, ovat edullisia.

Ruoansulatuskanavaan tai virtsarakkoon annettaviksi tarkoitettut ferromagneettiset hiukkaset on edullisesti sisällytetty biologisesti siedettävissä olevaan polymeeriin, ts. polymeeriin, joka on fysiologisesti hyväksyttävä ja joko biologisesti hajoamaton tai biologisesti fysiologisesti hyväksyttäväksi hajoamistuotteiksi hajoava,

tai päällystetty sellaisella polymeerillä. Biologisesti hajoamattomat polymeerit ovat erityisen edullisia, koska polymeerin hajoamisen seurauksena vapautuva ferromagneettinen materiaali saattaa olla ruoansulatusnesteeseen liu-
keneva tai ollessaan hyvin hienojakoista saattaa imeytyä
elimistöön. Ferromagneettisen materiaalin liukeneminen
saattaa saada aikaan paramagneettisten ionien vapautumi-
sen ja siten heikentää kontrastivaikutusta protoni-inten-
siteetikuvassa, koska paramagneettisen materiaalin T_1 :ä
lyhentävä vaikutus pyrkii kohottamaan protoni-intensi-
teettiä, kun taas ferromagneettisen materiaalin T_2 :a ly-
hentävä vaikutus pyrkii alentamaan protoni-intensiteettiä
(protoni-intensiteetin I riippuvuutta T_1 :stä ja T_2 :sta
käsitellään jäljempänä).

Erityisen edullisesti varjoaineet muodostuvat ferromagneettisista hiukkasista, jotka on sisällytetty adsorboiduista tai absorboiduista lääkeaineista vapaaseen polymeeriin tai päällystetty sellaisella. Ferromagneettisten hiukkasten koko ja ferromagneettisen aineen pitoisuus niissä ovat edullisesti edellä määritellyissä rajoissa.

Keksinnön mukaisesti valmistettujen NMR-varjoaineiden sisältämät ferromagneettiset hiukkaset annetaan dispergoituina dispergointiväliaineeseen. Niinpä yhtenäinen hiukkasdispersio saavutetaan ennen antamista edullisesti ravistamalla ja äänikäsittelyllä. Yksinkertaisuuden vuoksi termiä "dispersio" käytetään tässä todellisista dispersioista, suspensioista ja kolloideista.

Ferromagneettisen materiaalin pitoisuus varjoaineesta riippuu antomuodosta ja kulloinkin tutkittavista elimistä tai kudoksista. Annoksen tulisi edullisesti olla riittävä antamaan ferromagneettisen metallin (esimerkiksi Fe) pitoisuus noin 0,1 mmol/kg tutkittavaa elintä kyseessä olevaan elimeen. Kokonaisannos on yleensä 10^{-4} - 10^{-1} mmol ferromagneettista metallia (esimerkiksi Fe) painoki-

loa kohti, edullisesti noin 10^{-3} - 10^{-1} mmol/kg. Itse dispersiot sisältävät mielellään kaikkiaan noin 0,1 - 10 paino-% ferromagneettista materiaalia.

5 Keksinnön mukaisesti valmistettujen, parenteraalises-
tisesti annettavien varjoaineiden sisältämällä ferromag-
neettisilla hiukkasilla on edullisesti suurin piirtein
yhtenäinen hiukkaskoko, jotta saavutettaisiin yhtenäinen
kontrasti vastaavilla kudosalueilla. Hiukkasläpimitta on
10 yleensä 0,002 - 50 μm parenteraalista antoa varten, ja
läpimitan keskihajonta alle 10 % on erityisen edullinen.
Suoraan ruoansulatuskanavaan tapahtuvaa antoa varten
hiukkaskoko ei saisi olla niin pieni, että se mahdolli-
sesti johtaisi hiukkasten imeytymiseen kanavasta.

15 Diagnoosissa, jossa käytetään NMR-kuvia, voi muo-
dostettava NMR-kuva perustua vierekkäisten kudosten eri-
laisiin T_2 -arvoihin. Lyhentämällä T_2 :a kudoksessa on mah-
dollista saada aikaan kontrastin parantuminen.

 Varjoaineessa olevan ferromagneettisen materiaalin
20 hiukkasmuoto tekee mahdolliseksi aineen kudosspesifisyy-
den. Erityisen hyvin soveltuvia laskimonsisäisesti annet-
tavien hiukkasten kohde-eliminä ovat maksa ja perna reti-
kuloendoteelijärjestelmän ansiosta. Parenteraalisesti an-
nettavien hiukkasten eräs mahdollinen käyttökohde on pri-
25 maarisen syövän ja metastaasien diagnostisointi maksasta.

 Maksalla on vatsa-alueen elimistä lyhimmät relax-
saatioajat (T_1 ja todennäköisesti myös T_2). Kasvainten
relaksaatioajat (T_1 ja T_2) ovat yleensä pitempiä kuin
normaalikudosten. Maksasoluista on 40 % retikuloendotee-
30 lisoluja. Laskimonsisäisesti ruiskutetut hiukkaset jakau-
tavat makroskooppisesti tarkasteltuina yhtenäisesti nor-
maaliin maksaan. Sekä hepatoomissa että metastaaseissa
hiukkasten vastaanottokyky on alentunut tai sitä ei ole
ollenkaan. Laskimonsisäisesti annetut ferromagneettiset
35 hiukkaset voivat siten selektiivisesti lyhentää T_2 :a nor-

maalissa maksakudoksessa. T_2 on normaalissa maksakudoksessa lyhyempi kuin T_2 maksasyöpäkudoksessa ja ympäröivissä kudoksissa, ja siten T_2 :n lyhentäminen edelleen normaalissa maksakudoksessa käyttämällä ferromagneettisia varjoaineita parantaa kontrastia normaalin maksakudoksen ja maksasyöpäkudoksen välillä tehden diagnostisoinnin yksinkertaisemmaksi. Kyky diagnostisoida maksassa olevia etäispesäkkeitä varhaisessa vaiheessa on hyvin tärkeää, koska yli 30 % kaikista syöpämuodoista johtaa maksaetäispesäkkeisiin ja on usein mahdollista diagnostisoida maksassa olevat metastaasit, ennen kuin primaarikasvain pystytään havaitsemaan.

Ferromagneettisten varjoaineiden käytön vaikutusta maksasyöpien diagnostisoinnissa NMR-kuvauksella valaistaan kaavamaisesti liitteenä olevissa kuvissa, joista:

Kuvio 1 on kaavamainen esitys T_2 :sta riippuvasta kuvasta, joka on otettu metastaasin sisältämän maksan läpi kulkevasta elimistön poikittaisleikkauksesta;

Kuvio 2 on kaavamainen esitys T_2 :sta riippuvasta kuvasta, joka on otettu kuvan 1 mukaisesta poikittaisleikkauksesta sen jälkeen, kun maksaan on viety ferromagneettista varjoainetta;

Kuvio 3 on kaavamainen esitys T_2 :sta riippuvasta kuvasta, joka on otettu virtsarakon läpi kulkevasta elimistön poikkileikkauksesta sen jälkeen, kun virtsarakkoon on viety katetrin kautta ferromagneettista varjoainetta; ja

Kuvio 4 on kaavamainen esitys T_2 :sta riippuvasta kuvasta, joka on otettu kaniinin vatsan poikittaisleikkauksesta.

Kuviot 1 ja 2 esittävät vatsan 1, käsivarsien 4 ja maksan 2 kautta kulkevaa poikkileikkausta. Kuvioista näkyy, että maksa sisältää etäispesäkkeen 3. Elimistön alueiden varjostus vastaa paikallista T_2 -arvoa, jolloin kevyt varjostus tarkoittaa T_2 :a noin 70 ms, keskinkertai-

nen varjostus noin 40 ms:a ja voimakas varjostus noin 10 ms:a.

5 Kuviossa 3 ferromagneettisia hiukkasia sisältämä virtsa 5 tekee mahdolliseksi virtsarakon seinämän ääri- viivojen 6 visualisoinnin ja kasvaimen 7 läsnäolon ha- vaitsemisen.

10 Kuvio 4 on kaavamainen esitys NMR-kuvasta, joka on tuotettu pyyhkäisemällä kaniinin vatsan läpi käyttämällä spinkaikutekniikkaa (toisto aika 500 ms (TR), kaiku aika 50 ms (TE)), kun kaniinille on annettu suun kautta 100 µmol Fe/kg jäljempänä olevan esimerkin 6 mukaista suspen- siota. Pyyhkäisykuva tekee mahdolliseksi vasta-ainetta sisältävien suurten suolien 9 ja pienten suolien 10 sel- vän erottumisen lihaksesta 8.

15 Ferromagneettisten hiukkasten avulla saavutettava kontrastin parantuminen riippuu kyseessä olevan NMR-kuvan mittauksessa käytettävistä pulssisekvensseistä ja pulssi- parametreista. T_2 -kuvaan kohdistuvan vaikutuksensa lisäk- si voivat ferromagneettiset hiukkaset muuttaa protoni-in- tensiteettikuvaa. Protoni-intensiteetti on sekä T_1 :n että T_2 :n funktio:

$$I = Hf(v)\exp(-a/T_2)(1-\exp(-b/T_1))$$

25 jossa H on paikallinen vetypitoisuus, a ja b ovat NMR- laitteen parametreja ja f(v) on funktio nopeudesta, jolla vety-ytimet liikkuvat kuvattavan alueen läpi, sekä liik- kuvien ytimien osuudesta ytimien kokonaismäärästä. Siten T_1 :n piteneminen alentaa intensiteettiä, kun taas T_2 :n piteneminen lisää intensiteettiä. Selektiivinen T_2 -aine muuttaa siis protoni-intensiteettiä.

30 Keksintöä kuvataan tarkemmin seuraavien esimerk- kien avulla:

Esimerkit 1 - 6

Ferromagneettisten dispersioiden valmistus

35 Varjoaineiden valmistuksessa käytettiin ferromag- neettisia polymeerihiuksia, jotka valmistettiin J.

Ugelstadin et al. (WO 83/03920) menetelmän mukaisesti ja joilla on jäljempänä taulukossa I esitettävät ominaisuudet.

Yleinen menettelytapa esimerkkejä 1 - 3 varten

5 Ferromagneettiset hiukkaset suspendoitiin 8 ml:aan steriiliä vettä (0,5 % polysorbaatti 80:ä). Suspensio äänikäsiteltiin ja sitä ravisteltiin 30 min, sentrifugoitiin ja hiukkaset suspendoitiin uudelleen liuokseen, joka sisälsi naudan seerumialbumiinia (200 mg) steriilissä vedessä (8 ml). Kun suspensiota oli ravisteltu 3 tuntia, se 10 sentrifugoitiin, hiukkaset pestiin 0,9-%:isella NaCl-liuoksella (0,1 % polysorbaatti 80:ä) (2 x 8 ml) ja suspendoitiin takaisin samaan suspensioväliaineeseen siten, että lopputilavuudeksi saatiin 10 ml.

15 Esimerkki 1

57,7 mg hiukkasia (tyyppi 1) (19,4 % Fe)

10 mg polysorbaatti 80:ä

täyt. 10 ml:ksi 0,9-%:isella NaCl:n vesiliuoksella

Esimerkki 2

20 1 000 mg hiukkasia (tyyppi 2) (30,2 % Fe)

20 mg polysorbaatti 80:ä

täyt. 20 ml:ksi 0,9-%:isella NaCl:n vesiliuoksella

Esimerkki 3

1000 mg hiukkasia (tyyppi 3) (29,2 % Fe)

25 20 mg polysorbaatti 80:ä

täyt. 20 ml:ksi 0,9-%:isella NaCl:n vesiliuoksella.

Yleinen menettelytapa esimerkkejä 4 ja 5 varten

Ferromagneettiset hiukkaset suspendoitiin

0,9-%:iseen NaCl-liuokseen (0,3 % polysorbaatti 80:ä)

30 lopputilavuudeksi 10 ml. Suspensiot äänikäsiteltiin ja niitä ravisteltiin 10 min.

Esimerkki 4

765 mg hiukkasia (tyyppi 3) (29,2 % Fe)

30 mg polysorbaatti 80:ä

35 täyt. 10 ml:ksi 0,9-%:isella NaCl:n vesiliuoksella

Esimerkki 5

740 mg hiukkasia (tyyppi 2) (30,2 % Fe)

30 mg polysorbaatti 80:ä

täyt. 10 ml:ksi 0,9-%:isella NaCl:n vesiliuoksella

5

Esimerkki 6

(Suspensio annettavaksi suoraan ruoansulatuskana-
vaan tai virtsarakkoon.)

10 Karboksimetyyliselluloosa (92 mg) ja polysorbaatti
80 (4 mg) lisättiin veteen (3,5 ml). Seos lämmitettiin
sekoittaen 80 °C:seen.

Jäähdytyksen jälkeen lisättiin 1187 mg hiukkasia
(tyyppi 3), ja suspensio homogenisoitiin ravistamalla
voimakkaasti ja äänikäsittelemällä 15 min.

Taulukko I

	Hiukkastyyppi	% Fe	um läpimitta	Hiukkasten pinta
5	1	19,4	3	huokoinen
	2	30,2	1,5	huokoinen
	3	29,2	3	huokoinen
	4	5,0	0,8	hydrofiilinen
	5	2,0	0,8	hydrofiilinen
10	6	0,5	0,8	hydrofiilinen
	7	0,5	0,8	hydrofiilinen
	8	0,5	0,8	hydrofiilinen
	9	32,9	1,5	huokoinen
	10	18,2	1,5	huokoinen
15	11	9,4	1,5	huokoinen
	12	12,0	2,5	hydrofiilinen
	13	30,0	3,0	hydrofiilinen
	14	7,2	15,0	PFA +
	15	9,8*	3,0	huokoinen
20	16	6,8++	3,0	huokoinen

* 9,8 % Fe, 4,3 % Mn

++ 6,8 % Fe, 1,7 % Mn

+ polyfurfuryylialkoholikerros

25

KoetuloksetT₁:n ja T₂:n mittaukset

NMR-mittaukset tehtiin protoneille taajuudella 10,7 MHz pulssisekvensseillä (90° - τ - 90°) ja (90 - τ - 180° - τ) T₁:n ja vastaavasti T₂:n ollessa kyseessä.

30

Lämpötila oli 37 °C.

Ferromagneettiset suspensiot homogenisoitiin äänikäsitteilyllä ja voimakkaalla ravistelulla.

Kokeet in vitro tehtiin seuraavissa liuoksissa:

	1) Tislattu ja ionivaihdettu vesi	68,76 til-%
	Glyseroli	31,75 til-%
	2) Tislattu ja ionivaihdettu vesi	53 paino-%
	Glyseroli	31,4 paino-%
5	Gelatiini	15,0 paino-%
	3) Ihmisen plasma	
	4) Heparinisoitu veri (kaniini)	67,0 til-%
	Homogenisoitu maksa (kaniini)	33,3 til-%
	5) 1 % metyyliiselluloosaa vedessä.	

10 Kokeet in vivo tehtiin seuraavasti:

Hiukkassuspensioita injektoitiin laskimonsisäisesti rottiin ja kaniineihin. Verinäytteitä otettiin eri ajanhetkillä. Eläimet tapettiin ja mitattiin relaksaatioajat (T_1 ja T_2) sekä verinäytteissä että eri elimissä.

15 Mittaukset in vitro

Relaksaatioajat (T_1 ja T_2) on mitattu erilaisissa näytteissä käyttäen erilaisia ferromagneettisia monodispersoituja polymeerihiukkasia ja erilaisia kaupallisesti saatavissa olevia ferromagneettisia hiukkasia, ja tulokset on koottu seuraaviin taulukoihin II, III ja IV. Hiukkasten sisältämiin ferromagneettisiin materiaaleihin kuuluu erilaisia magneettisia rautaoksideoja ja muita ferriittejä. Hiukkaskoko vaihteli 0,01 μm :stä 100 μm :iin ja hiukkasten ferromagneettisen aineen pitoisuus 0,5:stä 100 %:iin.

Taulukko II

	Esimerk- ki nro	Hiukkas- tyyppi	Hiukkasen läpimitta (,u)	Fe-määrä hiukkasessa (%)	Fe-pitoisuus näytteessä (mmol/kg)
5	7	4	0,8	5,0	0,1
	8	4	0,8	5,0	0,2
	9	5	0,8	2,0	0,1
10	10	5	0,8	2,0	0,2
	11	6	0,8	0,5	0,1
	12	7	0,8	0,5	0,1
	13	8	0,8	0,5	0,1
	14	9	1,5	32,9	0,1
15	15	2	1,5	30,2	0,1
	16	10	1,5	18,2	0,1
	17	11	1,5	9,4	0,1
	18	12	2,5	12	0,1
	19	13	3	30,0	0,1
20	20	3	3	29,2	0,1
	21	1	3	19,4	0,1
	22	14*	15	4,7	0,1
	23	16	0,8	0	0
25					

* Polyfurfuryylialkoholikerros

Taulukko II (jatkuu)

Näytteet

	Esi- merkki nro	Tislattu vesi/ glyseroli		Ihmisen plasma		Homogenisoitu maksan ja veri		Tislattu vesi/ glyseroli/ gelatiini	
		T ₁ (ms)	T ₂ (ms)	T ₁ (ms)	T ₂ (ms)	T ₁ (ms)	T ₂ (ms)	T ₁ (ms)	T ₂ (ms)
5	7	1033	77	881	77	244	37		
10	8					178	23		
	9	1054	128	942	92	407	56		
	10					318	38		
	11	602	50	481	42	187	30		
15	12	651	56	499	55				
	13	774	69	573	68				
	14	1685	169	1646	180				
	15							812	46
	16	1631	187	1507	139				
20	17	1679	548	1727	387				
	18							835	60
	19							866	49
	20	1687	176	1618	173				
25	21							870	60
	22							680	182
	23	1706	658	1693	325				
	Ver- tailu	1710	800	1660	430	474	106	890	300

Taulukko III

Esimerkki nro	Hiukkas- tyyppi	% Fe	% Mn	[Fe] mmol/kg	[Mn] mmol/kg
24	15	9,8	4,3	0,1	0,045
25	16	6,8	1,7	0,1	0,025
26	Magnetiitti*	72,4	0	0,1	0,0

5

Taulukko III (jatkuu)

Esimerkki nro	Näyte			
	1% metyyliselluloosa		tislattu vesi/ glyseroli/gelatiini	
	T ₁ (ms)	T ₂ (ms)	T ₁ (ms)	T ₂ (ms)
24	1500	120	722	161
25	1590	289	523	214
26	2753	213	845	191
Referenssi**	3109	484	920	328

10

15

20

25

*Musta rauta (II, III) oksidi, magneettisesti puhdas (Koch Light 3991-00, hiukkaskoko 10 - 100 μm)

** Referenssiarvot vertailunäytteelle, johon ei ole lisätty varjoainetta.

Kuten seuraavasta taulukosta IV ilmenee, oli ferromagneettisten hiukkasten vaikutus spin-hilarelaksationopeuksiin (R_1 , joka on $1/T_1$) vaatimaton, kun taas spin-spinrelaksationopeudet ($R_2 = 1/T_2$) kasvoivat moninkertaisiksi. Kiintoisa havainto on suhteen R_{2R}/R_{1R} ($T_2^{\circ}T_1/T_2T_1^{\circ}$, jossa T_1° ja T_2° ovat relaksaatioajat varjoaineen poissa ollessa) suhteellisen vakiona pysyvä arvo kussakin liuoksessa. Jos magneettinen materiaali on konsentroitunut harvoin hiukkasiin, kuten tyypissä 2, ei ole havaittu min-käänlaista vaikutusta R_1 :een, kun taas R_2 kasvaa 4 - 5-kertaiseksi. Kun magneettiset materiaalit ovat jakautuneina homogeenisemmin näytteeseen, kuten tyypissä 6, havaitaan vaikutukset sekä R_1 :een että R_2 :een.

Hienoksi jauhetuilla magneettisilla materiaaleilla on myös huomattava vaikutus T_2 :een, kun taas monodispersoidut, mangaaniferriittiä sisältävät polymeerihiukkaset näyttävät nostavan sekä R_1 :ä että R_2 :a (edellä oleva taulukko III).

Seuraavat taulukossa IV esitetään suhteelliset relaksationopeudet (R_{1R} ja R_{2R}) ja suhde R_{2R}/R_{1R} erilaisissa monodispersoitujen ferromagneettisten polymeerihiukkasten suspensioissa. Pitoisuus on 0,1 mmol Fe/kg (5,6 ppm).

Taulukko IV

			Näyte			
			Vesi/glyseroli			
5	Esimerk- ki nro	Hiukkas- tyyppi	Suhteellinen Fe- määrä/hiukkanen ¹	R _{1R}	R _{2R}	R _{2R} /R _{1R}
	27	3	788	1,01	4,54	4,50
	28	9	111	1,01	4,73	4,68
10	29	10	61,4	1,04	4,28	4,12
	30	4	2,6	1,65	10,39	6,30
	31	5	1,0	1,62	6,25	3,86
	32	8	0,26	2,21	11,59	5,24
	33	7	0,26	2,63	14,29	5,43
15	34	6	0,26	2,84	16,00	5,63

			Näyte			
			Plasma			
20	Esimerk- ki nro	Hiukkas- tyyppi	Suhteellinen Fe- määrä/hiukkanen ¹	R _{1R}	R _{2R}	R _{2R} /R _{1R}
	27	3	788	1,02	2,49	2,43
25	28	19	111	1,01	2,39	2,37
	29	20	61,4	1,10	3,09	2,81
	30	4	2,6	1,88	5,58	2,97
	31	5	1,0	1,77	4,67	2,65
	32	8	0,26	2,90	6,32	2,18
30	33	7	0,26	3,33	7,81	2,35
	34	6	0,26	3,45	10,24	2,96

1) Suhteellinen Fe-määrä/hiukkanen = $d^3 \cdot x$
jossa d = hiukkasen läpimitta (μm)
 x = % Fe hiukkasessa

Siten paramagneettiset yhdisteet ovat erityisen tehokkaita spin-hilarelaksaatioaikojen (T_1) lyhentämisessä, kun taas havaintojen mukaan ferromagneettiset hiukkaset ovat erityisen tehokkaita spin-spinrelaksaatioaikojen (T_2) lyhentämisessä.

Havaittu R_2 :n kasvu ferromagneettisten hiukkasten läsnä ollessa voitaisiin selittää seuraavasti:

T_2 -relaksaatioprosessissa ei siirry energiaa ytimistä hilaan. Virittyneissä ja perusspintiloissa olevat ytimet vaihtavat energiaa keskenään ja niissä tapahtuu spin-siirtymä, jossa koko systeemin nettospintila säilyy muuttomattomana: yhden ytimen abrosboidessa energiaa sen kanssa vuorovaikutuksessa oleva ydin vapauttaa sitä.

T_2 -relaksaatioajan määrää poikittaismagnetisoitumisen häviämisenopeus. Poikittaismagnetisoituminen alenee, koska ydinmagneettisen momentit joutuvat pois faasista. Tämä koherenssin menetys aiheutuu siitä, että kaikkien ydinmagneettisten momenttien presessiotaajuus ei ole täsmälleen sama (erilaisten paikallisten magneettikenttien takia). Havaittava vaimenemisnopeus (R_2^*) on tulos todellisesta spin-spinrelaksaationopeudesta (R_2) ja vaikutuksesta, joka aiheutuu magneettikentän paikallisesta epähomogeenisuudesta ($R_{2inh.}$).

$$(R_2^*) = (R_2) + (R_{2inh.})$$

Havaittava T_2^* (ts. $1/R_2^*$) on systeemissä aina pienempi kuin todellinen arvo ytimien erilaisten magneettisten ympäristöjen takia. Ferromagneettisen materiaalin tuominen systeemiin lisää paikallisia magneettikenttäepähomogeenisuuksia ja johtaa havaitun T_2^* :n lyhenemiseen.

Mittaukset in vivo

Monodispergoitujen ferromagneettisten polymeerihiuksien erilaisia suspensioita on annettu laskimonsisäisesti rotille ja kaniineille ja mitattu relaksaatioajat (T_1 ja T_2) eri elimissä (post mortem). Havaitut relaksaatio-

on koottu jäljempänä oleviin taulukoihin V ja VI. Ottamalla verinäytteitä ja mittaamalla relaksaatioajat eri ajanhetkillä voitiin seurata hiukkasten eliminoitumista verenkierrosta. Hiukkaset poistuivat verestä äärimmäisen nopeasti: 5 viiden minuutin kuluttua laskimonsisäisestä antamisesta hiukkaset olivat poistuneet suurin piirtein kokonaan verenkierrosta.

Kuten taulukosta VI ilmenee, lyhenivät relaksaatioajat (T_2) maksassa, pernassa ja keuhkoissa voimakkaasti. 10 Myös relaksaatioaika (T_2) munuaisissa lyheni.

Ferromagneettisten hiukkasten erilaisten määrien vaikutusta relaksaatioaikoihin (T_1 ja T_2) on tutkittu. Havaittiin, että havaittujen relaksaatioaikojen lyhenemisnopeus aleni ferromagneettisten hiukkasten pitoisuuksien 15 kasvaessa.

Taulukko V

Relaksaatioajat (T_1 ja T_2) maksassa (rotta) 1 tunnin kuluttua ferromagneettisten hiukkasten laskimonsisäisestä injektioinnista

Esimerkki nro	Hiukkas- tyyppi	mmol Fe/kehon painokilo	T_1 ms	T_2 ms
35	1	0,1	219	22
36	1	0,1	212	23
Referenssiarvot**			216	39

** vertailu - ei varjoainetta

Taulukko VI

Relaksaatioajat (T_1 ja T_2) verinäytteissä ja eri elimissä ferromagneettisten hiukkasten laskimonsisäisen injektioinnin jälkeen

5	Veri				Sappi	
	Esimerkki nro	Injektointi	T_1 (ms)	T_2 (ms)	T_1 (ms)	T_2 (ms)
10	Vertailu	ei	1024	350 3200	2500-	
15	37	Hiukkan* tyyppi 3 0,5mmol/kg	925 (5)	98 (5)	2787 (0-60)	-
20	38	Hiukkan** tyyppi 3 0,5mmol/kg	1047 (60)	218 (60)	3632 (60-120)	-
25	39	Hiukkan*** tyyppi 2 0,5mmol/kg	878 (5)	149 (5)	-	-
30	40	Hiukkan* tyyppi 2 0,5mmol/kg	1020 (60)	227 (60)	-	-
	39	Hiukkan*** tyyppi 2 0,5mmol/kg	-	78 (5)	-	-
	40	Hiukkan* tyyppi 2 0,5mmol/kg	995 (5)	180 (5)	-	-

30 Sulussa olevat luvut ovat injektioinnista kuluneita minuutteja

* Tapettiin 2 tunnin kuluttua

** Tapettiin 90 min:n kuluttua

*** Tapettiin 30 min:n kuluttua

Taulukko VI (jatkuu)

	Maksa/0,9 % NaCl (1:2)		Keuhkot/0,9 % NaCl (1:2)		
	Esimerkki nro	T ₁ (ms)	T ₂ (ms)	T ₁ (ms)	T ₂ (ms)
5	Vertailu	578	179	1039	240
10	37	369	5	613	11
	38	539	15	687	7
	39	167	3	345	6
15	40	284	5	308	6

Talukko VI (jatkuu)

	munuaiset 0,9 % NaCl (1:2)		Perna/0,9 % NaCl (1:2)		
	Esimerkki nro	T ₁ (ms)	T ₂ (ms)	T ₁ (ms)	T ₂ (ms)
20	Vertailu	1224	206	-	-
25	37	768	34	672	6
	38	776	52	379	7
30	39	645	43	-	-
	40	672	39	287	4

Toksisuusa) Laskimonsisäinen antaminen

5 Magneettisesti reagoivia mikrohelmiä on käytetty kasvainten vastaisten aineiden ja muiden lääkkeiden biofysikaaliseen kohdistamiseen. Laskimonsisäisesti annettujen mikrohelmien toksisuutta on tutkittu perusteellisesti. Hiukkasten toksisuuden on havaittu riippuvan sekä hiukkasten koosta että niiden muodosta.

10 Tällä hetkellä ei ole olemassa julkaistuja tutkimuksia, jotka kuvaisivat laskimonsisäisesti annetun magnetiitin toksisuutta. Intensiivisiä ihmistutkimuksia on kuitenkin tehty sisäänhengitetyn materiaalin vaikutusten arvioimiseksi. Nämä tutkimukset osoittivat, että kohtalaisen suurten rautaoksidimäärien saaminen hengityksen kautta ei aiheuta merkittävää tulehtumista, fibroosia eikä keuhkojen toiminnan muuttumista. Näiden tulosten perusteella voi olla kohtuullista otaksua, että myös laskimonsisäisesti annetut ferromagneettiset yhdisteet aiheuttavat hyvin vähäisessä määrin tulehdusreaktioita.

20 On tutkittu laskimonsisäisesti annettujen monodispergoitujen ferromagneettisten hiukkasten akuuttia toksisuutta. Kuolleisuusluvut on koottu seuraavaan taulukkoon VII, kun taas taulukossa VIII esitetään erilaisten laskimonsisäisesti annettujen hiukkasten LD₅₀ (suunnilleen) hiirillä.

25 Kaikki injektoinnit tehtiin kannan NMRI uroshierille, jotka painoivat 18 - 22 g ja jotka toimitti Bomholtgaard, Tanska. Injektointikohta: häntälaskimo. Injektointinopeus: 0,20 ml/10 s. Havaintojen teko aika: yksi viikko.

30 Hiukkasliuoksia äänikäsiteltiin (15 min) ennen injektointia.

Taulukko VII

Erilaisten ferromagneettisten monodispergoitujen poly-
meerihiukkasten toksisuus hiirillä

	Esi- merkki nro	Hiukkastyyppi (ja antotapa)	% Fe hiukka- sessa	Annos (mg hiuk- kasia/pai- nokilo)	Kuolleisuus
5					
10	41	4 (i.v.)	5	800 1000	0 neljästä 0 neljästä
	42	5 (i.v.)	2	1230 1640 2050	0 neljästä 0 neljästä 0 neljästä
15	43	6 (i.v.)	0,5	600 750 900 1200 1500	0 kahdesta 0 kahdesta 0 kahdesta 0 kahdesta 7 seitsemästä
20	44	7 (i.v.)	0,5	360 540 720 810 900	3 viidestä 2 viidestä 5 viidestä 5 viidestä 5 viidestä
25	45	2 (i.v.)	30,2	500 750 1000 1250	0 viidestä 1 viidestä 2 kahdesta 2 kahdesta
30	46	3 (i.v.)	29,2	750 1250 1500 2000 2250 3000	0 kahdesta 0 neljästä 0 neljästä 4 neljästä 3 neljästä 2 kahdesta
35	47	3 (oraalisesti)	29,2	7810	0 viidestä

Taulukko VIII

	Esi- merkki nro	Hiukkas- tyyppi	Hiukkasen läpimitta µm	% Fe hiuk- kasessa	LD ₅₀ (suunnilleen) (mg hiuk- kasia/painokilo)
5	48	4	0,8	5	> 1000
	49	5	0,8	2	> 2050
	50	6	0,8	0,5	1350
	51	7	0,8	0,5	450
	52	2	1,5	30,2	750-1000
10	53	3	3,0	29,2	1500-2000

		LD ₅₀ (suunnilleen) (mg Fe/painokilo)	LD ₅₀ /ED (suunnilleen)
15	48	> 50	> 360
	49	> 41	> 290
	50	6,8	49
	51	2,3	16
	52	230-300	1700-2100
20	53	440-580	3100-4100

25 Hiukkastyypille 2 saadut erityisen alhaiset LD₅₀-arvot verrattuna tyyppiin 3 ja tyyppiin 7 alhaiset arvot verrattuna tyyppeihin 4, 5 ja 6 voivat aiheutua hiukkasten hiutaloitumisesta.

30 Jos maksan retikuloendoteelisolut ottaisivat vastaan kaikki hiukkaset, riittäisi noin 0,14 mg Fe/painokilo saamaan aikaan kontrastin paranemisen. (0,1 mmol Fe/kg maksaa, ja maksan osuus on noin 2,6 % eläimen koko painosta.) Kuten taulukosta VIII ilmenee, on "turvallisuustekijä" $\frac{LD_{50}}{ED}$ (suunnilleen)/vaikuttava annos (ED)₇ suuri.

b) Oraalinen anto

35 Suun kautta annettujen hiukasmaisten ferromagneettisten aineiden, kuten magnetiitin ja ferriittien, toksisia ominaisuuksia on kuvattu. Mitään biokemiallisten ja fysio-

logisten parametrien muutoksia ei havaittu, kun annettiin yksittäisannos 2,0 g/kg tai useana annoksena 20 g/kg rotille ja hiirille.

5 On tutkittu suun kautta annettujen monodispersoitujen ja ferromagneettisten hiukkasten (tyyppi 3) toksisuutta. Mitään merkkejä myrkkyyvaikutuksesta ei havaittu, kun oli annettu 7,8 g hiukkasia/painokilo.

92,4 % annoksesta saatiin talteen ulosteista 24 tunnin kuluessa annosta.

10 Materiaali on veteen liukenematonta eikä siksi imeydy ruoansulatuskanavasta. (Tyypin 3 polymeerimatriisi ei ole biologisesti hajoava.)

Keksintöä valaistaan myös seuraavien lisäesimerkkien avulla.

Taulukko IX (in vitro -testin tulokset)

Esimerkki nro	Hiukkastyypin nro	Hiukkasten läpimitta (μm)	Fe-määrä hiukassa (%)
5	54	17 1)	3,0
	55	18 2)	0,3 - 4,0
	56	19 3)	0,3 - 4,0
	57	20 4)	0,6
	58	21 5)	0,3 - 0,6
	59	22 6)	0,5 - 2,0
	10	60	23 7)

Taulukko IX (jatkuu)

Esimerkki nro	Fe-pitoisuus näytteessä* (mmol/kg)	T ₁ (ms)	T ₂ (ms)
15	54	0,25	291
	55	0,25	1236
	56	0,25	107
	57	0,25	1356
	58	0,25	1225
	59	0,25	363
	20	60	723
	Vertailu	1332	445

1) Monodispersoidut hiukkaset, jotka valmistettiin J. Ugelstadin et al. (Wo 83/03920) menetelmällä. Tiheys $1,07 \text{ g cm}^{-3}$.

25 2) Estrapor[®] LMP 233, Rhône-Poulenc, Pariisi, Ranska.

3) Estrapor[®] LMP 247, Rhône-Poulenc, Pariisi, Ranska

4) $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (Bayferrox 8060, Bayer AG, Leverkusen, Saksan Liittotasavalta

30 5) Musta rautaoksidi (11557, D.F. Anstead Ltd. Billericay, Essex, Englanti)

6) Biomag M4200 (Advanced Magnetics Inc., Cambridge, Massachusetts, U.S.A.)

7) Ferrofluid (Ferrofluid Co., U.S.A.)

* Tislattu ja ionivaihdettu vesi 77,3 paino-%

35 Glyseroli 13,6 paino-%

Gelatiini 9,1 paino-%

Esimerkki 61 (Oraalisesti annettavan suspension valmistus)

	Hiukkasia (tyyppi 9)	3,04 g
	Natriumpolymetafosfaattia	18,25 g
5	Natriumsakariinia	1,0 g
	Metyyliparahydroksibentsoaattia	0,75 g
	Kaliumsorbaattia	1,0 g
	Ksantaanikumia	3,0 g
	Piparminttuöljyä	2,0 g
10	Vettä	971,0 g

Metyyliparahydroksibentsoaatti liuotettiin kuumaan veteen (90°C). Liuos jäädytettiin, lisättiin ksantaanikumi ja seosta sekoitettiin voimakkaasti 1 tunti. Joukkoon liuotettiin natriumpolymetafosfaatti, natriumsakariini, kaliumsorbaatti ja piparminttuöljy ja lopuksi suspendoitiin hiukkaset. Suspensio pakattiin 1 litran pulloon. Suspensio sisälsi 1,0 mg Fe/g.

Esimerkki 62 (Oraaliseen käyttöön tarkoitetun suspension valmistus)

20	Magnesiumalumiinisilikaattia (esimerkiksi Veegum)	5,0 g
	Nestemäistä sorbitolia (70 %)	478,0 g
	Sitruunahappoa	1,0 g
	Metyyliparahydroksibentsoaattia	0,8 g
	Appelsiiniesanssia	0,2 g
25	Etanolia	15,0 g
	Hiukkasia (tyyppi 21)	1,32 g
	Vettä	498,6 g

Veegum dispergoitiin veteen 60°C:ssa sekoittamalla 1 tunti suurella nopeudella. Nestemäinen sorbitoli ja sitruunahappo lisättiin jatkuvasti sekoittaen. Lisättiin liuos, joka sisälsi metyyli parahydroksibentsoatin ja appelsiiniesanssin etanolissa, ja suspendoitiin hiukkaset sekoittaen. Suspensio pakattiin 1 litran pulloon. Suspensio sisälsi 1 mg Fe/g.

Esimerkki 63 (Oraaliseen käyttöön tarkoitetun

suspension valmistus)

	Hiukkasia (tyyppi 8)	10 g
	Hydroksietyyliselluloosaa	10,0 g
5	Metyyliparahydroksibentsoaattia	0,8 g
	Propyyli parahydroksibentsoaattia	0,2 g
	Etanolia	10,0 g
	Natriumsakariinia	1,0 g
	Appelsiiniesanssia	0,3 g
10	Aprikoosiesanssia	0,7 g
	Vettä	967,0 g

Hydroksietyyliselluloosa dispergoitiin veteen sekoittaen 2 tuntia. Natriumsakariini ja esanssien ja metyyli- ja propyyli parahydroksibentsoaattien liuos etanolissa lisättiin hitaasti. Hiukkaset dispergoitiin liuokseen voimakkaasti sekoittaen. Suspensio sisälsi 0,05 mg Fe/g.

Esimerkki 64 (Rektaalisesti annettavan suspension (peräruiske) valmistus)

Metyyliparahydroksibentsoaatti (85 mg) ja propyyli parahydroksibentsoaatti (15 mg) liuotettiin veteen (100 ml) 90°C:ssa. Jäähdytettiin 30°C:seen, lisättiin metyyli selluloosa (2 g) ja sekoitettiin 2 tuntia. Joukkoon suspendoitiin 1,0 g hiukkasia (tyyppi 5). Suspensio pakattiin 100 ml:n putkeen. Suspensio sisälsi 0,2 mg Fe/ml.

Esimerkki 65 (Sylkirauhaskuvauksessa, virtsarakon NMR-tutkimuksissa ja/tai kohdun ja munajohtimien kuvauksessa käytettäväksi tarkoitetun suspension valmistus)

	Hiukkasia (tyyppi 17)	1,0 g
	Polyoksietyleeni-polyoksipropyleenikopolymeeriä (esimerkiksi Pluronic F68)	0,5 g
30	Natriumkloridia	0,9 g
	Steriiliä vettä	tätetään 100 ml:ksi

Hiukkaset suspendoitiin aseptisesti steriiliin seokseen, joka sisälsi natriumkloridi ja Pluronici vedessä. Suspensio pakattiin kerta-annossäiliöihin. Suspensio sisälsi 52 mg Fe/l.

Esimerkki 66 (Oraalisesti annettavan päällystettyjen hiukkasten suspension valmistus)

Liuos A

Metakrylaattiesterikopolymeerejä

5	(esimerkiksi Eudragit RS)	50 g
	Talkkia	50 g
	Isopropanolia	900 g

Talkki suspendoitiin liuokseen, joka sisälsi Eudragit RS:n isopropanolissa, sekoittaen.

10 100 g liuosta A suihkutettiin 500 g:lle magnetiittihiukkasia (esimerkki 26). Hiukkasia pyöritettiin leijukerroslaitteessa. Syötettävän ilman määrä ja lämpötila säädettiin sellaisiksi, että hiukkaset pysyivät lämpötilassa 30°C ja niitä suihkutettiin jatkuvasti. Suihkutusta jatkettiin, kunnes saatiin riittävä päällyste. Hiukkasia kuivattiin yön yli ympäristön lämpötilassa ja ne pakattiin kerta-annossäiliöihin.

Liuos B

	Selluloosakumia	1,0 g
20	Natriumkloridia	0,5 g
	Metyyliparahydroksibentsoaattia	0,1 g
	Etanolia	2,0 g
	Piparminttuöljyä	0,5 g
	Vettä	96,0 g

25 Selluloosakumi, natriumkloridi, piparminttuöljy ja metyyli parahydroksibentsoaatin etanoliliuos liuotettiin veteen.

Lopullisen suspension valmistus:

30 100 ml liuosta B lisättiin 2,8 g:aan päällystettyjä hiukkasia ja säiliötä ravisteltiin, kunnes saatiin homogeeninen suspensio. Suspensio sisälsi 20 ml Fe/ml.

Esimerkki 67 (Ruoansulatuskanavassa liukenevalla päällysteellä varustettujen hiukkasten valmistus oraaliin käyttöön)

5 Tämä suspensio valmistettiin esimerkissä 66 kuvatulla tavalla. Eudragit RS:n sijasta käytettiin Eudragit S:ä. Suspendointiliuoksen (liuos B) pH säädettiin arvoon 4 1 N HCl:lla.

Patenttivaatimukset

1. Ferromagneettisten ainehiukkasten käyttö,
t u n n e t t u siitä, että niitä käytetään NMR-varjoai-
5 neen valmistamiseen käytettäväksi ihmisen tai muun eläimen
elimistölle käytettävässä diagnoosimenetelmässä, jossa
muodostetaan T_2 :sta riippuva kuva ja tehdään diagnoosi mai-
nitun kuvan avulla.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen käyttö, t u n -
10 n e t t u siitä, että ferromagneettiset ainehiukkaset on
sisällytetty biologisesti hajoamatonta, biologisesti sie-
dettävissä olevaa polymeeria olevaan ei-ferromagneettiseen
matriisiin tai päällysteeseen tai ne on päällystetty täl-
laisella.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen käyttö,
15 t u n n e t t u siitä, että mainittuja hiukkasia ja vis-
kositeettia parantavaa ainetta ja/tai pinta-aktiivista
ainetta käytetään mainitun varjoaineen valmistukseen.

4. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 3 mukainen
20 käyttö, t u n n e t t u siitä, että ferromagneettiset
ainehiukkaset ovat kooltaan 0,01 - 0,6 μm .

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen käyttö, t u n -
n e t t u siitä, että ferromagneettiset ainehiukkaset
ovat kooltaan 0,01 - 0,02 μm .

6. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 3 mukainen
25 käyttö, t u n n e t t u siitä, että ferromagneettiset
ainehiukkaset ovat kooltaan 0,002 - 50 μm .

7. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 4 - 6 mukainen
käyttö, t u n n e t t u siitä, että käytetään ferromag-
30 neettisen aineen päällystämättömiä hiukkasia.

8. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 3 mukainen
käyttö, t u n n e t t u siitä, että ferromagneettiset
ainehiukkaset ovat magneettisen rautaoksidin hiukkasia.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen käyttö, t u n -
35 n e t t u siitä, että käytetään ferriittihiukkasia.

10. Patenttivaatimuksen 8 mukainen käyttö, t u n -
n e t t u siitä, että käytetään magnetiitti- tai gamma-
Fe₂O₃-hiukkasia.

5 11. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 10 mukai-
nen käyttö, t u n n e t t u siitä, että mainittu aine
valmistetaan muodossa, joka soveltuu parenteraaliseen an-
nosteluun.

10 12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen käyttö,
t u n n e t t u siitä, että valmistetaan kudoksille spe-
sifinen varjoaine.

13. Patenttivaatimuksen 1 mukainen käyttö, t u n -
n e t t u siitä, että hiukkasten suurin läpimitta on 0,1
- 20 µm ja niiden ferromagneettisen aineen pitoisuus on
0,5 - 50 paino-%.

Patentkrav

1. Användning av ferromagnetiska materialpartiklar, k ä n n e t e c k n a d därav, att man använder dem för framställning av ett NMR-kontrastmedel, vilket används i ett diagnosförfarande för ett mänskligt eller icke-mänskligt animalt organism, vid vilket förfarande alstras en T_2 -avhängig bild och ställs en diagnos med hjälp av nämnda bild.
2. Användning enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att de ferromagnetiska materialpartiklarna är inbäddade i eller överdragna med en icke-ferromagnetisk matris av en biologiskt icke-nedbrytbar, biotolerant polymer eller ett liknande överdrag.
3. Användning enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a d därav, att nämnda partiklar och ett viskositetsförbättrande medel och/eller ett ytaktivt medel används för framställning av kontrastmedlet.
4. Användning enligt något av patentkraven 1 - 3, k ä n n e t e c k n a d därav, att de ferromagnetiska materialpartiklarna har en storlek av 0,01 - 0,6 μm .
5. Användning enligt patentkravet 4, k ä n n e t e c k n a d därav, att de ferromagnetiska materialpartiklarna har en storlek av 0,01 - 0,02 μm .
6. Användning enligt något av patentkraven 1 - 3, k ä n n e t e c k n a d därav, att de ferromagnetiska materialpartiklarna har en storlek av 0,002 - 50 μm .
7. Användning enligt något av patentkraven 4 - 6, k ä n n e t e c k n a d därav, att oöverdragna partiklar av ferromagnetiskt material används.
8. Användning enligt något av patentkraven 1 - 3, k ä n n e t e c k n a d därav, att de ferromagnetiska materialpartiklarna är partiklar av magnetisk järnoxid.
9. Användning enligt patentkravet 8, k ä n n e t e c k n a d därav, att ferritpartiklar används.

10. Användning enligt patentkravet 8, k ä n n e -
t e c k n a d därav, att magnetit- eller gamma-Fe₂O₃-
partiklar används.

5 11. Användning enligt något av patentkraven 1 -
10, k ä n n e t e c k n a d därav, att nämnda medel
framställs i formen som lämpar sig för parenteral dose-
ring.

10 12. Användning enligt patentkravet 11, k ä n n e -
t e c k n a d därav, att ett för vävnader specifikt
kontrastmedel framställs.

13. Användning enligt patentkravet 1, k ä n n e -
t e c k n a d därav, att partiklarna har en maximidiame-
ter av 0,1 - 20 µm och ett ferromagnetiskt innehåll av
0,5 - 50 vikt-%.

15

