(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 951210 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 951210

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
A61K 49/00

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **03.09.1993**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **15.03.1995**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **10.05.1995**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **03.09.1993 PCT/GB1993/001861**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

16.09.1992 GB 9219595
30.09.1992 GB 9220638
30.09.1992 GB 9220639

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Nycomed Imaging AS, Nyvoveien 2 0401 Oslo 4, Norge, NORJA, (NO)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Klaveness, Jo, Norge, NORJA, (NO)
2 •Rongved, Pål, Hellvik, NORJA, (NO)
3 •Johansen, John Henrik, Norge, NORJA, (NO)
4 •Foss, Per Antonius, Norge, NORJA, (NO)
5 •Hoegset, Anders, Norge, NORJA, (NO)
6 •Hvoslef, Anne Marie, Norge, NORJA, (NO)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Varjoaineisiin liittyviä parannuksia
Kontrastämnen rörande förbättringar

Varjoaineisiin liittyviä parannuksia

Tämä keksintö liittyy uudenlaisiin varjoaineisiin, erityisemmin uusiin kaasupitoisiin tai kaasua synnyttäviin varjoaineisiin, joita käytetään diagnostisissa kuvauksissa.

On tunnettua, että ultraäänikuvaus on mahdollisesti arvokas diagnostinen väline, esimerkiksi verisuoniston tutkimisessa, erityisesti sydänkuvauksissa ja kudosten hiussuonistoissa. Useita varjoaineita on ehdotettu parantamaan näin saatavia kuvia, sisältäen kiinteiden hiukkasten, emulgoitujen nestepisaroiden, kaasukuplien ja kapseloitujen kaasujen tai nesteiden suspensiot. On yleisesti tunnustettua, että alhaisen tiheyden varjoaineet, jotka ovat helposti kokoonpuristettavissa, ovat erityisen tehokkaita synnyttämänsä akustisen taustahajonnan ansiosta, ja näin ollen on esitetty huomattavaa mielenkiintoa kaasupitoisten ja kaasua kehittävien järjestelmien valmistamiseen ultraäänivarjoaineiksi.

Kaasupitoisten varjoaineiden tunnetaan olevan myös tehokkaita magneettiresonanssikuvauksessa (MR), esimerkiksi herkkyyttä varjostavina aineina, jotka toimivat alentaen MR-signaalin intensiteettiä. Happipitoiset varjoaineet ovat myös mahdollisesti käyttökelpoisia paramagneettisia MR-varjoaineita.

Lisäksi röntgenkuvauksen alueella on havaittu, että kaasuja kuten hiilidioksidia voidaan käyttää negatiivisena suun kautta käytettävänä varjoaineena.

Alkuperäiset tutkimukset, jotka koskivat fysiologisesti hyväksyttävien aineiden sydämensisäisellä injektiolla in vivo kehittyneitä vapaita kaasukuplia, ovat osoittaneet tällaisten kuplien mahdollisen tehokkuuden varjoaineina sydämen ultraäänikuvauksissa; tällaiset menetelmät ovat kuitenkin käytännössä erittäin rajoittuneita vapaiden kuplien lyhyen elinajan johdosta. Tämän mukaisesti on

esiintynyt kiinnostusta kaasukuplien stabilointimenetelmiin sydämen ultraäänikuvauksia ja muita ultraäänitutkimuksia varten esimerkiksi käyttäen emulgointiaineita, öljyjä, sakeuttimia tai sokereita.

Tulee huomioida, että sydänkuvauksen ultraäänisovellutuksia varten tällaiset kuplajärjestelmät eivät edullisesti saisi ylittää halkaisijaltaan 8 - 10 mikronia vapaan kulkeutumisen sallimiseksi hengityselimistön hiussuoniston läpi vasempaan eteiseen ja kammio-onteloon tarkoituksen ollessa helpottaa sydämen vasemman puolen ja sydänlihaksen näkymistä ultraäänikuvassa varjoaineen suonensisäisen ruiskutuksen jälkeen. Sydämen vasemman puolen tehokkaan kuvaamisen tarjoamiseksi tällaisilla kuplajärjestelmillä (joista jäljempänä käytetään nimitystä "mikrokuplat") tulee selvästi olla riittävä stabiilisuus in vivo, edullisesti useamman kuin yhden kiertokerran verran.

Samoin on myös ilmeistä, että ennalta muodostetuilla mikrokupla-varjoainejärjestelmillä on edullisesti hyvä varastointistabiilisuus, esimerkiksi valmistamisen keskeisellä paikalla ja jakelun sairaaloihin ja varastoimisen niissä jne. sallimiseksi ennen käyttöä.

Eräs alue, joka on vetänyt puoleensa huomattavan määrän tutkimuskapasiteettia, on proteiinikapseloitujen kaasumikrokuplien valmistaminen käytettäväksi ultraäänen varjoaineina. Kuten US-patenttihakemuksissa 4 718 433 ja 4 774 958 kuvataan, tällaisia aineita voidaan valmistaa esimerkiksi käsittelemällä ääniaalloilla viskoosia proteiiniliuosta mikrokuplajärjestelmän synnyttämiseksi ja termisesti tai kemiallisesti denaturoimalla ainakin osa kapseloivasta proteiinista mikrokuplien stabiloimiseksi. Terminen denaturointi voidaan saada aikaan lämmön tai yksinkertaisesti ääniaaltokäsittelyn aikana syntyneen lämmön käyttämisellä. Kemiallinen denaturointi saadaan aikaan proteiinin reaktiolla formaldehydin tai glutaarialdehydin kanssa esimerkiksi vesiliuoksessa pH-arvolla 4,5. Edulli-

nen proteiinipitoinen lähtöaine on 5-%:inen ihmisen albumiiniseerumi (HSA); sen käyttämisen sanotaan edistävän pienten mikrokuplien muodostumista, joiden halkaisija on pääasiassa välillä 2 - 4 mikronia. Tällä menetelmällä valmistettujen mikropallojen sanotaan olevan stabiileja varastossa 48 tuntia tai kauemmin.

EP-hakemusjulkaisu 0 324 938 kuvaa menetelmää yllä olevan tyyppisen parannetun proteiinikapseloidun mikrokuplajärjestelmän valmistamiseksi. Tämä menetelmä käsittää kaksivaiheisen ääniaaltokäsittelyn, jossa ääniaaltoja tuottava torvi upotetaan ensin proteiiniliuokseen mikrokuplajärjestelmän synnyttämiseksi ja sitten siirretään paikkaan pinnan yläpuolelle mutta hyvin lähelle liuoksen pintaa sen vaahdottamiseksi ja tekemiseksi aerosoliksi. Tämän sanotaan tuottavan väkevöidyn mikrokupladispersion kuplien pääasiallisen halkaisijan ollessa alle 10 mikronia, jonka dispersion sanotaan olevan stabiili 4 - 8 viikkoa tai kauemmin varastossa huoneenlämpötilassa, esimerkiksi lämpötilassa 20 - 25 °C. Jatkuvatoimista menetelmää, joka on tarkoitettu sopivaksi tällaisten proteiinikapseloitujen mikropallojen kaupalliseen tuotantoon, kuvataan EP-hakemusjulkaisussa 0 359 246.

HSA on jälleen edullinen proteiini yllä mainituille menetelmille ja sitä voidaan käyttää liuoksena pitoisuuksilla esimerkiksi 0,5 - 25 paino-% kaupallisesti saatavissa olevan 5 %:isen vesiliuoksen tai sen laimennettujen versioiden, esimerkiksi pitoisuuteen 0,5 - 3,0 paino-%, ollessa sopiva. HSA:a käytetään tällä tavoin koetuotteen Albunex^{R} valmistamiseksi, joka käsittää mikropalloja, joilla on ilma-mikrokuplakeskustat ja liukenemattomaksi tehdyt (eli denaturoidut) HSA-seinämät.

Vaikka tällaisilla tuotteilla on kohtuullinen in vitro-stabiilisuustaso varastoinnin aikana, kuten kuvataan yllä mainituissa EP-hekmusjulkaisu 0 324 938 ja EP-hekemusjulkaisu 0 359 246, niiden in vivo -stabiilisuudessa

koekappaleelle annostelemisen jälkeen on huomattu olevan parantamisen varaa. Täten esimerkiksi Shapiro et al. julkaisussa J. Am. Coll. Cardiol., 16(7) (1990), s. 1 603 - 1 607, ovat kertoneet toistettavuuden ja määritettävissä olevan sydänlihaksen heijastuksen puutteesta seuraten ääniaaltokäsiteltyjen HSA-ultraäänivarjoaineiden suonensisäistä ruiskutusta ihmisille.

Nämä tutkijat havaitsivat myös pikaisen alenemisen vasemman vatsaontelon varjostuksen intensiteetissä vasemman kammion pohjalla ja kärjessä aikaisessa systolivaiheessa, johon liittyi varjostuksen lähes täydellinen häviäminen systolivaiheen lopussa, ja he esittävät, että tämä johtuu luultavasti albumiinipinnoitettujen mikrokuplien tuhoutumisesta vasemman vatsaontelon korkean systolisen paineen ansiosta.

Samanlaisen havainnon sisältää julkaisussa WO 92/05 806, jossa esitetään, että kapseloivien membraanien vastaava jäykkyys EP-hekemusjulkaisun 0 324 938 mukaisesti tuotetuissa tuotteissa voi jahtaa niiden murtumiseen verivirrassa sydämen sykkeen aiheuttamien painevaihteluiden johdosta. Tämä julkaisu ehdottaa, että mahdollisia ultraäänimembraaneja voidaan valmistaa vaahdottamalla kalvonmuodostavan proteiinin vesiliuosta ja pienentämällä kaasukuplat halutulle kokoalueelle (esimerkiksi 0,5 - 10 mikronia, edullisesti 4 - 10 mikronia) kohdistamalla niihin leikkausvoima (esimerkiksi hankaamalla tai ääniaalto- tai ultraäänitäryttämällä). Tämä tuote voidaan stabiloida termisellä denaturoinnilla tai reaktiolla proteiinin kanssa reaktiivisen silloitusaineen kanssa, esimerkiksi aldehydin tai sulfidin kuten kysteiinin, joista formaldehydin ja glutaarialdehydin käyttämistä on kuvattu. Tuloksena olevilla tuotteilla ei kuitenkaan ole yksiselitteisesti pitkäaikaista varastostabiliteettia, ellei niitä pakastekuivata myöhempää uudelleen muodostamista varten vedellä tai muulla fysiologisesti hyväksyttävällä nesteellä - on ym-

märrettävää, että on tämän käyttämistä edeltävän uudelleen muodostustarpeen välttämisessä on huomattavia käytännön etuja.

Näin ollen on olemassa jatkuva tarve varjoaineista, jotka käsittävät proteiinikapseloituja kaasumikrokuplatai kaasua kehittäviä järjestelmiä, joilla on parantunut in vivo -stabiilisuus yhdistettynä hyvään varastointistabiilisuuteen.

Tämä keksintö perustuu muun muassa keksintöömme, että proteiinipohjaisten varjoaineiden stabiilisuutta voidaan parantaa huomattavasti, mikäli proteiinin annetaan reagoida bifunktionaalisen aldehydin kanssa, joka pystyy aiheuttamaan proteiinin silloittumisen mainitun reaktion ollessa suoritettu vesipohjaisessa väliaineessa oleellisen neutraalilla pH-arvolla. Tarkemmin, olemme yllättäen havainneet, että tällä tavoin saatavan stabiilisuuden parantumisen taso voi ylittää huomattavasti sen tason, mikä saadaan käyttämällä hapanta formaldehydin tai glutaarialdehydin vesiliuosta alan aikaisemman tietouden kuten yllä mainittujen US-patenttihakemuksien 4 718 433 ja 4 774 958 mukaisesti, erityisesti mikäli silloitusreaktio suoritetaan vesipohjaisessa väliaineessa, joka on puskuroitu oleellisen neutraaliin pH-arvoon.

Termi "oleellisen neutraali pH" tässä käytettynä tarkoittaa pH:n keskialuetta, joka ei ole selvästi hapan tai emäksinen, esimerkiksi pH-alue 5 - 9.

Täten tämän keksinnön yhden muodon mukaisesti tarjoamme varjoaineita, jotka käsittävät kaasun tai kaasun esiasteen mikrokuplia kapseloituna proteiinikuoreen, joka on silloitettu reaktiolla vesipitoisessa väliaineessa oleellisen neutraalissa pH-arvossa bifunktionaalisen aldehydin kanssa, joka pystyy aiheuttamaan proteiinin silloittumisen.

Proteiinikomponentti voi olla mikä tahansa proteiini tai sen johdannainen sisältäen polyaminohapot. Albumii-

ni, gelatiini ja γ-globuliini ovat edustavia yhdisteitä ihmisen albumiiniseerumin käyttämisen ollessa edullista. Tällaisia proteiineja voidaan saada biologisista lähteistä, esimerkiksi ihmisen tai eläimen verestä, tai valmistaa alemmilla organismeilla käyttäen rekombinointitekniikkaa. Tyypillistä ihmisen albumiiniseerumin valmistusmenetelmää fermentoinnilla kuvataan julkaisussa WO 90/02 808.

Kapseloitu proteiini on edullisesti ainakin osittain denaturoitu, esimerkiksi termisen käsittelyn tuloksena (joka voi olla esimerkiksi suoraan aiheutettu ääniaaltokäsittelyllä), samoin se on silloittunut tämän keksinnön mukaisesti. Tämän keksinnön varjoaineita voidaan täten saada sopivasti silloittamalla esimuodostettuja ääniaalloilla käsiteltyjä proteiinipohjaisia varjoaineita, esimerkiksi ääniaalloilla käsiteltyjä albumiinituotteita kuten Albunex^{R}. Bifunktionaalisia aldehydejä, joita voidaan käyttää stabiloimaan tämän keksinnön ultraäänivarjoaineita, ovat dialdehydit ja α,ß-tyydyttymättömät aldehydit. Edustavia dialdehydejä ovat alifaattiset dialdehydit, jotka esimerkiksi sisältävät jopa 10 hiiliatomia, kuten glutaarialdehydi, adipaldehydi ja 1,8-oktaanidiaali, ja niiden substituoidut johdannaiset kuten 2-hydroksiadipaldehydi. Edustavia α,ß-tyydyttymättömiä aldehydejä ovat α,ß-tyydyttymättömät alifaattiset aldehydit, jotka sisältävät jopa 10 hiiliatomia, esimerkiksi C_{3-8}-2-alkenaalit kuten akroleiini (eli 2-propenaali), metakroleiini (eli 2-metyyli-2-propenaali), krotonialdehydi (eli 2-butenaali), 2-pentenaali ja 2-heksenaali, ja niiden substituoidut johdannaiset kuten 3-dimetyyliaminoakroleiini.

Tämän keksinnön lisämuodon mukaisesti varjoaineita voidaan edullisesti stabiloida lisää reaktiolla pelkistimen kanssa, joka toimii pelkistäen Schiff'n emäksen (esimerkiksi boorihydridireagenssi kuten natriumboorihydridi tai natriumsyaanoboorihydridi) kaksoissidoksen, kuten jäljempänä yksityiskohtaisemmin kuvataan.

Tämän keksinnön lisämuodon mukaisesti tarjoamme menetelmän mikrokuplavarjoaineen valmistamiseksi, joka käsittää proteiinin silloittamisen reaktiolla vesipohjaisessa väliaineessa oleellisen neutraalilla pH-arvolla bifunktionaalisen aldehydin kanssa, joka pystyy aiheuttamaan proteiinin silloittumisen, kaasun tai kaasun esiasteen, joka on kapseloitu mainitun proteiinin sisään ennen mainittua silloittumisreaktiota, sen aikana tai sen jälkeen.

Mitä tahansa bioyhteensopivaa kaasua voidaan käyttää tässä menetelmässä ja tämän keksinnön varjoaineissa, esimerkiksi ilmaa, typpeä, happea, vetyä, ilokaasua, hiilidioksidia, heliumia, argonia, rikkiheksafluoridia ja alhaisen molekyylipainon vaihtoehtoisesti fluorattuja hiilivetyjä kuten metaania, asetyleeniä tai hiilitetrafluoridia. Kaasu voi olla vapaana mikrokuplan sisällä tai se voi olla pidättävän aineen ympäröimä tai absorboima. Termi "kaasu" tässä käytettynä tarkoittaa kaikkia aineita, jotka ovat kaasumaisessa muodossa lämpötilassa 37 °C.

Kaasun esiasteita ovat karbonaatit ja bikarbonaatit, esimerkiksi natrium- tai ammoniumbikarbonaatti ja aminomalonaattiesterit.

Ultraäänisovellutuksiin kuten sydämen ultraäänikuvauksiin vapaan kulkeutumisen sallimiseksi hengityselimistön läpi ja resonanssin saamiseksi edullisella kuvaustaajuudella noin 0,1 - 15 MHz, voi olla sopivaa valmistaa ja käyttää mikrokuplia, joiden keskimääräinen koko on 0,1 - 10 µm, esimerkiksi 1 - 7 µm. Oleellisesti suuremmat kuplat, esimerkiksi keskimääräiseltä kooltaan jopa 500 µm, voivat kuitenkin olla käyttökelpoisia muissa sovellutuksissa, esimerkiksi ruoansulatuselimistön kuvauksissa tai kohdun tai munanjohtimien tutkimuksissa.

Mikrokuplajärjestelmien kehittyminen voidaan saada aikaan millä tahansa tavanomaisella keinolla, esimerkiksi millä tahansa alalla aiemmin kuvatuista sopivista menetelmistä. Täten esimerkiksi kaasu voidaan sulkea proteiini-

liuokseen yksinkertaisesti sekoittamalla voimakkaasti liuosta kaasun läsnäollessa, eli luomalla kaasu-nesteessäemulsion, esimerkiksi kuten kuvataan US-patenttihekemuksessa 4 684 479. Toinen hyvin tunnettu menetelmä käsittää kaasun johtamisen ruiskulla proteiiniliuokseen. Kuten kuvataan US-patenttihekemuksessa 3 900 420, mikrokaasuemulsio voidaan synnyttää käyttämällä laitetta kaasun nopeaksi syöttämiseksi nopeasti virtaavaan nesteeseen; täten alhaisen paineen alue kehittyy nesteeseen, joka tässä tapauksessa on proteiiniliuos, johon kaasua syötetään, ja näin saatu kaasu-nesteessä-järjestelmä pumpataan ulos laitteesta.

Käyttämällä elektrolyysiä on mahdollista synnyttää kaasua sulkeutumaan suoraan astiassa, joka sisältää proteiiniliuosta. Elektrolyysiin tarvittavat elektrolyytti tai elektrolyytit voivat lisäksi auttaa stabiloimaan proteiinikapseloituja mikrokuplia. Vesiliuos, joka sisältää yhtä tai useampaa elektrolyyttiä, kehittää tyypillisesti vetykaasua katodilla ja happea anodilla; hydratsiinia lisäämällä anodilla voidaan kehittää typpikaasua. Elektrodit voivat olla erotettuja suolasillalla. Käyttämällä Kolben reaktiota voidaan kehittää myös CO_2:a karboksyylihapoista käyttämällä elektrolyysiä.

Edullinen kaasumikrokuplajärjestelmän kehittämismenetelmä käsittää proteiiniliuoksen ääniaaltokäsittelemisen kapseloitavan kaasun läsnä ollessa (esimerkiksi sen sisällä), kuten esimerkiksi kuvataan yllä mainituissa patenttihakemuksissa. US-patenttihakemus 4 718 433, US-patenttihakemus 4 774 958, EP-hakemusjulkaisu 0 324 938 tai EP-hakemusjulkaisu 0 359 246. Tällaisten ääniaaltomenetelmien eräs etu on se, että niitä voidaan käyttää aiheuttamaan kapseloidun proteiinin hallitun asteinen denaturoituminen halutun mikrokuplien kehittymisen lisäksi parantaen näin lopputuotteen stabiilisuutta.

Proteiinin silloittuminen tämän keksinnön mukaisesti saadaan sopivasti aikaan käyttämällä proteiinin liuosta tai suspensiota vedessä tai edullisemmin vesipohjaisessa puskuriliuoksessa. Aldehydiä voidaan käyttää puhtaassa nestemäisessä muodossa tai liuoksena vedessä tai veteen sekoittuvassa liuottimessa, esimerkiksi alemmassa alkanolissa kuten etanolissa, esimerkiksi antaen 50-%:isen liuoksen; käytettävän aldehydin määrä on sopivasti noin 2 - 50-kertainen suhteessa proteiiniin.

Silloittumisreaktio voidaan suorittaa esimerkiksi huoneenlämpötilassa tai kuumentaen, vaikkakin reaktiolämpötilalle ei ole toivottua ylittää lämpötilaa noin 60 °C, koska tämä voi edistää ei-toivottua ja ylimääräistä proteiinin denaturoitumista. Reaktioväliaineelle käytetään edullisesti hyvin varovaista sekoitusta, esimerkiksi pyörivää kolvia. Reaktioajat ovat tyypillisesti välillä 1 minuutti - 24 tuntia.

Silloittumisreaktio voidaan esimerkiksi suorittaa pH-arvossa 5 - 9, edullisesti 6 - 8, kuten 7. Kun reaktio aiheutetaan vesipohjaisessa puskurissa, voidaan käyttää yleisesti mitä tahansa sopivaa puskurijärjestelmää, esimerkiksi siten kun alalla on tavanomaista. Täten esimerkiksi sitraatti/natriumhydroksidijärjestelmää voidaan käyttää antamaan pH:ksi noin 5 tai 6, fosfaattipuskuroitua suolaliuosta voidaan käyttää antamaan pH:ksi noin 7, boraatti/suolahappojärjestelmää voidaan käyttää antamaan pH:ksi noin 8 ja boraatti/kaliumkloridi/natriumhydroksidijärjestelmää voidaan käyttää antamaan pH:ksi noin 9.

Haluamatta ajautua teoreettisiin pohdintoihin uskotaan, että käytettäessä α,β-tyydyttymätöntä aldehydiä silloittumisreaktio käsittää muun muassa proteiinissa olevien primaaristen amiiniryhmien nopean Michael-tyypin addition α,β-kaksoissidoksen β-hiiliatomiin ja hitaamman reaktion aldehydiryhmän ja toisten proteiinin primaaristen amiiniryhmien välillä, mikä johtaa niinsanotun Schiff'n emäksen

muodostumiseen, joka sisältää -CH=N-sidoksia ja/tai tuotteita, jotka sisältävät -CH(OH)-NH-sidoksia (katso esimerkiksi havainnot julkaisusta Sebenik et al., Polymer 31 (1990), s. 130 - 134). Käytettäessä dialdehydejä silloittumisen uskotaan etenevän pääasiassa tällaisten -CH=N- ja -CH(OH)-NH-sidosten muodostumisen kautta.

Kuten yllä osoitetaan, silloittunut proteiini voi edullisesti reagoida edelleen pelkistimen kanssa, joka toimii pelkistäen Schiff'n emäksen kuten natriumboorihydridin tai natriumsyaanoboorihydridin kaksoissidoksen; tällaisia pelkistimiä käytetään sopivasti noin 2 - 5-kertaisesti verrattuna silloittumiseen käytettävän aldehydin määrään. Tämä reaktio suoritetaan sopivasti vaihtoehtoisesti puskuroidussa pH-arvossa 5 - 9, edullisesti 6 - 8 kuten pH 7, ja voidaan haluttaessa suorittaa samanaikaisesti silloittumisreaktion kanssa; täten pelkistin voidaan lisätä proteiiniliuokseen tai -suspensioon ennen aldehydin lisäämistä.

Silloittumisreaktio ja mahdollinen pelkistysreaktio suoritetaan edullisesti proteiinipitoisessa materiaalissa, johon kaasu tai kaasun esiaste on jo kapseloitu, erityisesti sellaisissa materiaaleissa, joissa on tapahtunut alustavaa stabiloitumista kapseloidun proteiinin hallitun denaturoimisen tuloksena. Käyttökelpoisia proteiinilähtöaineita silloittumisreaktioille ovat esimuodostetut ääniaaltokäsitellyt proteiinipohjaiset ultraäänivarjoaineet, esimerkiksi ääniaaltokäsitellyt albumiinituotteet kuten Albunex^{R}.

Tällaiset esimuodostetut proteiinimateriaalit, joista jäljempänä käytetään nimitystä "mikropallot", pestään edullisesti ennen silloittamista kapseloitumattoman proteiinin poistamiseksi, joka voisi muutoin saostua tarpeettomasti silloittumisreaktiossa. Tämä voidaan aiheuttaa esimerkiksi pesemällä mikropallot vedellä 3 tai 4 kertaa, antamalla mikropallojen kellua kunkin pesuvaiheen jälkeen

ja poistamalla alla oleva pesuvesi käyttämällä esimerkiksi pipettiä. Sitten mikropallojen suspensio esimerkiksi vedessä tai sopivassa puskuriliuoksessa voidaan alistaa reaktioon aldehydin ja haluttaessa pelkistimen kanssa esimerkiksi pöyrivässä kolvissa, ja tämän jälkeen pestä esimerkiksi vedellä reagoimattoman aldehydin ja mahdollisen pelkistimen poistamiseksi.

Silloittumisreaktion tuote voi sisältää aldehydiryhmiä mikrokuplien pinnoilla (katso esimerkiksi Pharmaceutical Research 9(6) (1992), s. 776, ja J. Pharm. Sci. 7(12) (1982), s. 1 323). Tällaiset aldehydiryhmät muuttuvat hydroksimetyyliryhmiksi, kun silloittunut tuote alistetaan pelkistysreaktiolle. Vaihtoehtoisesti ne voivat reagoida amiinin kanssa, jota edullisesti käytetään runsaasti ylimäärin, mikä johtaa Schiff'n emäksen muodostumiseen, joka voidaan haluttaessa tämän jälkeen käsitellä pelkistimellä, joka toimii pelkistäen siinä olevat -CH=N- kaksoissidokset, esimerkiksi kuten yllä on kuvattu. Bifunktionaalisen amiinin käyttäminen sallii aldehydiryhmittymän korvaamisen valinnan mukaisella funktionaalisella ryhmällä; täten esimerkiksi reaktio aminohapon kanssa johtaa karboksyyliryhmien liittämiseen, reaktio aminoalkoholin kanssa johtaa hydroksyyliryhmien liittämiseen ja reaktio diamiinin kanssa johtaa aminoryhmien liittämiseen.

Olemme lisäksi havainneet, että tämän keksinnön mukaisten kaasupitoisten varjoaineiden sekä in vitro että in vivo -stabiilisuutta voidaan vielä parantaa, mikäli mikrokuplat alistetaan kokojakauman muunnokselle samoin kuin silloittumiselle ja mahdolliselle kemialliselle pelkistysreaktiolle, termin "koon pienentäminen" ollessa käytetty tässä merkitsemään mikrokuplien keskikoon pienentymistä. Tällainen kokojakauman muunnos voi sisältää esimerkiksi mikrokuplien keskikoon pienentämisen ja/tai mikrokuplien kokojakauman kaventamisen, ja se voidaan aiheuttaa ennen silloittumis- ja mahdollista kemiallista pelkistysreakti-

ota, niiden aikana tai edullisemmin niiden jälkeen. Varjoaineet, jotka sisältävät tällaisia kokojakaumaltaan muunnettuja mikrokuplia, muodostavat tämän keksinnön lisämuodon.

Eräs kokojakauman muunnosmenetelmä, jota voidaan käyttää, käsittää ulkoisen kaasupaineen (esimerkiksi ilma tai happi) kohdistamisen mikrokupliin tai edullisemmin niiden suspensioon esimerkiksi vedessä tai puskurissa kuten fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa. Täten esimerkiksi kaasutäytteisten mikrokuplien suspensio voidaan käsitellä kaasulla paineessa esimerkiksi 20 - 100 kPa, hyödyllisesti 30 - 80 kPa, edullisesti 60 - 70 kPa; tämä käsittely voidaan suorittaa huoneenlämpötilassa paineastiassa esimerkiksi 30 sekunnin - 5 minuutin, edullisesti noin 1 minuutin ajan.

Vaihtoehtoisesti kaasutäytteisten mikrokuplien kokojakauma voidaan muuntaa käsittelemällä nesteellä, johon kaasusisältö on liukoinen, esimerkiksi vedellä tai puskurilla kuten fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella ilmalla täytettyjen mikrokuplien tapauksessa, esimerkiksi sekoittamalla varovasti mikrokuplia tällaisessa nesteessä esimerkiksi pyörivässä kolvissa. Kokojakauman muunnoksen laajuutta säätelevät sekä käytettävän nesteen tilavuus verrattuna mikrokuplien kaasutilavuuteen että nesteeseen liuennut kaasumäärä, sen kasvaessa ensimmäisen kasvaessa ja laskiessa jälkimmäisen kasvaessa; näitä muuttujia voidaan näin ollen säätää antamaan haluttu kokojakauman muunnoksen taso.

Kokojakauman muunnoksen kuten sellaisen, että mikrokuplien keskitilavuutta pienennetään 40 - 60 %, esimerkiksi noin 50 %, on havaittu antavan erityisen parantuneen stabiilisuuden yhdistettynä akustisen vaimentumisen korkeisiin tasoihin käytettäessä näitä tuotteita ultraäänen varjoaineina. Täten esimerkiksi tällaiset tämän keksinnön kokojakaumaltaan muunnettujen varjoaineiden on havaittu

antavan voimakkaan parannuksen sekä valtimoiden että suonien Doppler-signaaleissa kaneilla.

Tämän keksinnön mukaiset kokojakaumaltaan muunnetut varjoaineet ovat siis tunnettuja korkeasta in vitro -stabiilisuudesta eivätkä esimerkiksi osoita minkäänlaista varjostusvaikutuksen häviämistä 90 sekunnin aikana tavallisissa ultraäänen varjostusvaikutuksen in vitro -kokeissa.

Käyttämällä tällaisia kokojakauman muunnosmenetelmiä on mahdollista valmistaa silloittuneita proteiinipitoisia varjoaineita, joissa oleellinen pääosa, esimerkiksi vähintään 85 %, edullisesti vähintään 90 %, mikrokuplista on kooltaan jopa 4 µm loppujen ollessa kooltaan välillä 4 - 10 µm; tätä voidaan verrata esimerkiksi varjoaineisiin, joista esimerkkejä annetaan US-patenttihakemuksessa 4 718 433, joissa noin 20 % mikrokuplista on kooltaan yli 4 µm. Silloittuneet proteiinikapseloidut kaasumikrokuplavarjoaineet, joilla on tällainen kokojakauma, ovat uudenlaisia tuotteita, jotka ovat erityisen käyttökelpoisia esimerkiksi ultraäänimenetelmissä kuten sydämen ultraäänikuvauksessa ja muodostavat tämän keksinnön lisämuodon. Niitä voidaan valmistaa muista silloittuneista proteiinipohjaisista mikrokuplia sisältävistä varjoaineista kuin niistä, jotka on stabiloitu silloittamalla tämän keksinnön mukaisesti bifunktionaalisilla aldehydeillä, esimerkiksi biohajoavasti silloittuneista proteiinikapseloiduista mikrokuplavarjoaineista kuten kuvataan ulkaisussa WO 92/17 213.

Yleisesti tämän keksinnön mukaisesti valmistettujen tuotteiden lukumäärä ja kokojakauma voidaan määrittää esimerkiksi Coulter-laskinlaitteella. Näillä tiedoilla voidaan muodostaa standardisoituja mikropallosuspensioita, jotka sisältävät ennalta määrätyn kaasutilavuuden suspension yksikkötilavuutta kohti.

Tämän keksinnön varjoaineita voidaan käyttää erilaisissa diagnostisissa kuvausmenetelmissä sisältäen ultraääni-, MR- ja röntgenkuvauksen. Niiden käyttäminen diagnostisessa ultraäänikuvauksessa ja MR-kuvauksessa, esimerkiksi herkkyyttä varjostavina aineina, muodostaa tämän keksinnön edulliset muodot.

Seuraavat ei-rajoittavat esimerkit toimivat kuvaillen keksintöä. Kaikki lämpötilat ovat Celsius-asteina (°C). MIkropallojen lukumääräpitoisuudet lähtöaineina käytettävissä Albunex^R -suspensioissa olivat yleensä välillä 5 - 9 x 10^8/ml.

Esimerkki 1

Akroleiinin 50-%:ista etanoliliuosta (30 µl) lisättiin lasiampullissa vedellä pestyjen Albunex^R -mikropallojen steriili vesi-suspensioon (3 ml) ja ampullia keinutettiin varovasti tavallisella keinusekoittimella 4 tuntia.

Saatu mikropallosuspensio lajiteltiin Coulter counter-mittauksilla; mikropallojen suhteellinen kaasutilavuus laskettiin ja suspensio vakioitiin säätämällä sen tilavuus arvoon, jossa kaasutilavuus oli identtinen vertailususpension kanssa, joka oli käsittelemätön Albunex^R -mikropallosuspensio ennen kaikuvuusmittauksien suorittamista.

Esimerkit 2 - 6

Esimerkin 1 menettely toistettiin paitsi että akroleiini korvattiin seuraavassa taulukossa luetelluilla aldehydeillä:

Esimerkki	Reagenssi µl	Kaasutil. %	Reagenssi (50 % etanolissa)
1	30	89	Akroleiini
2	30	85	Krotonialdehydi
3	30	13	2-heksenaali
4	30	71	Glutaarialdehydi*
5	15	33	2-hydroksiadipaldehydi*
6	15	55	1,8-oktaanidiaali

* 25 % H_2O:ssa.

Esimerkki 7

Akroleiinin 50-%:ista etanoliliuosta (30 µl) lisättiin lasiampullissa vedellä pestyjen Albunex^R -mikropallojen steriili vesi-suspensioon (3 ml) ja ampullia keinutettiin varovasti tavallisella keinusekoittimella 4 tuntia. Natriumsyaanoboorihydridiä (30 µl varastoliuosta, joka on valmistettu liuottamalla 50 mg pelkistintä 500 µl:aan vettä) lisättiin yhtenä eränä ampullin pohjalle käyttäen mikropipettiä, ja ampullia keinutettiin yli yön.

Saatu mikropallosuspensio lajiteltiin Coulter counter-mittauksilla; mikropallojen suhteellinen kaasutilavuus laskettiin ja suspensio vakioitiin säätämällä sen tilavuus arvoon, jossa kaasutilavuus oli identtinen vertailususpension kanssa, joka oli käsittelemätön Albunex^R -mikropallosuspensio ennen kaikuvuusmittauksien suorittamista.

Esimerkit 8 - 12

Esimerkin 7 menettely toistettiin paitsi että akroleiini korvattiin seuraavassa taulukossa luetelluilla aldehydeillä:

Esimerkki	Reagenssi µl	Pelkistin µl	Kaasutil. %	Reagenssi (50 % etanolissa)
7	30	30	100	Akroleiini
8	30	30	98	Krotonialdehydi
9	30	30	44	2-heksenaali
10	30	30	91	Glutaarialdehydi*
11	15	15	61	2-hydroksiadipaldehydi*
12	15	15	59	1,8-oktaanidiaali

* 25 % H_2O:ssa.

Esimerkki 13

Vedellä pestyjen Albunex^R -mikropallojen (3 µl) suspension annettiin seistä 1 tunnin ajan lasiampullissa, minkä jälkeen 2,5 ml kelluvien mikropallojen alapuolista nestettä otettiin pois käyttäen pipettiä, ja lisättiin 2,5 ml pH-arvoon 7 fosfaattipuskuroitua suolaliuosta. Ampullia keinutettiin varovasti tavallisella keinusekoittimella 5 minuuttia mikropallojen uudelleensuspendoitumisen edistämiseksi. Akroleiinin 50-%:ista etanoliliuosta (30 µl) lisättiin ampullin pohjalle käyttäen pipettiä, ja ampullia keinutettiin 4 tuntia. Natriumsyaanoboorihydridiä (30 µl varastoliuosta, joka on valmistettu liuottamalla 50 mg pelkistintä 500 µl:aan vettä) lisättiin, ja ampullia keinutettiin yli yön.

Saatu mikropallosuspensio lajiteltiin Coulter counter-mittauksilla; mikropallojen suhteellinen kaasutilavuus laskettiin ja suspensio vakioitiin säätämällä sen tilavuus arvoon, jossa kaasutilavuus oli identtinen vertailususpension kanssa, joka oli käsittelemätön Albunex^R -mikropallosuspensio ennen kaikuvuusmittausten suorittamista.

Esimerkit 14 - 21

Esimerkin 13 menettely toistettiin paitsi että akroleiini korvattiin seuraavassa taulukossa luetelluilla aldehydeillä:

Esimerkki	Reagenssi µl	Pelkistin µl	Kaasutil. %	Reagenssi (50 % etanolissa)
13	30	30	71	Akroleiini
14	30	30	66	Metakroleiini
15	50	50	100	Krotonialdehydi
16	30	30	6	2-pentenaali
17	30	30	5	2-heksenaali
18	30	30	14	3-dimetyyliamino-akroleiini
19	30	30	71	Glutaarialdehydi*
20	30	30	55	2-hydroksiadipaldehydi*
21	30	30	8	1,8-oktaanidiaali

* 25 % H_2O:ssa.

Esimerkki 22

Esimerkin 13 menettely toistettiin paitsi että natriumsyaanoboorihydrodiliuosta ei lisätty.

Esimerkit 23 - 26

Esimerkin 22 menettely toistettiin paitsi että akroleiini korvattiin seuraavassa taulukossa luetelluilla aldehydeillä:

Esimerkki	Reagenssi µl	Kaasutil. %	Reagenssi (50 % etanolissa)
22	30	80	Akroleiini
23	30	83	Krotonialdehydi
24	30	67	Glutaarialdehydi*
25	15	8	2-hydroksiadipaldehydi*
26	30	10	1,8-oktaanidiaali

* 25 % H_2O:ssa.

Yllä olevien vakioitujen suspensioiden in vitro -kaikuvuus ja -stabiilisuus määritettiin laimentamalla kukin suspensio 7 ml:lla Isoton II-liuosta (Coulter Electronics Limited, Luton, Englanti), jonka kaasupitoisuus on samanlainen kuin ihmisen suonissa virtaavan veren. Kunkin suspension akustinen välityskyky mitattiin ajan funktiona alkaen välittömästi laimennuksen jälkeen ja käyttäen 3,5 MHz muunninta.

Signaalin stabiloinnin jälkeen kaikilla testatuilla tuotteilla oli parempi kaikuvuus kuin vertailususpensiolla, joka oli käsittelemätön Albunex^R -mikropallosuspensio.

Vastaava koe suoritettiin toistaen esimerkin 13 menettely, mutta käyttäen formaldehydin 33-%:ista vesiliuosta akroleiinin etanoliliuoksen sijasta. Saadulla tuotteella oli minimaalinen in vitro -kaikuvuus signaalin stabiloinnin jälkeen.

Esimerkki 27

Albunex^R -mikropallot pestiin kolme kertaa pH-arvoon 7 fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella ja uudelleen suspendoitiin fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen (30 ml) lasiampullissa. Lisättiin glutaarialdehydin 25-%:ista vesiliuosta (300 µl) ja ampullia keinutettiin 20 tuntia huoneenlämpötilassa.

Näin saadut silloittuneet mikropallot altistettiin kokojakauman muunnokselle joko (i) lisäämällä fosfaatti-

puskuroidussa suolaliuoksessa olevaa kyllästettyä ilmaliuosta (valmistettu seisottamalla fosfaattipuskuroitua suolaliuosta vesihauteessa lämpötilassa 37 °C yli yön sekoittaen varovasti ylimääräisten kaasukuplien poistamiseksi, ja jonka pO_2 on noin 21 kPa) ja inkuboimalla tätä ampullia keinuttimessa 3 tuntia huoneenlämpötilassa; (ii) lisäämällä fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa olevaa osittain kaasupoistettua ilmaliuosta (valmistettu poistamalla kaasua kohdan (i) kyllästetystä liuoksesta 1 tunti lämpötilassa 37 °C, ja jonka pO_2 on noin 10 kPa) inkuboimalla tätä ampullia keinuttimessa 3 tuntia huoneenlämpötilassa; tai (iii) asettamalla mikropallosuspensio paineastiaan, käyttämällä ilmanpainetta 1 minuutin ajan, uudelleensuspendoimalla mikropallot fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa ampullissa ja keinuttamalla ampullia 5 minuutin ajan homogeenisen suspension antamiseksi.

Liuosten tilavuudet (suhteessa mikropallosuspension tilavuuteen) ja käytetyt ilmanpaineet ja mikropallojen kaasun tilavuuspitoisuudet on annettu seuraavassa taulukossa:

Menetelmä	**Tilavuus/ paine**	**Mikropallojen tilavuuspitoisuus (%)**	**Korjattu mikropallojen tilavuuspitoisuus laimentamista varten (%)**
-	-	1,76	1,76
(i)	2 tilav	0,84	1,68
(i)	5 tilav	0,17	0,85
(i)	9 tilav	0,08	0,72
(ii)	1,5 tilav	0,85	1,28
(ii)	2 tilav	0,42	0,84
(ii)	3 tilav	0,14	0,42
(iii)	26 kPa	1,30	1,30
(iii)	66 kPa	0,73	0,73

Kaikuvuusmittaukset suoritettiin mikropallosuspensioilla, jotka oli vakioitu sisältämään samat kaasutilavuudet. Optimaalisen kokojakaumamuunnoksen, eli joka antoi vakaan akustisen vaimennuksen mahdollisimman korkealla tasolla, havaittiin olevan noin 50-%:inen mikropallotilavuuden pieneneminen, esimerkiksi kuten saadaan lisäämällä noin 5 tilavuutta kyllästettyä fosfaattipuskuroitua suolaliuosta tai 2 tilavuutta osittain kaasupoistettua fosfaattipuskuroitua suolaliuosta tai käyttämällä 66 kPa:n ilmaylipainetta. Suurempien tilavuuksien fosforipuskuroitua suolaliuosta lisääminen tai korkeampien paineiden käyttäminen antoi mikropalloja, joilla oli hyvä stabiilisuus mutta alentunut akustinen vaimennuskyky, ylimääräisen tilavuuden/paineen käyttämisen johtaessa mikropallojen luhistumiseen ja sitä seuraavaan akustisen vaimennuskyvyn häviöön.

Esimerkki 28

Valmistettiin kokojakaumamuunnettuja mikropalloja esimerkin 27 menetelmän (iii) mukaisesti käyttäen ilmapainetta 66 kPa. Tuloksena olevat mikropallot pestiin kolme kertaa fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella ja väkevöitiin kelluttamalla/alle jäävän liuoksen poistamisella. Mikropallojen fysikaaliset ominaisuudet (a) ennen kokojakaumamuunnosta, (b) kokojakaumamuunnoksen jälkeen, (c) pesemisen jälkeen ja (d) väkevöinnin jälkeen esitetään seuraavissa taulukoissa:

Vaihe	Mikropallojen pitoisuus (10^8/ml)	Keskihalkaisija (µm)	Mikropallojen tilavuuspitoisuus (%)
(a)	8,59	2,99	2,75
(b)	8,75	2,41	0,96
(c)	3,01	2,50	0,35
(d)	23,6	2,64	3,16

Vaihe	Alkuperäinen akustinen vaimennuskyky (dB/cm)	Akustinen vaimennuskyky 90 sekunnin päästä (dB/cm)
(a)	15,5	8,4
(b)	11,5	11,7
(c)	9,5	10,1
(d)[1]	15,1	15,7
(d)[2]	10,0	10,4

[1] käyttäen kaasutilavuutta 0,5 µl

[2] käyttäen kaasutilavuutta 0,3 µl

Vaihe	Kokojakauma	
	0 - 4 µm (%)	4 - 10 µm (%)
(a)	79	21
(b)	95	5
(c)	94	6
(d)	92	8

Esimerkki 29

Albunex^{R} -mikropallot pestiin kolme kertaa pH-arvoon 7 fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella ja uudelleen suspendoitiin fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen (30 ml) lasiampullissa. Lisättiin krotonialdehydin 50-%:ista etanoliliuosta (300 µl) ja ampullia keinutettiin 20 tuntia huoneenlämpötilassa. Lisättiin natriumsyaanoboorihydridiä (300 µl varastoliuosta, joka on valmistettu liuottamalla 100 mg pelkistintä 1 ml:aan vettä) ja ampullia keinutettiin vielä tunti huoneenlämpötilassa.

Näin saadut silloittuneet mikropallot altistettiin kokojakauman muunnokselle käyttäen esimerkissä 27 kuvattuja menetelmiä ja niiden havaittiin antavan vastaavat tulokset kuin kokojakaumamuunnetut glutaarialdehydisilloittuneet mikropallot.

Esimerkki 30

Isoton II:sta (250 ml) korkillisessa 500 ml astiassa asetettiin vesihauteeseen lämpötilaan 37 °C ja kyllästettiin ilmalla yli yön sekoittaen magneettisekoittajalla. Tämän jälkeen astia asetettiin magneettisekoittajalle huoneenlämpötilassa ja sekoitettiin nopeudella 250 - 300 rpm. 5 minuutin kuluessa astian poistamisesta vesihauteesta glutaarialdehydi-silloittunuttaalbumiinimikropallosuspensiota, joka on valmistettu kuten kuvataan esimerkissä 24 käyttäen 300 µl lähtöainetta ja jonka kaasutilavuus oli 25 % (30 ml), injektoitiin ruiskulla ja neulalla korkin läpi Isoton'iin ja sekoittamista jatkettiin 4 tuntia. Sitten astian annettiin seistä yli yön mikropallojen kellumisen sallimiseksi. Isoton poistettiin astian pohjalta käyttäen ruiskua ja neulaa toisen neulan ollessa asetettu korkkiin hengittämisen sallimiseksi, minkä jälkeen lisättiin fosfaattipuskuroitua suolaliuosta (15 ml) ja astiaa keinutettiin 20 minuuttia mikropallojen homogeenisen suspension muodostamiseksi. Saatu suspensio analysoitiin Coulter counter-analyysillä ja kaikuvuusmittauksilla, kuten esitetään seuraavassa taulukossa:

	0-4 µm (%)	4-10 µm (%)	>10 µm (%)	Alkuperäinen akustinen vaimennuskyky (dB/cm)	Akustinen vaimennuskyky 90 sekunnin päästä (dB/cm)
Ennen kokoja-kauma-muunnosta	73	26,5	0,5	5,6	2,4
Kokoja-kauma-muunnoksen jälkeen	89	11	0	8,9	8,9

Esimerkki 31

Esimerkin 30 menettely toistettiin käyttäen akroleiinin 50-%:ista etanoliliuosta (300 µl) silloitusaineena antamaan mikropalloja, joiden kaasutilavuus ennen kokojakaumamuunnosta oli 12 %.

Patenttivaatimukset

1. Varjoaineet, jotka käsittävät kaasun tai kaasun esiasteen mikrokuplia, jotka on kapseloitu proteiinikuorella, joka on silloitettu reaktiolla vesipohjaisessa väliaineessa oleellisen neutraalissa pH-arvossa bifunktionaalisen aldehydin kanssa, joka pystyy aiheuttamaan proteiinin silloittumisen, t u n n e t t u siitä, että silloitusproteiini on myös reagoinut pelkistimen kanssa, joka toimii pelkistäen Schiff'n emäksen kaksoissidoksen.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset varjoaineet, t u n n e t t u siitä, että proteiini on albumiini, gelatiini tai γ-globuliini.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukaiset varjoaineet, t u n n e t t u siitä, että proteiini on ihmisen albumiiniseerumi.

4. Minkä tahansa edeltävistä patenttivaatimuksista mukaiset varjoaineet, t u n n e t t u siitä, että aldehydi on dialdehydi tai α,ß-tyydyttymätön aldehydi.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukaiset varjoaineet, t u n n e t t u siitä, että aldehydi valitaan glutaarialdehydistä, adipaldehydistä, 2-hydroksiadipaldehydistä, 1,8-oktaanidiaalista, akroleiinista, 3-dimetyyliaminoakroleiinista, metakroleiinista, krotonialdehydistä, 2-pentenaalista ja 2-heksenaalista.

6. Minkä tahansa edeltävistä patenttivaatimuksista mukaiset varjoaineet, t u n n e t t u siitä, että se käsittää kaasumikrokuplia, jotka on altistettu kokojakaumamuunnokselle.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukaiset varjoaineet, t u n n e t t u siitä, että niillä ei esiinny varjostusvaikutuksen heikkenemistä 90 sekunnissa tällaisen varjostusvaikutuksen in vitro-tarkkailun aikana.

8. Minkä tahansa edeltävistä patenttivaatimuksista mukaiset varjoaineet, t u n n e t t u siitä, että vähin-

tään 85 % mikrokuplista on kooltaan jopa 4 µm ja loput ovat kooltaan välillä 4 - 10 µm.

9. Patenttivaatimuksen 6 mukaiset varjoaineet, t u n n e t t u siitä, että vähintään 90 % mikrokuplista on kooltaan jopa 4 µm.

10. Minkä tahansa edeltävistä patenttivaatimuksista mukaiset varjoaineet, t u n n e t t u siitä, että niitä käytetään diagnostisessa kuvauksessa.

11. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 10 mukaiset varjoaineet, t u n n e t t u siitä, että niitä käytetään diagnostisessa ultraäänikuvauksessa.

12. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 10 mukaiset varjoaineet, t u n n e t t u siitä, että niitä käytetään magneettiresonanssikuvauksessa.

13. Menetelmä parempien kuvien kehittämiseksi ihmisen tai eläimen kehosta, t u n n e t t u siitä, että se käsittää minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 10 mukaisen varjoaineen annostelemisen mainittuun kehoon ja ultraääni- tai MR-kuvan kehittämisen vähintään osasta mainittua kehoa.

14. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisen mikrokuplavarjoaineen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että proteiini on silloitettu reaktiolla vesipohjaisessa väliaineessa oleellisen neutraalissa pH-arvossa bifunktionaalisen aldehydin kanssa, joka pystyy aiheuttamaan proteiinin silloittumisen, kaasun tai kaasun esiasteen mikrokuplien ollessa kapseloitu mainittuun proteiiniin ennen silloitusreaktiota, sen aikana tai sen jälkeen, ja missä silloitusproteiini on myös reagoinut pelkistimen kanssa, joka toimii pelkistäen Schiff'n emäksen kaksoissidoksen, tai missä tällaista pelkistintä on läsnä silloittumisreaktion aikana.

15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että silloittuneita esimuodostet-

tuja ääniaalloilla käsiteltyjä proteiinipohjaisia mikropalloja.

16. Patenttivaatimuksen 14 tai 15 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että silloittuminen aiheutetaan pH-arvossa välillä 6 - 8.

17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että silloittuminen aiheutetaan pH-arvossa noin 7.

18. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 14 - 17 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että silloittuminen aiheutetaan vesipohjaisessa puskurijärjestelmässä.

19. Patenttivaatimuksen 18 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että puskuri on fosfaattipuskuroitu suolaliuos.

20. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 14 - 19 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että pelkistin on natriumboorihydridi tai natriumsyanoboorihydridi.

21. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 14 - 20 mukainen menetelmä kaasupitoisen varjoaineen valmistukseen, t u n n e t t u siitä, että mikrokuplat altistetaan myös kokojakaumamuunnokselle.

22. Patenttivaatimuksen 21 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kokojakaumamuunnos aiheutetaan proteiinin silloittumisen jälkeen.

23. Patenttivaatimuksen 21 tai 22 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kokojakaumamuunnos aiheutetaan ulkoisen kaasupaineen käyttämisellä mikrokupliin tai niiden suspensioon.

24. Patenttivaatimuksen 21 tai 22 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kokojakaumamuunnos aiheutetaan käsittelemällä mikrokuplia nesteellä, johon niiden kaasusisältö on liukoinen.

25. Patenttivaatimuksen 21 - 24 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mikrokuplien keskitilavuus on alentunut 40 - 60 %:illa.



Missing part