



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 691 11 719 T3** 2005.02.24

(12) **Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 474 833 B2**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **691 11 719.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP91/00620**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **91 907 163.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 91/15244**

(86) PCT-Anmeldetag: **02.04.1991**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **17.10.1991**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **18.03.1992**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **02.08.1995**

(97) Veröffentlichungstag  
des geänderten Patents beim EPA: **11.08.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **24.02.2005**

(51) Int Cl.7: **A61K 49/00**  
**A61B 8/00**

(30) Unionspriorität:  
**90810262**      **02.04.1990**      **EP**

(73) Patentinhaber:  
**Bracco International B.V., Amsterdam, NL**

(74) Vertreter:  
**Uexküll & Stolberg, 22607 Hamburg**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL, SE**

(72) Erfinder:  
**SCHNEIDER, Michel, CH-1256 Troinex, CH;**  
**BICHON, Daniel, F-34000 Montpellier, FR;**  
**BUSSAT, Philippe, F-74160**  
**Collonges-sous-Saleve, FR; PUGINIER, Jerome,**  
**F-74160 Le Chable-Beaumont, FR; HYBL, Eva,**  
**CH-1203 Geneve, CH**

(54) Bezeichnung: **STABILE MIKROBLASENSUSPENSIONEN ZUR INJEKTION IN LEBEWESEN.**

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

## Beschreibung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft injizierbare Suspensionen von Luft- oder Gas-Mikrobläschen, die durch eine Flüssigkeits-Gas-Grenzschicht begrenzt werden, in einer physiologisch verträglichen, wäßrigen Trägerphase, wobei die Luft- oder Gas-Mikrobläschen nicht in Liposomenvesikel verkapselt sind, geeignet zur Ultraschall-Echographie des Blutstroms oder von Körperhöhlräumen von Lebewesen, wobei die Suspensionen von etwa 0,01 bis etwa 20 Gew.-% gelöste oder dispergierte oberflächeaktive Stoffe enthalten, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der oberflächenaktiven Stoffe ein filmbildendes Phospholipid ist, das in der Suspension zumindest teilweise in lamellarer oder laminarer Form vorliegt, und daß die Suspensionen kein Eisen(III)salz enthalten.

**[0002]** Die Erfindung betrifft auch Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Suspensionen und die Verwendung trockener Zusammensetzungen, die nach Mischen mit einer wäßrigen Trägerflüssigkeit die o.g. sterilen Suspensionen von Mikrobläschen bilden, die danach als Kontrastmittel zur Ultraschall-Echographie und zu weiteren Zwecken verwendbar sind.

**[0003]** Es ist bekannt, daß Mikrokörper, wie Mikrospähren oder Mikrokügelchen aus Luft oder Gas, z.B. Mikrobläschen oder Mikroballons, die in einer Flüssigkeit suspendiert wurden, hervorragend als Ultraschall-Reflektoren zur Echographie zu gebrauchen sind. In dieser Offenbarung bezeichnet der Begriff "Mikrobläschen" insbesondere Luft- oder Gaskügelchen in Suspension in einer Flüssigkeit, die im wesentlichen bei der Einleitung von Luft oder Gas in verteilter Form entsteht, wobei die Flüssigkeit vorzugsweise auch Surfactanten oder Tenside zur Steuerung ihrer Oberflächen-Eigenschaften und der Stabilität der Bläschen enthält. Insbesondere sollte man berücksichtigen, daß das innere Volumen der Mikrobläschen durch die Gas/Flüssigkeits-Grenzphase limitiert wird oder in anderen Worten, daß die Mikrobläschen nur von einer flüchtigen Schicht begrenzt werden, die eine leichte Bindung der Moleküle der Flüssigkeit und des Tensides an die Gas-Flüssigkeits-Grenzphase umfaßt.

**[0004]** Im Gegensatz dazu beschreibt der Begriff "Mikrokapsel" oder "Mikroballon" vorzugsweise Luft- oder Gaskörper mit einer materiellen Begrenzung oder Schicht, die von anderen Molekülen als denen der Flüssigkeit der Suspension gebildet wird, z.B. einer polymeren Membranwand. Sowohl Mikrobläschen als auch Mikroballons können als Ultraschall-Kontrastmittel verwendet werden. Beispielsweise wird die Injektion von Gasmikrobläschen oder Mikroballons (im Bereich von 0,5 bis 10 µm) in einer Trägerflüssigkeit in den Blutstrom von Lebewesen

die Ultraschall-Echographie-Abbildung deutlich verstärken, wodurch die Darstellung der inneren Organe erleichtert wird. Die Darstellung von Gefäßen und inneren Organen kann die medizinische Diagnose wesentlich unterstützen, beispielsweise beim Nachweis von kardiovaskulären und anderen Erkrankungen.

**[0005]** Die Entstehung von Suspensionen aus Mikrobläschen in einem injizierbaren, flüssigen Träger, der zur Echographie geeignet ist, kann auf verschiedene Arten erfolgen. Die DE-A-3 529 195 (Max-Planck-Gesell.) offenbart beispielsweise ein Verfahren zur Herstellung von 0,5 bis 50 µm-Bläschen, bei dem eine wäßrige, emulgierte Mischung, die ein wasserlösliches Polymer, ein Öl und Mineral-salze enthält, mit einer geringen Menge Luft durch eine kleine Öffnung von einer Spritze in eine andere vor- und zurückgedrückt wird. Die mechanischen Kräfte sind dabei für die Bildung der Bläschen in der Flüssigkeit verantwortlich.

**[0006]** M.W. Keller et al. ( J. Ultrasound Med. 5 (1986), 439-8) haben beschrieben, daß Lösungen, die hohe Konzentrationen an gelösten Stoffen wie Dextrose, Renografin-76, Iopamidol (ein Röntgen-Kontrastmittel) und ähnliche enthalten, einer Hohlrumbaue durch Ultraschall unter atmosphärischem Druck unterworfen wurden. Dabei wird die Luft durch die Energie der Hohlrumbaue in die Lösung gedrückt.

**[0007]** Weitere Verfahren beruhen auf dem Schüt-teln einer Trägerflüssigkeit, in die lufthaltige Mikro-partikel gegeben wurden, wobei die Trägerflüssigkeit normalerweise viskositätsverstärkende Agentien, z.B. wasserlösliche Polypeptide oder Kohlenhydrate und/oder Tenside, als Stabilisatoren enthält. Dabei wird im Ergebnis festgestellt, daß die Stabilität der Mikrobläschen gegenüber Abbau oder Verflüchtigung in die Atmosphäre durch die Viskosität und Oberflächeneigenschaften der Trägerflüssigkeit bestimmt wird. Die Luft oder das Gas in den Mikro-partikeln kann aus interpartikulär oder intrakristallin eingeschlossenem Gas sowie aus Oberflächen-adsorbiertem Gas oder aus Gas bestehen, das durch Reaktion mit der normalerweise wäßrigen Trägerflüssigkeit hergestellt wurde. Diese Zusammenhänge werden umfassend beispielsweise in der EP-A-52.575 (Ultra Med. Inc.) beschrieben, in der Aggregate von 1 bis 50 µm-Partikeln aus Kohlenhydraten (z.B. Galactose, Maltose, Sorbitol, Gluconsäure, Sucrose, Glukose und ähnliche) in wäßriger Lösung aus Glykolen oder Polyglykolen oder anderen wasserlöslichen Polymeren verwendet werden.

**[0008]** Auch in EP-A-123.235 und 122.624 (Sche-ring, siehe EP-A-320.433) wird Luft verwendet, die in Festkörpern eingeschlossen ist. EP-A-122.624 beispielsweise beansprucht eine flüssige Zusammen-setzung für ein Kontrastmittel zur Ultraschall-Echo-

graphie, die Mikropartikel eines festen Tensides enthält, wobei letzteres gegebenenfalls mit Mikropartikeln eines Nicht-Tensides vermischt sein kann. Wie in diesem Dokument offenbart wird, resultiert die Bildung von Luft-Bläschen in der Lösung aus der Freisetzung der Luft, die auf der Oberfläche der Partikel adsorbiert oder im Gitter der Partikel eingeschlossen oder zwischen einzelnen Partikeln gebunden wurde, was durch Vermischen der Partikel mit dem flüssigen Träger erreicht wird.

**[0009]** EP-A-131.540 (Schering) offenbart ebenfalls die Herstellung von Mikrobläschen-Suspensionen, in denen eine stabilisierte, injizierbare Trägerlösung, z.B. eine physiologische, wäßrige Lösung aus Salz oder eine Lösung eines Zuckers, wie Maltose, Dextrose, Lactose oder Galactose, ohne Viskositäts-Verstärker mit Mikropartikeln (im Bereich von 0,1 bis 1 µm) desselben Zuckers vermischt wird, der die eingeschlossene Luft enthält. Damit sich die Suspension der Bläschen in der Trägerflüssigkeit entwickeln kann, empfehlen die o.g. Dokumente, daß die flüssige und die feste Komponente unter sterilen Bedingungen heftig miteinander vermischt werden. Das Vermischen der beiden Komponenten wird in wenigen Sekunden durchgeführt und nach der Herstellung muß die Suspension sofort verwendet werden, d.h. sie sollte innerhalb von 5 – 10 Minuten für Echographie-Messungen injiziert werden. Dies beweist, daß die Bläschen in der Suspension nicht langlebig sind, und daß ein praktisches Problem bei der Verwendung von Mikrobläschen-Suspensionen zur Injektion deren mangelnde Stabilität im Verlauf der Zeit ist. Die vorliegende Erfindung beseitigt diesen Nachteil vollständig.

**[0010]** US-A-4 466 442 (Schering) offenbart eine Reihe von verschiedenen Verfahren zur Herstellung von Suspensionen aus Gas-Mikrobläschen in einem flüssigen Träger unter Verwendung von (a) einer Lösung aus einem Tensid (oberflächenaktives Mittel) in einer Trägerflüssigkeit (wäßrig) und (b) eine Lösung mit einem Viskositäts-Verstärker als Stabilisator. Gemäß den dort zur Herstellung der Bläschen verwendeten Verfahren wird eine Mischung aus (a), (b) und Luft mit hoher Geschwindigkeit durch eine kleine Öffnung gedrückt; oder (a) wird in (b) injiziert, kurz bevor sie zusammen mit einem physiologisch akzeptablen Gas verwendet werden; oder eine Säure wird zu (a) und ein Carbonat zu (b) gegeben, wobei die Bestandteile direkt vor der Verwendung miteinander vermischt werden und die Säure mit dem Carbonat reagiert, um CO<sub>2</sub>-Bläschen herzustellen; oder während der Lagerung wird ein Gas unter Druck zu einer Mischung aus (a) und (b) gegeben, wobei das Gas dann unter Bildung von Mikrobläschen entspannt wird, wenn die Mischung zur Injektion verwendet wird.

**[0011]** Die Tenside, die in Bestandteil (a) von

US-A-4 466 442 verwendet wurden, umfassen Lecithine, Ester und Ether der Fettsäuren und Fettalkohole mit Polyoxyethylen- und polyoxyethylierten Polyolen wie Sorbitol, Glykol und Glycerol, Cholesterol und Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Polymere. Die viskositäts-verstärkenden und stabilisierenden Bestandteile umfassen beispielsweise Mono- und Polysaccharide (Glucose, Lactose, Sucrose, Dextran, Sorbitol), Polyole, d.h. Glycerol, Polyglykole, und Polypeptide wie Proteine, Gelatine, Oxypolygelatine, Plasmaproteine und ähnliche.

**[0012]** In einem typischen, bevorzugten Beispiel dieser Veröffentlichung werden gleiche Volumina von (a) einer 0,5 gew.-%igen, wäßrigen Lösung mit 0,5 Gew.% Pluronic F-68 (ein Polyoxypropylen-Polyoxyethylen-Polymer) und (b) einer 10%igen Lactoselösung unter sterilen Bedingungen (geschlossene Röhrchen) miteinander vermischt, um eine Suspension aus Mikrobläschen herzustellen, die fertig zur Verwendung als Ultraschall-Kontrastmittel ist und wenigstens zwei Minuten stabil bleibt. Etwa 50% der Bläschen hatten eine Größe von weniger als 50 µm.

**[0013]** Obwohl die Errungenschaften des Standes der Technik verdienstvoll sind, haben sie mehrere Nachteile, die die praktische Anwendung durch Ärzte und Krankenhäuser stark limitieren, namentlich ihre relativ kurze Lebenszeit (was die Reproduzierbarkeit eines Testes schwierig macht), eine relativ geringe Ausgangskonzentration an Bläschen (die Anzahl der Bläschen übersteigt selten 10<sup>4</sup> bis 10<sup>5</sup>-Bläschen/ml, und die Zahl nimmt mit der Zeit stark ab) und schlechte Reproduzierbarkeit der Ausgangszahl von Bläschen von Test zu Test (was Vergleiche ebenfalls erschwert). Es ist ferner bekannt, daß für die effiziente Darstellung bestimmter Organe, z.B. des linken Herzens, Bläschen kleiner als 50 µm, vorzugsweise im Bereich von 0,5–10 µm, benötigt werden; bei größeren Bläschen bestehen die Risiken einer Verklumpung und anschließender Embolie.

**[0014]** Darüber hinaus kann die zwingende Gegenwart von festen Mikropartikeln oder von hohen Konzentrationen an Elektrolyten und anderen relativ inerten, gelösten Substanzen in der Trägerflüssigkeit in einigen Fällen physiologisch unerwünscht sein. Schließlich sind die Suspensionen bei Lagerung vollständig instabil und können nicht als solche verkauft werden; daher wird viel Erfahrung benötigt, um die Mikrobläschen im richtigen Moment direkt vor der Verwendung herzustellen.

**[0015]** Natürlich existieren stabile Suspensionen aus Mikrokapseln, z.B. Mikroballons mit einer festen, Luft-dichten, stabilen, polymeren Membran, die hervorragend über lange Lagerzeiten in Suspension erhalten bleiben, die entwickelt wurden, um diese Unzulänglichkeiten zu überkommen (siehe beispielsweise K.J. Widder, EP-A-324.938). Die Eigenschaf-

ten der Mikrokapselformen, in denen ein Gas innerhalb von festen Membranvesikeln eingeschlossen ist, unterscheiden sich jedoch deutlich von denen der Gasmikrobläschen der vorliegenden Erfindung und gehören zu einem anderen Stand der Technik. Während beispielsweise die hier offenbarten Gasmikrobläschen einfach entweichen oder sich im Blutstrom auflösen, wenn die Stabilisatoren in die Trägerflüssigkeit abgeschieden oder metabolisiert werden, muß das feste, polymere Material, das die Wände der oben genannten Mikroballons bildet, schließlich von dem getesteten Organismus beseitigt werden, was eine erhebliche Belastung für ihn sein kann. Auch können Kapseln mit einer festen, nicht-elastischen Membran bei Druckunterschieden irreversibel brechen.

**[0016]** Die erfindungsgemäße Zusammensetzung gemäß Anspruch 1 beseitigt vollständig die hier beschriebenen Probleme.

**[0017]** Der Begriff "lamellare Form", der den Zustand von wenigstens einem Teil der Phospholipide der vorliegenden Zusammensetzung definiert, bedeutet, daß die Phospholipide im Gegensatz zu den Mikropartikeln des Standes der Technik (beispielsweise EP-A-0 123 235) in Form von dünnen Filmen vorliegen, die aus einer oder mehreren Schichten (in laminierte Form) bestehen. Die Umwandlung der schichtbildenden Phospholipide in lamellare Form kann einfach durchgeführt werden, beispielsweise durch Hochdruck-Homogenisierung oder durch Beschallung mit akustischen oder Ultraschall-Frequenzen. In diesem Zusammenhang sollte herausgestellt werden, daß die Existenz von Liposomen eine bekannte und nützliche Verdeutlichung von Fällen ist, in denen Tenside, insbesondere Phospholipide, in lamellarer Form vorliegen.

**[0018]** Liposomen-Lösungen sind wäßrige Suspensionen von mikroskopischen Vesikeln, im wesentlichen sphärisch geformt, die Substanzen eingeschlossen haben. Diese Vesikel werden normalerweise aus einem oder mehreren konzentrisch angeordneten molekularen Schichten (Lamellen) aus amphipatischen Bestandteilen gebildet, d.h. aus Bestandteilen mit einer lipophoben, hydrophilen Gruppe und einer lipophilen, hydrophoben Gruppe. Siehe beispielsweise "Liposome Methodology", Ed. L.D. Leserman et al., Insem 136, 2-8 May 1982). Viele oberflächenaktive Mittel oder Tenside, einschließlich Lipide, insbesondere Phospholipide, können laminiert werden, um dieser Art von Struktur zu entsprechen. In dieser Erfindung werden vorzugsweise Lipide verwendet, die normalerweise zur Herstellung von Liposomen verwendet werden, beispielsweise die Lecithine und andere Tenside, die im folgenden detaillierter offenbart werden, wodurch keineswegs die Verwendung von anderen Tensiden ausgeschlossen wird, vorausgesetzt, daß diese Schichten oder Filme bilden können.

**[0019]** Es ist wichtig zu beachten, daß keine Verwechslungen zwischen der vorliegenden Erfindung und der Offenbarung von Ryan (US-A-4 900 540) entstehen, die die Verwendung von luft- oder gasgefüllten Liposomen zur Echographie offenbart. In diesem Verfahren schließt Ryan Luft oder Gas in liposomale Vesikel ein; in den Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden Mikrobläschen aus Luft oder Gas in einer Suspension aus Liposomen (d.h. mit Flüssigkeit gefüllte Liposomen) gebildet, und die Liposomen stabilisieren offensichtlich die Mikrobläschen. Bei Ryan befindet sich die Luft innerhalb der Liposomen, was bedeutet, daß im Rahmen der vorliegend verwendeten Terminologie die luftgefüllten Liposomen von Ryan zur Klasse der Mikroballons und nicht zu der der Mikrobläschen der vorliegenden Erfindung gehören.

**[0020]** Um erfindungsgemäße Suspensionen aus Mikrobläschen herzustellen, geht man praktischerweise von Liposomen-Suspensionen oder Lösungen aus, die durch irgendein Verfahren hergestellt wurden, das im Stand der Technik beschrieben wurde, mit dem offensichtlichen Unterschied, daß in dem vorliegenden Fall die Liposomen-Vesikel vorzugsweise "unbeladen" sind, d.h. sie brauchen kein anderes Material als die Flüssigkeit der Suspension zu enthalten, was normalerweise bei klassischen Liposomen das Ziel ist. Deswegen werden die Liposomen der vorliegenden Erfindung vorzugsweise eine wäßrige Phase enthalten, die identisch oder ähnlich zur wäßrigen Phase der Lösung selbst ist. Daraufhin wird Luft oder Gas in die Liposomen-Lösung eingeführt, so daß eine Suspension aus Mikrobläschen entsteht, wobei die Suspension durch die Gegenwart der Phospholipide in lamellarer Form stabilisiert wird. Dennoch kann das Material, aus dem die Liposomen-Wände bestehen, im Rahmen der vorliegenden Erfindung verändert werden, beispielsweise durch kovalente Bindung fremder Moleküle, die für bestimmte Zwecke entworfen wurden, wie später erklärt werden wird.

**[0021]** Die Herstellung von Liposomen-Lösungen wurde umfangreich in vielen Veröffentlichungen diskutiert, z.B. US-A-4 224 179 und WO-A-88/09165 und alle Literaturhinweise, die darin erwähnt werden. Dieser Stand der Technik wird hier als Hinweis verwendet, um beispielhaft die verschiedenen Verfahren darzustellen, die geeignet sind, schichtbildende Tenside in lamellare Form zu überführen. Eine weitere wesentliche Literaturstelle von M.C. Woodle und D. Papahadjopoulos findet sich in "Methods in Enzymology" 171 (1989), 193.

**[0022]** Beispielsweise wird in einem Verfahren, das in D.A. Tyrrell et al., Biochimica & Biophysica Acta 457 (1976), 259-302, offenbart wurde, eine Mischung aus einem Lipid und einem wäßrigen, flüssigen Träger starkem Rühren ausgesetzt und danach

bei Raum- oder erhöhter Temperatur mit akustischen oder Ultraschall-Frequenzen beschallt. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde herausgefunden, daß Beschallung ohne Rühren ausreichend ist. Auch ein Gerät zur Herstellung von Liposomen, ein Hochdruck-Homogenisator, wie ein Mikro-Fluidisator, der von Microfluidics Corp., Newton, MA 02164 USA gekauft werden kann, kann vorteilhaft verwendet werden. Große Volumen von Liposomen-Lösungen können mit diesem Gerät unter Druck hergestellt werden, der 600 bis 1200 bar erreichen kann.

**[0023]** In einem anderen Verfahren, nach der Lehre des GB-A-2 134 869 (Squibb), werden Mikropartikel (10 µm oder kleiner) eines wasserlöslichen, festen Trägers (NaCl, Sucrose, Lactose und weitere Kohlenhydrate) mit einem amphipatischen Agens beschichtet; die Auflösung des beschichteten Trägers in einer wäßrigen Phase wird zu Liposomen-Vesikeln führen. In GB-A-2 135 647 werden unlösliche Partikel, z.B. Glas- oder Harzmikrokugeln durch Anfeuchten in einer Lösung eines Lipids in einem organischen Lösungsmittel beschichtet, wonach das Lösungsmittel durch Verdampfen entfernt wird. Die lipidbeschichteten Mikrokugeln werden danach mit einer wäßrigen Trägerphase kontaktiert, wobei Liposomen-Vesikel in der Trägerphase entstehen.

**[0024]** Das Einleiten von Luft oder Gas in eine Lösung aus Liposomen, damit sich darin eine Suspension aus Mikrobläschen bildet, kann nach bekannten Verfahren ausgeführt werden, unter anderem durch Injektion, wobei die Luft oder das Gas durch winzige Öffnungen in die Liposomen-Lösung gedrückt wird oder das Gas wird in der Lösung gelöst, indem Druck appliziert und danach der Druck schlagartig abgelassen wird. Eine weitere Möglichkeit liegt im Rühren oder Beschallen der Liposomen-Lösung in Gegenwart von Luft oder einem einschließbaren Gas. Man kann auch die Bildung eines Gases in der Lösung aus Liposomen selbst herbeiführen, indem beispielsweise ein Gas durch eine chemische Reaktion freigesetzt wird, z.B. durch die Zersetzung eines gelösten Carbonats oder Bicarbonats durch eine Säure. Der gleiche Effekt kann erreicht werden, indem eine niedrigsiedende Flüssigkeit, beispielsweise Butan, unter Druck in der wäßrigen Phase gelöst und danach die Flüssigkeit zum Sieden gebracht wird, indem der Druck schlagartig abgelassen wird.

**[0025]** Ein vorteilhaftes Verfahren besteht jedoch auch darin, den trockenen Tensiden in lamellarer Form oder in Form dünner Schichten mit Luft oder einem adsorbierbaren oder einschließbaren Gas zu kontaktieren, bevor das Tensid in die flüssige Trägerphase eingeführt wird. In diesem Zusammenhang kann das Verfahren von dem Verfahren abgeleitet werden, das in GB-A-2 135 647 offenbart wird, d.h. feste Mikropartikel oder Kugeln werden in eine Lösung eines Schicht-bildenden Tensides (oder einer

Mischung aus Tensiden) in einem flüchtigen Lösungsmittel getaucht, wonach das Lösungsmittel verdampft wird und die Kugeln im Kontakt mit Luft (oder einem adsorbieren Gas) für eine ausreichende Zeit belassen werden, so daß die Luft oberflächlich an die Schicht des Tensides gebunden wird. Danach werden die Kugeln, die mit einem luftgefüllten Tensid beschichtet sind, in eine Trägerflüssigkeit, normalerweise Wasser, mit oder ohne Additive, gegeben, wobei Luftbläschen in der Flüssigkeit durch vorsichtiges Mischen entstehen, starkes Rühren ist völlig unnötig. Die festen Kugeln können von der Mikrobläschen-Suspension, die auffallend stabil ist, abgetrennt werden, beispielsweise durch Filtration.

**[0026]** Selbstverständlich kann man anstelle der unlöslichen Kugeln oder Sphären als unterstützende Partikel wasserlösliche Materialien verwenden, wie die in GB-A- 2 134 869 (Kohlenhydrate oder hydrophile Polymere) offenbart, wobei die unterstützenden Partikel sich schließlich auflösen, was eine abschließende Abtrennung der Feststoffe überflüssig macht. Darüber hinaus kann das Material der Partikel in diesem Fall so ausgewählt werden, daß es als Stabilisator oder Viskositäts-Verstärker wirkt, sofern es gewünscht wird.

**[0027]** In einer Variante des Verfahrens kann man auch von dehydrierten Liposomen ausgehen, d.h. Liposomen, die durch konventionelle Verfahren in Form von wäßrigen Lösungen hergestellt wurden und danach durch bekannte Verfahren dehydriert wurden, wie z.B. wie in US-A-4 229 360 offenbart, auf die hierin Bezug genommen wird. Eines der Verfahren zum Dehydrieren von Liposomen, das in dieser Quellenangabe empfohlen wird, ist die Gefriertrocknung (Lyophilisation), d.h. die Liposomen-Lösung wird gefroren und durch Eindampfen unter reduziertem Druck (Sublimation) getrocknet. Vor Durchführung der Gefriertrocknung wird eine hydrophile, stabilisierende Komponente in der Lösung gelöst, beispielsweise ein Kohlenhydrat wie Lactose oder Sucrose oder ein hydrophiles Polymer wie Dextran, Stärke, PVP, PVA und ähnliche. Dies ist vorteilhaft für die vorliegende Erfindung, weil derartige hydrophile Komponenten eine homogene Größenverteilung der Mikrobläschen unterstützen und die Lagerstabilität erhöhen. Die Herstellung von stark verdünnten, wäßrigen Lösungen (0,1 – 10 Gew.-%) aus gefriertrockneten Liposomen, die beispielsweise im Gewichtsverhältnis von 5:1 bis 10:1 Lactose zu Lipid stabilisiert wurden, ermöglicht es, wäßrige Mikrobläschen-Suspensionen herzustellen, in denen  $10^8$ - $10^9$  Mikrobläschen/ml gezählt werden (Größenverteilung hauptsächlich 0,5–10µm), die für wenigstens einen Monat (und wahrscheinlich wesentlich länger) ohne wesentliche, beobachtbare Veränderungen stabil sind. Man erhält diese durch einfaches Auflösen der luft-gelagerten, trockenen Liposomen ohne Schütteln oder starke Durchmischung. Darüber hinaus ist das

Gefriertrocknungs-Verfahren unter reduziertem Druck sehr nützlich, da es es ermöglicht, nach Trocknung den Druck über den getrockneten Liposomen mit irgendeinem einschließbaren Gas, d.h. Stickstoff, CO<sub>2</sub>, Argon, Methan, Freon, etc. wieder herzustellen, wobei nach Auflösung der Liposomen, die unter derartigen Bedingungen hergestellt wurden, Suspensionen aus Mikrobläschen erhalten werden, die die genannten Gase enthalten.

**[0028]** Mikrobläschen-Suspensionen, die hergestellt wurden, indem Gas-Druck auf eine verdünnte Lösung aus laminierten Lipiden in Wasser (0,1–10 Gew.-%) appliziert und danach der Druck schlagartig abgelassen wurde, haben sogar eine noch höhere Bläschen-Konzentration, z.B. in der Größenordnung von 10<sup>10</sup>-10<sup>11</sup> Bläschen/ml. Die durchschnittliche Bläschengröße ist jedoch etwas größer als 10µm, z.B. im Bereich von 10 – 50 µm. In diesem Fall kann die Größenverteilung der Bläschen durch Zentrifugation und Dekantieren der Schicht eingeengt werden.

**[0029]** Phospholipide, die in der vorliegenden Erfindung zu gebrauchen sind, können aus allen amphipatischen Stoffen ausgewählt werden, die in der Lage sind, stabile Schichten in Gegenwart von Wasser und Gasen zu bilden. Bevorzugte Phospholipide, die laminarisiert werden können, umfassen die Lecithine (Phosphatidylcholin) und andere Phospholipide, unter anderem Phosphatidsäure (PA), Phosphatidylinositol Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylglycerol (PG), Cardiolipin (CL), Sphingomyeline, Plasmogene, Cerebroside, etc. Beispiele geeigneter Lipide sind Phospholipide im allgemeinen, beispielsweise natürliche Lecithine, wie Ei-Lecithin oder Sojabohnen-Lecithin, oder synthetische Lecithine wie gesättigte, synthetische Lecithine, beispielsweise Dimyristoylphosphatidylcholin, Dipalmitoylphosphatidylcholin oder Distearoylphosphatidylcholin oder ungesättigte synthetische Lecithine, wie Dioleoylphosphatidylcholin oder Dilinoleoylphosphatidylcholin, wobei Ei-Lecithin oder Sojabohnen-Lecithin bevorzugt ist. Zusätze wie Cholesterol und weitere Substanzen (siehe unten) können zu einem oder mehreren der oben genannten Lipide dazugegeben werden, in einem Verhältnis, das im Bereich von 0 bis 50 Gew.-% liegt.

**[0030]** Solche Zusätze können weitere Tenside umfassen, die in Mischung mit dem schichtbildenden Tensiden verwendet werden können und von denen die meisten im Stand der Technik zitiert werden, der in der Einleitung dieser Beschreibung diskutiert wurde. Man kann beispielsweise freie Fettsäuren, Ester von Fettsäuren mit Polyoxyalkylenverbindungen wie Polyoxypropylenglykol und Polyoxyethylenglykol; Ether von Fett-Alkoholen mit Polyoxyalkylenglykolen; Ester von Fettsäuren mit polyoxyalkyliertem Sorbitan; Seifen; Glycerolpolyalkylenstearat; Glycerolpolyoxyethylenricinoleat; Homo- und Copolymere von

Polyalkylenglykolen; polyethoxyliertes Sojaöl und Castoröl sowie hydrierte Derivate; Ether und Ester von Sucrose oder anderen Kohlenhydraten mit Fettsäuren, Fett-Alkoholen, wobei diese wahlweise polyoxyalkyliert sind; Mono-, Di- und Triglyceride von gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren; Glyceride des Sojaöls und Sucrose auflisten. Die Menge der nicht schichtbildenden Tenside oder oberflächenaktiven Substanzen kann bis zu 50 Gew.-% der Gesamtmenge der Tenside in der Zusammensetzung erreichen, liegt aber vorzugsweise zwischen Null und 30%.

**[0031]** Die Gesamtmenge an Tensiden im Verhältnis zur wäßrigen Trägerflüssigkeit liegt am Besten im Bereich von 0,01 zu 25 Gew.-%, wobei Mengenverhältnisse im Bereich 0,5 – 5% bevorzugt sind, weil man immer versucht, die Menge an aktiven Substanzen in einer injizierbaren Lösung so gering wie möglich zu halten, um die Einführung von fremden Materialien in Lebewesen zu minimieren, selbst wenn diese harmlos und physiologisch verträglich sind.

**[0032]** Weitere mögliche Zusatzstoffe zu den Tensiden umfassen:

- a) Substanzen, die bekanntermaßen zu einer negativen Ladung auf Liposomen führen, beispielsweise Phosphatidsäure, Phosphatidylglycerol oder Dicetylphosphat;
- b) Substanzen, die bekanntermaßen zu einer positiven Ladung führen, beispielsweise Stearylamin oder Stearylaminacetat;
- c) Substanzen, die bekanntermaßen die physikalischen Eigenschaften der Lipid-Schicht in bevorzugter Weise beeinflussen; beispielsweise können Caprolactam und/oder Sterole wie Cholesterol, Ergosterol, Phytosterol, Sitosterol, Sitosterolpyroglutamat, 7-Dehydro-cholesterol oder Lanosterol die Steifheit der Lipidschicht beeinflussen;
- d) Substanzen, die bekanntermaßen antioxidative Eigenschaften haben, um die chemische Stabilität der Stoffe in den Suspensionen zu verbessern, wie Tocopherol, Propylgallat, Ascorbylpalmitat oder butyliertes Hydroxytoluol.

**[0033]** Der erfindungsgemäße, wäßrige Träger ist meistens Wasser mit möglicherweise kleinen Mengen von physiologisch-verträglichen Flüssigkeiten wie Isopropanol; Glycerol, Hexanol und ähnliche (siehe beispielsweise EP-A- 52.575). Im allgemeinen wird die Menge der organischen, wasserlöslichen Flüssigkeiten 5 – 10 Gew.-% nicht übersteigen.

**[0034]** Die vorliegende Zusammensetzung kann ebenfalls darin gelöste oder suspendierte, hydrophile Bestandteile und Polymere enthalten, die allgemein unter dem Begriff Viskositätsverstärker oder Stabilisatoren definiert werden. Obwohl die Gegenwart derartiger Bestandteile zur Gewährleistung der Lager-

Stabilität der Luft- oder Gasbläschen nicht notwendig ist, sind sie in den vorliegenden Dispersionen jedoch vorteilhaft, um den Lösungen eine Art von "Körper" zu geben. Sofern gewünscht, können die oberen Konzentrationen solcher Zusatzstoffe sehr hoch sein, wenn sie vollständig harmlos sind, beispielsweise bis zu 80 – 90 Gew.-% der Lösung bei Iopamidol und anderen iodierten Röntgenkontrastmitteln. Andere Viskositäts-Verstärker jedoch, wie beispielsweise Zucker, z.B. Lactose, Sucrose, Maltose, Galactose, Glucose, etc. oder hydrophile Polymere wie Stärke, Dextran, Polyvinylalkohol, Polyvinylpyrrolidon, Dextrin, Xanthan oder teilweise hydrolysierte Cellulose-Oligomere, sowie Proteine und Polypeptide sind in Konzentrationen zwischen etwa 1 und 40 Gew.-% am besten, ein Bereich von etwa 5 – 20% ist bevorzugt.

**[0035]** Wie im Stand der Technik beschrieben, können die injizierbaren Zusammensetzungen dieser Erfindung ebenfalls physiologisch-akzeptable Elektrolyte enthalten; ein Beispiel ist eine isotonische Lösung eines Salzes.

**[0036]** Die vorliegende Erfindung umfaßt auch die Verwendung trockener, lagerfähiger, pulverförmiger Formulierungen zur Herstellung der jetzigen Mikrobläschen enthaltenden Dispersionen durch einfaches Mischen der pulverförmigen Formulierungen mit Wasser oder einer wäßrigen Trägerphase. Vorzugsweise enthalten solche trockenen Gemische oder Formulierungen alle festen Bestandteile, die benötigt werden, um die gewünschten Mikrobläschen-Suspensionen durch einfache Zugabe von Wasser herzustellen, d.h. grundsätzlich Tenside in lamellarer Form, die Luft oder Gas darin eingeschlossen oder adsorbiert enthalten, das zur Mikrobläschen-Bildung benötigt wird, und zusätzlich die weiteren nicht schichtbildenden Tenside, die Viskositäts-Verstärker und Stabilisatoren und gegebenenfalls weitere Zusatzstoffe. Wie zuvor ausgeführt, findet der Einschluß von Luft oder Gas durch die laminierten Phospholipide einfach statt, indem die Tenside der Luft (oder dem Gas) bei Raum- oder superatmosphärischem Druck für eine Zeit ausgesetzt werden, die ausreicht, um den Einschluß der Luft oder des Gases in den Tensiden zu bewirken. Die Zeitdauer kann sehr kurz sein, z.B. im Bereich von wenigen Sekunden bis zu wenigen Minuten, obwohl Überexposition, d.h. Lagerung unter Luft oder unter einer gasförmigen Atmosphäre keineswegs schädlich ist. Es ist wichtig, daß die Luft einen möglichst großen Teil der zur Verfügung stehenden Oberfläche des laminierten Phospholipides kontaktieren kann, d.h. das trockene Material sollte vorzugsweise in einem "flockigen", leicht fließenden Zustand sein. Dies ist genau der Zustand, der bei der Gefrier Trocknung einer wäßrigen Lösung aus Liposomen und hydrophilen Agenzien resultiert, wie in US-A-4 229 360 offenbart.

**[0037]** Im allgemeinen liegt das Gewichtsverhältnis der Tenside zu dem hydrophilen Viskositätsverstärker in der trockenen Formulierung im Bereich von 0,1:10 bis 10:1, wobei weitere mögliche Stoffe, soweit vorhanden, in einem Verhältnis vorliegen, das 50% in Bezug auf die gesamten Tenside plus die Viskositätsverstärker nicht übersteigt.

**[0038]** Die erfindungsgemäß verwendeten, trockenen Mischformulierungen können durch sehr einfache Verfahren hergestellt werden. Wie bereits dargestellt, umfaßt ein bevorzugtes Verfahren zunächst die Herstellung einer wäßrigen Lösung, in der die schichtbildenden Lipide laminarisiert werden, beispielsweise durch Beschallung oder unter Verwendung eines konventionellen Verfahrens, das gewöhnlicherweise im Liposomen-Bereich verwendet wird, wobei diese Lösung auch die anderen gewünschten Zusatzstoffe, d.h. Viskositäts-Verstärker, nicht schichtbildende Tenside, Elektrolyte etc. enthält und danach zu einem frei fließfähigem Pulver gefriergetrocknet wird, welches daraufhin in Gegenwart von Luft oder einem einschließbaren Gas gelagert wird.

**[0039]** Das trockene Gemisch kann für eine beliebige Zeitdauer in trockener Form belassen und als solches verkauft werden. Für die Verwendung, d.h. zur Herstellung einer Gas- oder Luft-Mikrobläschen-Suspension zur Ultraschall-Darstellung, löst man einfach ein bestimmtes Gewicht der trockenen, pulverisierten Formulierung in einer sterilen wäßrigen Phase, z.B. Wasser oder einem physiologisch-akzeptablen Medium. Die Pulvermenge hängt von der gewünschten Konzentration an Bläschen in dem injizierbaren Produkt ab, eine Zahl von etwa  $10^8$ - $10^9$  Bläschen/ml ist im allgemeinen das Ergebnis der Herstellung einer 5 – 20 gew.-%igen Lösung des Pulvers in Wasser. Natürlich ist diese Zahl lediglich ein Indikator, die Anzahl der Bläschen hängt im wesentlichen von der Menge der Luft oder des Gases ab, die während der Herstellung in das trockene Pulver eingeschlossen wurde, wenn die Schritte bei der Herstellung kontrolliert werden, wird die Auflösung der trockenen Formulierung Mikrobläschen-Suspensionen mit gut reproduzierbaren Zählungen bereitstellen.

**[0040]** Die resultierenden Mikrobläschen-Suspensionen (Bläschen im Bereich von 0,5 – 10  $\mu$ m) sind überragend stabil über die Zeit, die Anzahl, die zu Beginn gemessen wurde, bleibt unverändert oder ändert sich nur gering in einem Zeitraum von Wochen und sogar Monaten; die einzig nachweisbare Veränderung ist eine Art Auftrennung, die größeren Bläschen (um 10  $\mu$ m) tendieren dazu, schneller aufzusteigen als die kleinen.

**[0041]** Es konnte ferner festgestellt werden, daß die Mikrobläschen-Suspensionen der Erfindung verdünnt werden können, wobei nur ein sehr geringer Verlust in der Zahl von Mikrobläschen durch die Ver-

dünnung zu erwarten ist, d.h. sogar für den Fall einer hohen Verdünnungsrate, z.B.  $1/10^2$  bis  $1/10^4$ , stimmt die Zahl der Mikrobläschenreduktion mit der Verdünnungsrate überein. Dies zeigt, daß die Stabilität der Bläschen vom Phospholipid in laminarer Form mehr als von der Gegenwart von Stabilisatoren oder Viskositäts-Verstärkern abhängt, wie im Stand der Technik. Diese Eigenschaft ist vorteilhaft für die Reproduzierbarkeit von Darstellungstests, da die Bläschen nicht durch die Verdünnung mit Blut bei Injektionen in den Patienten beeinflusst werden.

**[0042]** Ein weiterer Vorteil der erfindungsgemäßen Bläschen gegenüber den Mikrokapseln des Standes der Technik, die von einer stabilen aber zerbrechlichen Membran umgeben sind, die unter Streß irreversibel zerbrechen kann, liegt darin, daß, wenn die vorliegenden Suspensionen schlagartigen Druckveränderungen ausgesetzt sind, die vorliegenden Bläschen zeitweise elastisch kontrahieren und danach ihre ursprüngliche Form wieder erlangen, wenn der Druck nachläßt. Dies ist für den klinischen Gebrauch wesentlich, wo die Mikrobläschen durch das Herz gepumpt werden und deswegen wechselnden Druck-Impulsen ausgesetzt sind.

**[0043]** Die Gründe, warum die erfindungsgemäßen Mikrobläschen so stabil sind, sind nicht vollständig verstanden. Da zur Verhinderung der Freisetzung der Bläschen die Auftriebskräfte gleich groß sein sollten wie die Rückhaltekräfte aufgrund von Reibung, d.h. aufgrund von Viskosität, wurde die Theorie aufgestellt, daß die Bläschen wahrscheinlich von dem laminarisierten Tensiden umgeben sind. Ob dieses laminarisierte Tensid in Form einer kontinuierlichen oder diskontinuierlichen Membran vorliegt oder sogar als geschlossene Sphäre, die den Mikrobläschen anhängt, ist im Moment nicht bekannt, wird jedoch erforscht. Der Mangel an detailliertem Wissen über das zugrundeliegende Phänomen schließt jedoch die vollständige industrielle Anwendbarkeit der vorliegenden Erfindung nicht aus.

**[0044]** Die Bläschen-Suspension der vorliegenden Erfindung sind auch in weiteren medizinischen/diagnostischen Anwendungen nützlich, bei denen es wünschenswert ist, stabilisierte Mikrobläschen nach ihrer Injektion gezielt an spezifische Stellen im Körper zu dirigieren, beispielsweise zu Thrombosen, die in Blutgefäßen vorliegen, zu atherosklerotischen Läsionen (Plaques) in Arterien, zu Tumorzellen, sowie zur Diagnose von veränderten Oberflächen der Körperhöhlräume, z.B. Stellen von Ulceration im Magen oder Tumoren in der Blase. Dafür kann man monoklonale Antikörper, die durch genetic engineering maßgeschneidert wurden, Antikörperfragmente und Polypeptide, die zur Nachahmung von Antikörpern hergestellt wurden, bioadhäsive Polymere, Lectine und andere Kennstellen-erkennende Moleküle an die Schicht des Tensides binden, die die Mikrobläschen

stabilisiert. Monoklonale Antikörper können somit an Phospholipid-Doppelschichten durch Verfahren gebunden werden, die von L.D.Leserman, P. Machy und J. Barbet offenbart wurden ("Liposome Technology Vol. III", S. 29, herausgegeben von G. Gregoriadis, CRC press 1984). In einer weiteren Anwendung wird ein Palmitoyl-Antikörper zunächst synthetisiert und dann in die Phospholipid-Doppelschichten eingebaut, nach L. Huang, A. Huang und S.J. Kennel ("Liposome Technology Vol. III", S. 51, Herausgeber G. Gregoriadis, CRC Press 1984). Alternativ dazu können einige der Phospholipide, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, besonders ausgewählt werden, um eine bevorzugte Aufnahme in Organe oder Gewebe oder eine erhöhte Halbwertszeit im Blut zu bewirken. So führen GM1 Ganglioside- oder Phosphatidylinositol enthaltende Liposomen, vorzugsweise unter Zugabe von Cholesterol, zu erhöhten Halbwertszeiten im Blut nach intravenöser Applikation, in Analogie mit A. Gabizon, D. Papahadjopoulos, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) 6949.

**[0045]** Die Gase in den Mikrobläschen der vorliegenden Erfindung können zusätzlich zu den gängigen, harmlosen, physiologisch akzeptablen Gasen wie  $\text{CO}_2$ , Stickstoff,  $\text{N}_2\text{O}$ , Methan, Butan, Freon und Mischungen davon, radioaktive Gase wie  $^{133}\text{Xe}$  oder  $^{81}\text{Kr}$  umfassen und sind für die Nuklearmedizin bei Messungen der Blutzirkulation, für die Lungenscintigraphie etc. von besonderem Interesse.

**[0046]** Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung von einem praktischen Standpunkt.

#### Echogene Messungen

**[0047]** Echogenizitäts-Messungen wurden in einem Puls-Echosystem durchgeführt, das aus einem Plexiglas-Probenhalter (Durchmesser 30 mm) und einem Transducer-Halter, der in einem temperierten Wasserbad eingetaucht war und einem Pulser-Empfänger (Accutron M3010S) mit einem externen Vorverstärker mit eingestelltem Verstärkungsfaktor von 40 dB und einem internen Verstärker mit einstellbarem Verstärkungsfaktor von  $-40$  bis  $+40$  dB für das Empfangsteil. Um das Verhältnis von Signal zu Hintergrundrauschen zu verbessern, wurde ein 10 MHz Tiefpaßfilter in das Empfangsteil eingebaut. Die A/D Karte im IBM PC war eine Sonotek STR 832. Die Messungen wurden bei 2,25, 3,5, 5 und 7,5 MHz durchgeführt.

#### Beispiel 1

**[0048]** Eine Liposomen-Lösung (50 mg Lipide pro ml) wurde nach dem REV Verfahren (vgl. F. Szoka Jr. und D. Papahadjopoulos, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (1978) 4194) in destilliertem Wasser unter Verwendung von hydriertem Soya-Lecithin (NC 95 H, Nattermann Chemie, Köln, W. Germany) und Dicetyl-



phosphat im molaren Verhältnis von 9/1 hergestellt. Diese Liposomen-Lösung wurde bei 65 °C durch ein 1µm Polycarbonat-Filter (Nucleopore) extrudiert (um die Vesikelgröße zu kalibrieren). Zwei ml dieser Lösung wurden mit 5 ml einer 75%-igen Iopamidol Lösung in Wasser vermischt, und 0,4 ml Luft und die Mischung wurden durch ein zwei Spritzen System vor und zurück gedrückt, wie in DE-35 29 195 offenbart, während ein leichter Überdruck kontinuierlich erhalten blieb. Dies führte zur Bildung von einer Mikrobläschen-Suspension aus Luft in der Flüssigkeit ( $10^5$ - $10^6$  Bläschen pro ml, Bläschengröße 1–20µm, durch Licht-Mikroskopie ermittelt), die für mehrere Stunden bei Raumtemperatur stabil war. Diese Suspension ergab beim Testen durch Ultraschall-Echographie bei 7,5, 5, 3,5 und 2,25 MHz ein starkes Echosignal.

#### Beispiel 2

**[0049]** Eine Lösung aus destilliertem Wasser (100 ml), die 2 Gew.-% hydriertes Soyalecithin und Dicytylphosphat in einem molaren Verhältnis von 9/1 enthielt, wurde für 15 Min. bei 60–65°C mit einem Branson Sonden-Beschaller (Typ 250) beschallt.

**[0050]** Nach Abkühlung, wurde die Lösung für 15 Min. bei 10 000 g zentrifugiert, der Überstand wurde wiedergewonnen und mit Lactose versetzt, um eine 7,5 Gew.-%ige Lösung zu bilden. Die Lösung wurde in einen geschlossenen Behälter gestellt, in dem für wenige Minuten ein Druck von 4 bar mit Stickstoff hergestellt wurde, während der Behälter geschüttelt wurde. Danach wurde der Druck schlagartig abgelassen, wodurch eine hochkonzentrierte Bläschensuspension erhalten wurde ( $10^{10}$ - $10^{11}$  Bläschen/ml). Die Größenverteilung der Bläschen war jedoch breiter als in Beispiel 1, d.h. von etwa 1 bis 50µm. Die Suspension war sehr stabil, nach einigen Tagen erfolgte jedoch eine Auftrennung der stehenden Phase, da die größeren Bläschen die Tendenz entwickelten sich in den oberen Schichten der Suspension zu konzentrieren.

#### Beispiel 3

**[0051]** 20 g Glaskugeln (Durchmesser etwa 1 mm) wurden in eine Lösung aus 100 mg Dipalmitoylphosphatidylcholin (Fluka A.G. Buchs) in 10 ml Chloroform eingetaucht. Die Kugeln wurden unter reduziertem Druck in einem rotierenden Eindampfer gedreht, bis das gesamte  $\text{CHCl}_3$  verdampft war. Die Kugeln wurden unter atmosphärischem Druck für wenige Minuten weitergedreht und 10 ml destilliertes Wasser wurden zugegeben. Die Kugeln wurden entfernt, und eine Lösung aus Luftmikrobläschen wurde erhalten, von der durch Überprüfung unter dem Mikroskop gezeigt werden konnte, daß sie etwa  $10^6$  Bläschen/ml enthielt. Die durchschnittliche Größe der Bläschen war etwa 3 – 5 µm. Die Suspension war wenigstens für mehrere Tage stabil.

#### Beispiel 4

**[0052]** Eine hydrierte Suspension aus Sojalecithin/Dicytylphosphat in Wasser wurde unter Verwendung des REV-Verfahrens laminarisiert, wie in Beispiel 1 beschrieben. 2 ml der Liposomen-Herstellung wurden zu 8 ml einer 15%igen Maltoselösung in destilliertem Wasser gegeben. Die resultierende Lösung wurde bei –30°C gefroren, daraufhin bei 0,1 Torr lyophilisiert. Vollständige Sublimationen des Eis wurde nach ein paar Stunden erhalten. Danach wurde der Luftdruck in dem evakuierten Behälter wieder hergestellt, so daß das lyophilisierte Pulver in wenigen Minuten mit Luft-gesättigt wurde.

**[0053]** Das trockene Pulver wurde daraufhin in 10 ml sterilem Wasser unter vorsichtigem Mischen aufgelöst, wobei eine Mikrobläschen-Suspension erhalten wurde ( $10^8$  –  $10^9$  Mikrobläschen per ml, dynamische Viskosität < 20 mPa.s). Diese Suspension, die in der Mehrzahl Bläschen im Bereich von 1 – 5 µm enthielt, war für eine sehr lange Zeitdauer stabil, da eine Vielzahl an Bläschen noch nach zwei Monaten Lagerung nachgewiesen werden konnten. Diese Mikrobläschen-Suspension gab ein starkes Signal bei der Ultraschall-Echographie. Wenn in diesem Beispiel die Lösung gefroren wird, indem sie in Luft bei –30 bis –70°C gesprüht wird, um gefrorenen Schnee anstelle eines monolithischen Blocks zu erhalten und der Schnee daraufhin unter Vakuum eingedampft wird, werden exzellente Ergebnisse erhalten.

#### Beispiel 5

**[0054]** Zwei ml-Proben der Liposomen-Lösung, die erhalten wurde, wie in Beispiel 4 beschrieben, wurden mit 10 ml einer 5%igen wäßrigen Lösung aus Gelatine (Probe 5A), Humanalbumin (Probe 5B), Dextran (Probe 5C) und Iopamidol (Probe 5D) vermischt. Alle Proben wurden lyophilisiert. Nach der Lyophilisierung und der Einführung von Luft wurden die verschiedenen Proben vorsichtig mit 20 ml sterilem Wasser vermischt. In allen Fällen lag die Bläschen-Konzentration über  $10^8$  Bläschen pro ml, und beinahe alle Bläschen waren kleiner 10 µm. Das Verfahren des vorangegangenen Beispiels wurde mit 9 ml der Liposomen-Präparation (450 mg Lipide) und lediglich 1 ml einer 5%igen Humanalbuminlösung wiederholt. Nach dem Lyophilisieren, Aussetzen der Luft und Zugabe des sterilen Wassers (20 ml) enthielt die resultierende Lösung  $2 \times 10^8$ -Bläschen pro ml, die meisten davon kleiner als 10 µm.

#### Beispiel 6

**[0055]** Lactose (500 mg), die zu einer Partikelgröße von 1 – 3 µm fein vermahlen war, wurde mit einer Lösung aus 100 mg Dimyristoylphosphatidylcholin/Cholesterol/Dipalmitoylphosphatidsäure (von Fluka) in einem molaren Verhältnis von 4:1:1 in Chloroform (5

ml) angefeuchtet und danach unter Vakuum in einem rotierenden Eindampfer eingedampft. Das resultierende, frei fließende, weiße Pulver wurde für wenige Minuten bei normalem Druck unter Stickstoff rotiert und danach in 20 ml sterilem Wasser aufgelöst. Eine Mikrobläschen-Suspension mit etwa  $10^5$ - $10^6$  Mikrobläschen pro ml im Größenbereich von 1 bis 10  $\mu\text{m}$  wurde erhalten, wie durch Beobachtung unter dem Mikroskop festgestellt wurde. In diesem Beispiel war das Gewichtsverhältnis von beschichtetem Tensiden zu wasserlöslichem Träger 1:5. Exzellente Ergebnisse ( $10^7$ - $10^8$  Mikrobläschen-ml) wurden ebenfalls erhalten, wenn dieses Verhältnis auf einen geringeren Wert reduziert wurde, d.h. auf bis zu 1:20, was tatsächlich die Effizienz des Tensides zur Aufnahme von Luft steigert, d.h. daß dadurch das Gewicht der Tenside abnimmt, das benötigt wird, um dieselbe Bläschenzahl herzustellen.

#### Beispiel 7

**[0056]** Eine wäßrige Lösung, die 2% hydriertes Sojalecithin und 0,4% Pluronic® F68 (nicht-ionisches Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Copolymer Tensid) enthielt, wurde beschallt, wie in Beispiel 2 beschrieben. Nach Abkühlen und Zentrifugieren, wurden 5 ml von dieser Lösung zu 5 ml einer 15%igen Maltoselösung in Wasser gegeben. Die resultierende Lösung wurde bei  $-30^\circ\text{C}$  gefroren und unter 0,1 Torr eingedampft. Daraufhin wurde der Luftdruck in dem Gefäß, das das trockene Pulver enthielt, wieder hergestellt. Es wurde für einige Sekunden an der Luft stehengelassen, wonach es zur Herstellung einer 10 Gew.-%igen Lösung verwendet wurde, von der unter dem Mikroskop gezeigt werden konnte, daß sie eine Suspension aus sehr kleinen Bläschen ( $< 10 \mu\text{m}$ ) war; die Bläschen-Konzentration lag im Bereich von  $10^7$ -Bläschen pro ml. Dieses Präparat gab sehr starke Signale in der Ultraschall-Echographie bei 2,25, 3,5, 5 und 7,5 Mhz.

#### Beispiel 8

**[0057]** Zweidimensionale Echokardiographie wurde an einem Versuchshund nach Injektion von 0,1 – 2 ml des Präparats, das in Beispiel 4 erhalten wurde, in die peripheren Venen durchgeführt. Die Opazität des linken Herzens mit klarer Abgrenzung des Endokardiums konnte beobachtet werden, wodurch bestätigt wurde, daß die Mikrobläschen (oder wenigstens ein signifikanter Teil von ihnen) in der Lage waren, die pulmonare, kapillare Zirkulation zu überschreiten.

#### Beispiel 9

**[0058]** Ein lyophilisiertes Pulver aus Phospholipid/Maltose wurde hergestellt, wie in Beispiel 4 beschrieben. Am Ende des Lyophilisierungsschrittes wurde jedoch eine Gasmischung, die  $^{133}\text{Xe}$  enthielt, in den evakuierten Behälter anstelle von Luft eingefüllt.

Wenige Minuten später wurde Wasser zugegeben und nach vorsichtigem Mischen war eine Mikrobläschen-Suspension entstanden, die  $^{133}\text{Xe}$  in der Gasphase enthielt. Diese Mikrobläschen-Suspension wurde in Lebewesen injiziert, um Untersuchungen durchzuführen, die die Verwendung von  $^{133}\text{Xe}$  als Indikator benötigten. Exzellente Ergebnisse wurden erhalten.

#### Beispiel 10 (Vergleich)

**[0059]** In US-A-4 900 540 offenbaren Ryan et al. Gas-gefüllte Liposomen für Ultraschall-Untersuchungen. Nach der Literaturstelle werden Liposomen mit konventionellen Mitteln aber unter Zugabe eines Gases oder eines Gasvorläufers zu der wäßrigen Zusammensetzung hergestellt, wodurch der Kern der Liposomen entstand (Spalte 2, Zeilen 15–27).

**[0060]** Die Verwendung eines Gasvorläufers (Bicarbonat) wird in Beispielen 1 und 2 des Zitats detailliert beschrieben. Die Verwendung eines wäßrigen Trägers und die Zugabe von Gas, um das Gas in den Liposomen einzuschließen (von Ryan et al. nicht beispielhaft erläutert), setzt voraus, daß das Gas in Form von sehr kleinen Bläschen vorliegt, d.h. in einer Größe ähnlich oder kleiner als die Größe der Liposomen-Vesikel.

**[0061]** Wäßrige Medien, in die Luft in Form von sehr kleinen Bläschen (2,5 – 5  $\mu\text{m}$ ) eingeschlossen werden kann, werden in M.W. Keller et al., J. Ultrasound Med. 5 (1986), 413–498 offenbart.

**[0062]** Eine Menge von 126 mg Eilecithin und 27 mg Cholesterol wurden in 9 ml Chloroform in einer 200 ml Rundboden-Flasche gelöst. Die Lösung von Lipiden wurde in einem Rotationsverdampfer bis zur Trockenheit eingedampft, wodurch sich eine Schicht der Lipide an den Wänden der Flasche bildete. 10 ml einer 50 Gew.-%igen, wäßrigen Dextroselösung wurden für 5 min beschallt, nach M. W. Keller et al. (ibid), um Luftmikrobläschen darin herzustellen und die beschallte Lösung wurde in die Flasche gegeben, die die Lipidschicht enthielt, wobei das Schütteln des Behälters mit der Hand in einem Hydratisieren des Phospholipids und der Bildung von multilamellaren Liposomen in ber bläschenhaltigen Trägerflüssigkeit resultierte.

**[0063]** Nachdem sie für eine Weile stehengelassen wurde, wurde die resultierende Liposomen-Suspension einer Zentrifugation bei 5.000 g für 15 min unterworfen, um die Luft aus dem Träger zu entfernen, die nicht in Vesikeln eingeschlossen worden war. Es wurde ferner erwartet, daß während der Zentrifugation die Luftgefüllten Liposomen durch Auftriebskräfte an die Oberfläche wandern würden.

**[0064]** Nach Zentrifugation wurden die Behälter un-

tersucht und zeigten einen Rest am Boden, der aus Liposomen bestand, die agglomeriert und mit Dextrose gefüllt waren, und eine klare, überstehende Flüssigkeit in der im wesentlichen keine Bläschen waren. Die Menge an luftgefüllten Liposomen, die aufgrund der Auftriebskraft aufgestiegen waren, war vernachlässigbar gering und konnte nicht bestimmt werden.

#### Beispiel 11 (Vergleich)

**[0065]** Eine injizierbare Kontrast-Zusammensetzung wurde nach Ryan (US-A-4 900 540, Spalte 3, Beispiel 1) hergestellt. Eilecithin (126 mg) und Cholesterin (27 mg) wurden in 9 ml Diethylether aufgelöst. Zu der Lösung wurden 3 ml einer 0,2 molaren, wäßrigen Bicarbonat-Lösung gegeben und das resultierende Zweiphasen-System wurde beschallt, bis es homogen wurde. Die Mischung wurde in einem Rotationsverdampfer eingedampft und 3 ml einer 0,2 molaren, wäßrigen Bicarbonat-Lösung wurden dazugegeben.

**[0066]** Ein 1 ml Anteil der Liposomen-Suspension wurde in die Drosselvene eines Versuchskaninchens injiziert, wobei sich das Tier unter Bedingungen zur Ultraschalldarstellung des Herzens unter Verwendung eines Acuson 128-XP5-Ultraschall-Bildgebers (7,5 Übertragungssonde zur Darstellung des Herzens) befand. Die Sonde ermöglichte eine Querschnittsdarstellung des rechten und linken Ventrikels (mit Papillarmuskel). Nach der Injektion wurde eine geringe und vorübergehende (einige Sekunden) Steigerung im Umriß des rechten Ventrikels beobachtet. Der Effekt war jedoch wesentlich schlechter als der Effekt, der unter Verwendung von Präparaten nach Beispiel 4 beobachtet wurde. Keine Verbesserung in der Darstellung des linken Ventrikels wurde festgestellt, was darauf hindeutet, daß die CO<sub>2</sub>-beladenen Liposomen die Grenze der pulmonaren Kapillaren nicht passieren.

#### Patentansprüche

1. Injizierbare Suspension von Luft- oder Gas-Mikrobläschen, die durch eine Flüssigkeits-Gas-Grenzschicht begrenzt werden, in einer physiologisch verträglichen, wäßrigen Trägerphase, wobei die Luft- oder Gas-Mikrobläschen nicht in Liposomenvesikel verkapselt sind, geeignet zur Ultraschall-Echographie des Blutstroms oder von Körperhöhlräumen von Lebewesen, wobei die Suspension von etwa 0,01 bis etwa 20 Gew.-% gelöste oder dispergierte oberflächenaktive Stoffe enthält, **dadurch gekennzeichnet**, daß mindestens einer der oberflächenaktiven Stoffe ein filmbildendes Phospholipid ist, das in der Suspension zumindest teilweise in lamellarer oder laminarer Form vorliegt, und daß die Suspension kein Eisen(III)salz enthält.

2. Suspension gemäß Anspruch 1, in der das la-

mellare Phospholipid in Form von mono- oder pluri-molekularen Membranschichten vorliegt.

3. Suspension gemäß Anspruch 1, in der die Größe der meisten Mikrobläschen weniger als 50 µm, vorzugsweise weniger als 10 µm, beträgt.

4. Suspension gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, in der das Phospholipid aus Phosphatidsäure, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerin, Phosphatidylinositol, Cardiolipin und Sphingomyelin ausgewählt ist.

5. Suspension gemäß Anspruch 1, die zusätzlich Substanzen enthält, die aus Dicetylphosphat, Cholesterin, Ergosterin, Phytosterin, Sitosterin, Lanosterin, Tocopherol, Propylgallat, Ascorbylpalmitat, und butyliertem Hydroxytoluol ausgewählt sind.

6. Suspension gemäß einem der vorherstehenden Ansprüche, die zusätzlich gelöste Viskositätsverstärker oder Stabilisatoren enthält, die aus linearen oder vernetzten Poly- oder Oligosacchariden, Zuckern, hydrophilen Polymeren und jodierten Substanzen ausgewählt sind, in einem Gewichtsverhältnis zu den oberflächenaktiven Stoffen etwa zwischen 1:5 bis 100:1.

7. Suspension gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, die zusätzlich bis zu 50 Gew.-% nicht-laminare oberflächenaktive Stoffe enthält, die aus Fettsäuren, Estern und Ethern von Fettsäuren und Alkoholen mit Polyolen ausgewählt sind.

8. Suspension nach Anspruch 7, in der die Polyole Polyalkylenglykole, polyalkylierte Zucker und andere Kohlenhydrate, und polyalkyliertes Glycerin sind.

9. Suspension gemäß Anspruch 1, die 10<sup>7</sup> – 10<sup>8</sup> Mikrobläschen/ml, 10<sup>8</sup> – 10<sup>9</sup> Mikrobläschen/ml oder 10<sup>10</sup> – 10<sup>11</sup> Mikrobläschen/ml enthält.

10. Verfahren zur Herstellung von Suspensionen gemäß den Ansprüchen 1 bis 9, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:

(a) Auswahl von mindestens einem filmbildenden Phospholipid und Umwandlung desselben in lamellare Form;

(b) Kontaktieren des Phospholipides in lamellarer Form mit Luft oder einem adsorbierbaren oder einschließbaren Gas für eine Zeit, die ausreichend ist, damit die Luft oder das Gas von dem Phospholipid gebunden werden; und

(c) Mischen des Phospholipids in lamellarer Form mit einem wäßrigen, flüssigen Träger, wodurch eine stabile Dispersion von Luft- oder Gas-Mikrobläschen in dem flüssigen Träger gebildet wird.

11. Verfahren nach Anspruch 10, bei dem Schritt (c) vor Schritt (b) durchgeführt wird und letzterer durch Einleiten von unter Druck stehender Luft oder von unter Druck stehendem Gas in den flüssigen Träger und anschließendes Ablassen des Drucks erfolgt.

12. Verfahren nach Anspruch 10, bei dem Schritt (c) durch vorsichtiges Vermischen der Bestandteile durchgeführt wird, Schütteln ist nicht notwendig, wodurch die in Schritt (b) an den lamellaren, oberflächenaktiven Stoff gebundene Luft oder das Gas eine Suspension von stabilen Mikrobläschen bildet.

13. Verfahren nach den Ansprüchen 10 oder 11, bei dem der flüssige Träger gelöste, stabilisierende Bestandteile enthält, die aus wasserlöslichen Proteinen, Polypeptiden, Zuckern, Poly- und Oligosacchariden und hydrophilen Polymeren ausgewählt sind.

14. Verfahren nach Anspruch 10, bei dem die Umwandlung in Schritt (a) dadurch bewirkt wird, daß Partikel aus löslichen oder unlöslichen Materialien mit dem oberflächenaktiven Stoff beschichtet werden; Schritt (b) dadurch bewirkt wird, daß die beschichteten Partikel für eine gewisse Zeit unter Luft oder Gas belassen werden; und Schritt (c) dadurch bewirkt wird, daß die beschichteten Partikel mit einem wäßrigen, flüssigen Träger gemischt werden.

15. Verfahren nach Anspruch 10, bei dem die Umwandlung in Schritt (a) dadurch bewirkt wird, daß eine wäßrige Lösung von filmbildenden Lipiden beschallt oder unter hohem Druck homogenisiert wird, wobei dieses Vorgehen zumindest teilweise die Bildung von Liposomen bewirkt.

16. Verfahren nach Anspruch 15, bei dem Schritt (b) durch Gefriertrocknen einer Liposomen enthaltenden Lösung bewirkt wird, wobei letztere gegebenenfalls hydrophile Stabilisatoren enthält, und das resultierende gefriergetrocknete Produkt für eine gewisse Zeitdauer mit Luft oder einem Gas kontaktiert wird.

17. Verwendung einer trockenen pulverförmigen Formulierung, welche beim Auflösen in Wasser eine wäßrige Suspension von Mikrobläschen bildet, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens ein filmbildendes Phospholipid in lamellarer oder laminarer Form und wasserlösliche Stabilisatoren enthält, zur Herstellung von Kontrastmitteln für die Ultraschallechographie.

18. Verwendung nach Anspruch 17, bei der das Phospholipid aus Phosphatidsäure, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerin, Phosphatidylinositol, Cardiolipin und Sphingomyelin ausgewählt ist.

19. Verwendung nach den Ansprüchen 17 oder 18, weiter enthaltend Substanzen, ausgewählt aus Dicetylphosphat, Cholesterin, Ergosterin, Phytosterin, Sitosterin, Lanosterin, Tocopherol, Propylgallat, Ascorbylpalmitat und butyliertem Hydroxytoluol.

20. Verwendung nach Anspruch 17, bei der die Phospholipide in laminarer Form in Form feiner Schichten vorliegen, die auf der Oberfläche von löslichem oder unlöslichem, festem, partikulärem Material abgeschieden sind.

21. Verwendung nach Anspruch 20, bei der die löslichen Partikel aus wasserlöslichen Kohlenhydraten, Polysacchariden, synthetischen Polymeren, Albumin, Gelatine oder Iopamidol hergestellt sind.

22. Verwendung nach einem der Ansprüche 17 bis 21, bei der die Formulierung zusätzlich bis zu 50 Gew.-% nicht-laminare oberflächenaktive Stoffe enthält, die aus Fettsäuren, Estern und Ethern von Fettsäuren und Alkoholen mit Polyolen ausgewählt ist.

23. Verwendung nach Anspruch 17, bei der die Formulierung gefriergetrocknete Liposomen enthält.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen