



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **314019**

(13) B1

(51) Int Cl⁷

A 61 K 49/00

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19953141	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1994.12.01, PCT/IB94/00376
(22) Inng. dag	1995.08.10	(85) Videreføringsdag	1995.08.10
(24) Løpedag	1994.12.01	(30) Prioritet	1993.12.15, EP, 93810885
(41) Alm. tilgj.	1995.08.10		
(45) Meddelt dato	2003.01.20		

(71) Patenthaver	Bracco Research SA, 7, route de Drize, CH-1227 Carouge, CH
(72) Oppfinner	Feng Yan, CH-1227 Carouge, CH Michel Schneider, CH-1256 Troinex, CH Jean Brochot, F-74160 Feigères, FR
(74) Fullmektig	Zacco Norway AS, 0106 Oslo

(54) Benevnelse **Ultralydkontrastmedium, kontrastmidler inneholdende mediet og fremgangsmåte derav**

(56) Anførte publikasjoner EP 554213, WO 9306869

(57) Sammendrag

Injiserbart medium for ultrasonisk ekkografi i form av mikrobobler eller mikrobullonger omfattende minst to biokompatible forbindelser A og B (gassformige ved kroppstemperatur) som danner en blanding som når den er i suspensjon med vanlige overflateaktive midler, additiver og stabiliserende midler tilveiebringer nyttige ultralydkontrastmidler. Mens en av komponentene (B) i blandingen er en gass hvor molekylvekten er høyere enn 80 dalton og hvor oppløseligheten i vann er under 0,0283 ml pr ml vann ved standardbetingelser. Tilstedeværelse av den første komponenten (B) i kontrastmediet kan variere mellom 0m5 og 41 volum-%. Den andre komponenten (A) av ultralydkontrastmediet er en gass eller en blanding av gasser hvor molekylvekten er under 80 dalton. Den andre komponenten er til stede i en proporsjon på mellom 59-99,5 vol-%, og blir fortrinnsvis valgt fra oksygen, luft, nitrogen, karbondioksyd og/eller blandinger derav. Gassblandingen som er beskrevet er meget effektive som ultralydkontrastmedium. Oppfinnelsen omfatter også en fremgangsmåte for fremstilling av ultralydkontrastmediet, kontrastmiddelet og ultralydmiddelsettet.

Foreliggende oppfinnelse vedrører injiserbart ultralyd-kontrastmedium omfattende forbindelser som er biokompatible gassformige ved kroppstemperatur som når de suspenderes i en vandig bærerløsning inneholdende vanlige overflateaktive midler, additiver og stabiliserende midler tilveiebringer 5 kontrastmidler for ultralydekkografi. Videre angår oppfinnelsen injiserbar ultralydkontrastmiddel omfattende en suspensjon av gassfylte mikrobobler eller mikroballer i en fysiologisk akseptabel bærerløsning omfattende vanlige 10 overflateaktive midler, additiver og stabiliserende midler og en tørrformulering og et to-komponentsett. I tillegg angår oppfinnelsen en fremgangsmåte for fremstilling av ultralyd-kontrastmiddelet og anvendelse av slike.

15 Anerkjennelse av anvendelse av injiserbare suspensjoner av gassmikropartikler som nyttige ultralydkontrastmidler for diagnostiske formål har utløst betraktelig forskning og utvikling mot forbedrede dispersjoner av gassfylte mikroballer eller mikrobobler med høyere stabilitet, bedre 20 motstand mot trykkvariasjoner, god ekkogenisitet, enkel fremstilling, feltanvendelse og lagring. Mange forslag til ultralydkontrastmidler med slike suspensjoner er blitt gjort. For eksempel er vandige suspensjoner som kan anvendes som billegdannende midler i ultrasonisk ekkografi beskrevet i WO-A-91/15244 (Schneider et al.), WO-A-92/11873 (Beller et al.) 25 eller EP-A-0.077.752 (Schering).

WO-A-91/15244 (Schneider et al.) beskriver mikroboblesuspensjoner inneholdende filmdannende overflateaktive midler i 30 laminær og/eller lamellær form og eventuelt, hydrofile stabiliserende midler. Suspensjonene blir oppnådd ved å eksponere de laminariserte overflateaktive midlene for luft eller en gass før eller etter blanding med en vandig fase. Omdanning av filmdannende overflateaktive midler til lamellær 35 form blir utført ifølge forskjellige teknikker, inkludert høytrykkshomogenisering eller sonikering under akustiske eller ultrasoniske frekvenser. Den rapporterte konsen-

trasjonen av mikroboblene i disse suspensjonene er mellom 10^8 og 10^9 bobler/ml. De beskrevne suspensjonene utviser en ganske høy stabilitet under lagring.

5 I WO-A-94/09829 (Schneider et al.) er det vist at konsentrasjoner av laminære og/eller lamellære fosfolipider anvendt i fremstillingene av meget stabile vandige suspensjoner kan være så lave at de tilsvarer et enkelt monomolekylært lag av fosfolipidet rundt mikroboblene i suspensjonen. Suspensjoner
10 med stabile lave fosfolipidinnhold (ned til noen få $\mu\text{g/ml}$) er blitt lagret i lange perioder uten betydelig reduksjon av antall mikrobobler eller ekkogenisitet.

En fremgangsmåte for å tilveiebringe stabilitet overfor trykkvariasjoner til suspensjoner av mikrobobler eller
15 mikroballer anvendt som ultralydkontrastmidler er beskrevet i EP-A-0 554 213 (Schneider et al.). Det er der blitt vist at en betraktelig forsterkning av stabiliteten til mikroboblene overfor sammenfalling forårsaket av trykk-
20 variasjoner ved injeksjon kan bli oppnådd dersom vanlig anvendt luft, nitrogen eller andre oppløselige gasser blir i det minste delvis erstattet med gasser hvor oppløseligheten i vann uttrykt i liter gass ganger liter vann under standard-
betingelser delt på kvadratroten av molekylvekten i Dalton
25 ikke overskrider 0,003. Gasser som er beskrevet å tilfredsstille ovennevnte kriterier utgjør for eksempel SeF_6 , SF_6 , CF_4 , C_2F_6 , C_2F_8 , C_4F_{10} osv. Disse gassene er blitt funnet å produsere varige og in vivo meget stabile mikroballer som igjen tilveiebringer ekkografiske bilder med
30 høy kvalitet.

WO-A-92/17212 og WO-A-92/17213 (Klaveness et al.) beskriver ultralydkontrastmidler omfattende mikroballer som har en kappe dannet av ikke-proteinholdige kryssbundede eller
35 polymeriserte amfifile forbindelser (for eksempel fosfolipider) og kryssbundede proteiner (for eksempel albumin). Mikroballer innkapsler gasser så som luft, oksygen,

hydrogen, nitrogen, helium, argon, CH_4 , SF_6 eller gassforløpere så som natrium- eller ammoniumbikarbonat.

WO-A-93/06869 (Mallinckrodt Medical Inc.) beskriver en fremgangsmåte for ultralydbilledannelse av et varmblodig dyr hvor en farmasøytisk akseptabel gass eller en blanding av gasser blir administrert til dyret og dyret blir scannet med en ultralydprobe. Gassene eller gassblandingene blir administrert ved inhalering i det det ved inhalering av blandingen i noen få minutter dannes mikrobobler i blodstrømmen til et varmblodig dyr og det ekkografiske bildet av vevet vil forandre seg. Gassene og gassblandingene som er beskrevet innbefatter oksygen, dinitrogenoksid, C_2H_6 , SF_6 , xenon, perfluorkarboner osv. Nyttige gasser og gassblandinger er slike som danner store bobler i blodet og som kan bli typebestemt av xenon og dinitrogenoksid og andre svake aktive generelle anestesimidler så som svovelheksaklorid. Illustrerte blandinger inneholder enten 20% oksygen, 60-80% svovelheksafluorid og/eller 20% nitrogen, xenon, dinitrogenoksid eller etylen eller 20% oksygen, 20% nitrogen og 60% xenon eller dinitrogenoksid. Fremgangsmåten er basert på sammenligning av ultrasoniske signaler oppnådd i løpet av to forskjellige scanninger. Den første før inhalering av gassblandingen og den andre en viss tid etter inhaleringen.

Et interessant konsept er blitt beskrevet i WO-A-93/05c819 (Quay). Dokumentet beskriver emulsjoner av flytende dodekafluorpentan eller dekafluorbutan og sorbitol i vann som ved injeksjon danner gassformige mikrobobler som motstår trykkvariasjoner og tilveiebringer et godt ekkogent signal. Forbindelsene i emulsjonene er til tross for at de er flytende ved romtemperatur, meget flyktige og kan lett bli avdampet ved kroppstemperatur og danner gassformige dispersjoner i en bærevæske inneholdende additiver og stabiliserende midler så som sorbitol. Ved injeksjon blir dråpene av den meget flyktige forbindelsen hurtig disaggregert og danner en viss mengde av meget vedvarende mikrobobler. Mikroboblene

som bare inneholder den valgte forbindelsen, for eksempel dodekafluorpentan i ren form ved eksklusjon av luft eller en hvilke som helst annen gass blir stabilisert av stabiliserende midler, for eksempel sorbitol, "Twenn 20" og soya-bønneolje som er til stede i emulsjonsbærerervæskene. Ved generalisering fant Quay ut at den foregående teknikken kunne anvendes på et antall andre ikke-flytende (gassformige) kjemiske forbindelser som ble anvendt via et kriterium definert som et forhold mellom volumtetthet, oppløselighet og diffunderbarhet (koeffisient Q). Dokumentet hevder at en hvilke som helst biokompatibel gass hvor koeffisienten Q er høyere enn 5 er potensielt nyttig som et ekkografisk middel, og en liste på omtrent 180 gasser/væsker som tilfredsstiller kriteriet er presentert. Det følger av dokumentet at for å oppnå de ønskede egenskapene, må kontrastmiddelet bli dannet med forbindelser hvor koeffisienten Q må være høyere enn 5. Det definerte kriteriet er $Q = 4.0 \times 10^{-7} \times p/C_s D$ hvor p er tettheten til gassen, D er diffunderbarheten til gassen i oppløsningen og C_s er vannoppløseligheten til gassen, og dette er blitt bestemt ved anvendelse av en enkel modell hvor diffunderbarheten og oppløseligheten til gassene i vann blir anvendt som den tilnærming som er nærmest virkeligheten. Kontrastmidler oppnådd fra rene, dvs. ikke-sammenblandede forbindelser valgt ifølge ovennevnte kriterier har vist lovende resultater. Testet på forsøkshunder er det blitt rapportert at kontrastmidlene har lovende resultater i ekkografi av myokard etter perifere venøse injeksjoner (se Beppu S. et al. i Proceedings fra 66th Scientific Session og the American Heart Association, Atlanta, oktober 1993). Avhengig av dosen har injeksjoner av 2,2% emulsjon av dodekafluoropentan blitt vist å tilveiebringe en gjennomsnittlig ugjennomskinnelighet i løpet av opp til 85 minutter. Med doser hvor gjennomskinneligheten av venstre hjerte var homogent ble det observert en reduksjon i oksygenmetningen til arterielt blod og en økning i lungearterielt systolisk trykk ble observert.

Mange sammensetninger ifølge tidligere teknikk er forsøkt og mange er under omfattende kliniske forsøk. Mange er ved forskjellige utviklingsstadier. Fra forskjellige rapporter ser det ut som om bare et meget lite antall av kontrast-

5 midler har evne til å utnytte det brede spekter av diagnostiske muligheter som grunnleggende er gitt ved ultralyd ekkografi. Bare noen få kontrastmidler er virkelig nyttige og hjelper den medisinske profesjonen til å dra nytte av den diagnostiske teknikken som ellers representerer en av de

10 beste ikke-invasive metodene for analysering av organer i det humane legemet. Ikke mange midler muliggjør bestemmelse av det fullstendige potensialet til ultralydkonseptet og dette forhindrer videre anvendelse av teknikken og/eller de billeddannende midlene. Eksperimentering med kjente ekko-

15 grafiske midler har vist at noen tilveiebringer utilstrekkelige tilbakespredninger for å sikre god intensitet og kontrast eller tilveiebringer nyttige bilder bare i visse prosentandeler av populasjonen som begrenser deres anvendbarhet som et diagnostisk redskap for generell anvendelse. På

20 grunn av dårlig motstand overfor trykkvariasjoner er andre for kortlivede til å muliggjøre meningsfulle målinger eller nyttige bilder. Kontrastmidler hvor mikroboblene eller mikroballengene er fylt med gass med høy oppløselighet i vann har liten motstand mot trykkvariasjoner. Suspensjoner av

25 mikroballer hvor kappen blir laget av rigide materialer er også ineffektive fordi de ikke resonerer tilstrekkelig som respons til akustiske bølger. Viktige kontrastmidler som har en høy motstand mot trykkvariasjoner er de som anvender gasser med lav oppløselighet i den vandige bæreren. Den

30 direkte konsekvensen av lav oppløselighet er lav resorpsjonsrate og en langsom eliminering fra kroppen. Billeddannende midler dannet ut fra meget uoppløselige gasser forblir i blodsirkulasjon i lange perioder og forårsaker tilbakevendelse eller resirkulering av gassmikrobobler som for-

35 årsaker interferens med bilder produsert i løpet av de første stadiene av testen. Slike kontrastmidler er generelt nyttige for billeddannelse av venstre hjerte, men på grunn av

sakte resorpsjon eller eliminering, kan de ikke effektivt bli
 anvendt for perfusjonsmålinger. Perfusjonsmålinger blir
 vanligvis utført ved integrering av den ekkografiske
 responskurven som er en vanlig Gaussisk funksjon, som
 5 fremkommer etter en "enkelt passasje" av det billedannende
 middelet. Tilbakefall eller resirkulering etter "enkelt-
 passasjen" er derfor ikke ønskelig, i det repetisjonen vil
 legges over og ødelegge det endelige resultatet. Det er
 derfor generelt akseptert at vedvarelse av mikroboblene eller
 10 mikroballengene med høytrykksmotstand utover en viss periode
 er mer forstyrrende enn nyttig. Ekkografiske kontrastmidler
 med meget vedvarende mikrobobler er nyttige bare for visse
 studier, for eksempel vaskulære Doppler undersøkelser. Midler
 anvendt for billedannelse av venstre hjerte og myokard bør
 15 gi klare bilder og bør ha god motstand mot trykkvariasjon,
 men bør ikke vare altfor lenge og bør ikke ødelegge bilder
 dannet øyeblikkelig ved injeksjon. Resirkulering er ikke et
 ønskelig trekk ved midlene hvor den antatte anvendelsen er å
 dekke et spekter av anvendelser og tydelig billedannelse.
 20 Det er følgelig meget ønskelig å modulere trykkmotstanden
 eller vedvarelse av kontrastmiddel etter injeksjon, dvs. å
 anvende suspensjoner av bobler (eller mikroballengene)
 konstruert med tilstrekkelig trykkmotstand, men med kon-
 trollert levetid i sirkulasjon. Dette kravet blir oppfylt
 25 ifølge oppfinnelsen.

Oppfinnelsen vedrører følgelig injiserbart ultralydkontrast-
 medium omfattende forbindelser som er biokompatible gass-
 formige ved kroppstemperatur som når de suspenderes i en
 30 vandig bærerløsning inneholdende vanlige overflateaktive
 midler, additiver og stabiliserende midler tilveiebringer
 kontrastmidler for ultralydekkografi, kjennetegnet ved at
 mediet er en blanding av gassene (A) og (B), hvor gass (B),
 er en fluor-inneholdende biokompatibel gass valgt fra gruppen
 35 bestående av SF₆, CF₄, C₂F₆, C₃F₆, C₃F₈, C₄F₆, C₄F₈, C₄F₁₀,
 C₅F₁₀, C₅F₁₂ og blandinger derav, tilsted i en mengde på
 mellom 0,5 - 41 vol %, har en molekylvekt som er høyere enn

80 dalton og dets oppløselighet i vann er under 0,0283 ml gass pr ml vann målt under standardbetingelser, i det likevekten til blandingen utgjøres av gassen A utvalgt fra gruppen bestående av luft, oksygen, nitrogen, karbondioksyd og blandinger derav.

I denne beskrivelsen angir gassoppløseligheter Bunsen-koeffisientene og molekylvekter over 80 dalton blir betraktet som relativt høye, mens molekylvekter under 80 dalton blir betraktet som relativt lavt. Ultralydkontrastmediet ifølge oppfinnelsen kan bli definert som blandinger hvor hoveddelen av blandingen består av "en relativ lav" molekylvektgass eller gasser, mens den mindre delen av blandingen består av "en relativt høy" molekylvekt gass eller gassblanding. Mengden av denne "mindre" eller aktiverende komponent B i kontrastmediet er omtrent alltid mellom 0,5 og 41 volumprosent. Den andre komponenten (A) av ultralydkontrastmediet kan være en gass eller en blanding av gasser hvor oppløseligheten i vann er over den til nitrogen (0.0144 ml vann under standardbetingelser) og hvor mengdene i blandingen omtrent alltid er en proporsjon mellom 59-99,5 volum-%. Denne "vesentlige" eller dominerende komponenten er fortrinnsvis en gass eller gasser hvor molekylvektene er relativt lave, vanligvis under 80 dalton, og blir valgt fra gasser så som oksygen, luft, nitrogen, karbondioksid eller blandinger derav.

I ultralydkontrastmediet ifølge oppfinnelsen kan gassen hvor molekylvekten er over 80 dalton være en blanding av gasser eller en blanding av forbindelser som er gassformige ved kroppstemperatur, men som, ved romtemperatur, kan være i en flytende tilstand. Slike gassformige eller flytende forbindelser kan være nyttige i kontrastmediet ifølge oppfinnelsen dersom molekylvekten til hver forbindelse er høyere enn 80 dalton og oppløseligheten i vann til hver forbindelse er under 0,0283 ml gass pr ml vann under standardbetingelser.

Når fylt med kontrastmedium ifølge oppfinnelsen og dispergert i en vandig bærer inneholdende vanlige overflateaktive midler, additiver og stabiliserende midler, tilveiebringer de dannede mikroboblene et injiserbart kontrastmiddel for ultralydbilleddannelse, med kontrollert motstand mot trykkvariasjoner og modulert varighet etter injeksjon. I tillegg til mikrobobler vil kontrastmiddelet ifølge oppfinnelsen inneholde overflateaktive midler som stabiliserer den mikrobobleuvarige gass/væskekapen, og eventuelt, hydrofile midler og andre additiver. Additivene kan innbefatte blokk-kopolymerer av polyoksypropylen og polyoksyetylen (polyoksamerer), polyoksyetylen-sorbitaner, sorbitol, glycerolpolyalkylenstearat, glycerolpolyoksyetylen-sorbitaner, sorbitol, glycerolpolyalkylenstearat, glycerolpolyoksyetylen-ricinoleat, homo- og kopolymerer av polyalkylenglykoler, soyabønne-olje samt hydrogenerte derivater, etere og estere av sukrose eller andre karbohydrater med fettsyrer, fettalkoholer, glycerider av soyaolje, dekstran, sukrose og karbohydrater. Overflateaktive midler kan bli filmformet og ikke- filmformet og kan innbefatte polymeriserbare amfifile forbindelser av typen linoleyl-lecitiner eller polyetylen-dodekanoat. De overflateaktive midlene omfatter en eller flere filmdannende overflateaktive midler i lamellar eller laminar form valgt mellom fosfatidinsyre, fosfatidylcholin, fosfatidyletanolamin, fosfatidylserin, fosfatidylglycerol, fosfatidylinositol, kardiolipin, spingomyelin og blandinger derav.

Oppfinnelsen omfatter også injiserbar ultralydkontrastmiddel omfattende en suspensjon av gassfylte mikrobobler eller mikroballer i en fysiologisk akseptabel bærervæske omfattende vanlige overflateaktive midler, additiver og stabiliserende midler, kjennetegnet ved at gassen er en gassblanding av minst to biokompatible gasser A og B hvor gassen (B) er en fluor-inneholdende biokompatibel gass valgt fra gruppen bestående av SF₆, CF₄, C₂F₆, C₃F₆, C₃F₈, C₄F₆, C₄F₈, C₄F₁₀, C₅F₁₀, C₅F₁₂ og blandinger derav, tilstede i en

mengde på mellom 0,5 - 41 vol %, har en molekylvekt som er høyere enn 80 dalton og oppløselighet i vann under 0,0283 ml pr ml vann ved standardbetingelser, i det likevekten til blandingen utgjøres av gassen A utvalgt fra gruppen bestående
5 av luft, oksygen, nitrogen, karbondioksyd eller blandinger derav.

Videre omfatter oppfinnelsen tørrformulering, kjennetegnet ved at den omfatter overflateaktive midler, additiver og
10 stabiliserende midler lagret under en blanding av forbindelser som ved kroppstemperatur er biokompatible gasser (A) og (B) der gassen (B) er en fluor-inneholdende biokompatibel gass utvalgt fra gruppen bestående av SF₆, CF₄, C₂F₆, C₃F₆, C₃F₈, C₄F₆, C₄F₈, C₄F₁₀, C₅F₁₀, C₅F₁₂ og
15 blandinger av disse, til stede i en mengde mellom 0,5 - 41 vol %, har en molekylvekt som er høyere enn 80 dalton og oppløselighet i vann under 0,0283 ml per ved standardbetingelser, idet likevekten til blandingen utgjøres av gassen (A) utvalgt fra gruppen bestående av luft, oksygen,
20 nitrogen, karbondioksid og blandinger av disse.

Videre omfatter oppfinnelsen to-komponentsett, kjennetegnet ved at det omfatter, som første komponent, tørrformuleringen som den andre komponent en fysiologisk akseptabel bærer væske
25 der, når den blandes med den første komponent frembringer, som en suspensjon av de to komponentene, et ultralydkontrastmiddel.

Oppfinnelsen omfatter også en fremgangsmåte for å fremstille
30 ultralydkontrastmidler, kjennetegnet ved at en gassblanding av minst to biokompatible komponenter (A) og (B) suspenderes i en fysiologisk akseptabel bærer væske inneholdende vanlige overflateaktive midler, additiver og stabiliserende middel for å danne gassfylte mikrobobler eller mikroballer
35 kjennetegnet ved at den minimale effektive proporsjonen av minst en gasskomponent i nevnte blanding av gasser blir bestemt ifølge kriteriene

$$B_c\% = K/e^{bM_{wt}+C}$$

5 hvor $B_c\%$ (i volum) er den totale mengden av komponenten B i blandingen, K, C og b er konstanter med verdiene henholdsvis 140, -10.8 og 0.012, M_{wt} representerer molekylvekten til komponenten B som overskrider 80. Kontrastmidlene dannet ifølge foreliggende fremgangsmåte omfatter suspensjoner av mikrobobler eller mikroballer med meget god motstand for trykkvariasjoner og en kontrollert resorpsjonsrate.

Oppfinnelsen omfatter videre anvendelse av ultralydkontrastmediet ifølge oppfinnelsen for fremstilling av ultralydkontrastmidler, samt anvendelse av en tørrformulering ifølge oppfinnelsen for fremstilling av ultralydkontrastmidler.

Kort beskrivelse av tegningene

20 Figur 1 er en skjematisk presentasjon av et ultralydkontrastmedium ifølge oppfinnelsen.

Figur 2 er et skjematisk diagram av det kritiske trykket (P_c) til kontrastmediet som en funksjon av mengden av en valgt gass i blandingen.

25 Figur 3 representerer et diagram av den kritiske trykket (P_c) til et kontrastmedium dannet med oktafluorcyklobutan (C_4F_8) (fig. 3B) og dodekafluorpentan ($C_{10}F_{18}$) (fig. 3A) som en funksjon av mengden gass i blandingen.

30 Figur 4 er et diagram av den minimale mengden av en gass i blandingen som en funksjon av molekylvekten.

35 Figur 5 (opacifisering av venstre hjerte etter IV-injeksjon i minigris) er en grafisk representasjon av in vivo ekkografiske responser oppnådd som en funksjon av tiden i den venstre ventrikkelen til en minigris etter intravenøs

injeksjon av kontrastmedium inneholdende forskjellige konsentrasjoner SF_6 .

Figur 6 (myocard opacifikasjon etter intra-aorta injeksjon i kanin) representerer et diagram av in vivo ekkografisk respons oppnådd som en funksjon av tid med kontrastmedium inneholdende forskjellige konsentrasjoner C_4F_8 .

Foreliggende oppfinnelse er basert på det uventede funnet som omfatter at et ultralydkontrastmedium omfattende bobler fylt med en blanding av minst to biokompatible gassformige eller ved kroppstemperatur gassformige forbindelser A (hovedsubstansen eller en relativt lav molekylvektsubstans) og B (aktiverende eller en relativt høy molekylvektsubstans), vil tilveiebringe, i suspensjon med vanlige overflate aktive midler, additiver og stabiliserende midler, injiserbare ultralydkontrastmidler som kombinerer ønskelig motstand overfor trykk og en kortere levetid i sirkulasjon, i det begge disse parameterene kan kontrolleres etter behov. Dersom minst en av de (aktiverende) forbindelsene er komponenter i blandingen med en molekylvekt høyere enn 80 dalton (relativt høy molekylvekt) er til stede i visse minimale proporsjoner og dersom solubiliteten derav i vann er under 0,0283 ml gass pr ml vann ved standardbetingelser, vil ultralydkontrastmediet tilveiebringe ekkografiske egenskaper som er så gode som de som blir oppnådd ved anvendelse av bare rene forbindelser. Med "aktivering" menes at forbindelsen eller komponenten som tilveiebringer de fysikalske egenskapene til de andre komponentene i blandingen som gjør blandingen, med hensyn på ekkogenisitet og motstand for trykkvariasjoner, at den reagerer likt eller nesten likt som forbindelsen eller komponenten alene (i ren form). Mengden av den første, aktiverende eller høy molekylvekt, komponent i kontrastmediet i de fleste tilfellene til å variere fra så lavt som 0,5 volum-% (for forbindelser med høy molekylvekt og lav oppløselighet i vann) til 41 volum-%. Eksperimentene har vist at forbindelsene med molekylvekt under 80 dalton ("lav

molekylvekt") ikke er egnet som aktiverende komponenter og at den øvre grensen til molekylvekten er vanskelig å etablere i det alle forbindelsene som er testet var effektive dersom deres molekylvekt var relativt høy dvs. over 80. Forbindelser med molekylvekt på omtrent 240 dalton så som dekafluorbutan eller 290 dalton så som perfluoropentan er blitt vist som en effektiv aktiverende komponent. Det er også indikasjoner på at forbindelsene så som 1,2,3-nonadekantrikarboksylsyre, 2-hydroksytrimetylester med molekylvekt noe over 500 dalton også kan bli anvendt som aktiverende, høy molekylvekts, komponent. Den andre "hoved" komponenten er tilsvarende til stede i en mengde på 59 til 99,5 volum-% og kan være en gass eller gasser hvor oppløseligheten i vann er høyere enn den til nitrogen (0,0144 ml/ml vann under standardbetingelser). Den andre komponenten er fortrinnsvis oksygen, luft, nitrogen, karbondioksyd eller blandinger derav og fortrinnsvis oksygener i luft. For komponent A kan andre mindre vanlige gasser som argon, xenon, krypton, CHClF_2 eller dinitrogenoksid også bli anvendt. Noen av disse mindre vanlige gassene kan ha molekylvekter som er høyere enn de til O_2 , N_2 , luft, CO_2 , osv., blant annet over 80 dalton, men i dette tilfellet vil deres oppløselighet i vann overskride den til gasser av kategori B, dvs. vil være over 0,0283 ml/ml vann.

Det var meget uventet å oppdage at suspendering i en vandig bærer av en blanding dannet av så lite som 0,5 volum-% av en forbindelse så som dodekafluoropentan, eller 0,8 volum-% dekafluorbutan sammenblandet med luft vil produsere mikrobobler som gir meget gode ekkografiske bilder in vivo og motstand mot trykkvariasjoner. Dette er spesielt overraskende på grunn av at det tidligere var betraktet som nødvendig for å oppnå gode ekkografiske bilder av venstre hjerte og myokardium at disse forbindelsene, og også et antall andre, blir anvendt som 100% konsentrasjoner, dvs. i ren form (uten luft). Eksperimenter med blandinger inneholdende forskjellige mengder av disse forbindelser med lav vannoppløselighet og

luft har vist at de ekkografiske bildene er like gode som de som er blitt oppnådd under lignende betingelser ved anvendelse av ekkografiske midler dannet med bare rene forbindelser.

5

Tidligere studier har vist at hurtig eliminering av luftmikrobobler i sirkulering foregår på grunn av at denne ellers fysiologiske foretrukne gassen blir hurtig resorbert ved fortynning og at flyktigheten til mikroboblene kan bli redusert ved anvendelse av forskjellige overflateaktive midler, additiver og stabiliserende midler. Når forskningen ble påbegynt ble det for å få bukt med flyktighetsproblemet foreslått mikroballer eller mikrovesikler med en materialvegg. Mikrovesikler med vegger dannet fra naturlige eller syntetiske polymerer så som lipidbilag (liposomer) eller denaturerte proteiner som albumin fylt med luft eller CO₂ er blitt foreslått. Den dårlige motstanden mot trykkvariasjoner og påfølgende tap av ekkogenisitet i de eldre kontrastmidlene har ført til undersøkelser for å oppnå gassformige partikler med høyere motstand mot trykkvariasjonene som oppstår i blodstrømmen. Fyllgasser så som svovelheksafluorid og dodekafluorpentan er blitt foreslått. Eksperimentering med disse gassene har vist at ved injeksjon, er suspensjonene av mikrobobler dannet med disse gassene alene meget motstandsdyktige mot kollaps i blodsirkulasjon. Som et resultat av disse innledende funnene er opp til 200 forskjellige gasser blitt identifisert som potensielt nyttige for å danne ultralydkontrastmidler. Det er derfor uventet blitt oppdaget at ved blanding av oksygen eller luft med noen av disse gassene som er motstandsdyktige for trykk kan man oppnå ultralydmidler som har fysiologisk bedre toleranse og/eller kortere resorpsjonshalveringstid enn ren svovelheksafluorid eller dodekafluorpentan, og fortsatt opprettholde den gode trykkmotstand som disse gassene har alene. Det er blitt postulert at en slik overraskende adferd som ultralydmediet ifølge oppfinnelsen har er et resultat av det faktumet at i mikrobobler som inneholder gassblandingene er diffusjonen av

35

luft inn i omgivende væske redusert ved tilstedeværelse av de større gassmolekylene eller gassene hvor oppløselighetene i vann er omtrent de samme eller lavere enn i luft eller oksygen. Til tross for at grunnene for denne overraskende adferden fortsatt er ukjent kan det bli postulert at molekylene til gassen med høy molekylvekt, til tross for at de er i meget små mengder, virkelig "stopper hullene" i mikroboble grensene og dermed forhindrer rømming av gass med lav molekylvekt ved transmembrandiffusjon. En grafisk presentasjon av denne modellen er vist i figur 1 hvor mikroboblen inneholdende luft (1) er blandet med en gass hvor molekylvekten er over 80 dalton (2) og suspendert i et vandig medium (3). Det flyktige ytre laget (4) stabilisert av et overflateaktivt middel (for eksempel fosfolipid) beholder gassblandingen innenfor det innbefattede volumet som definerer mikroboblen. Den aktiverende eller minoritetsgassen B blir jevnt dispergert i mikroboble volumet og vil ha en saktere diffusjon og vil blokkere porene derav, i den vandige oppløsningen spontant dannede overflatemiddel membranlignende kappen, som derved forhindres hurtig fjerning av de mindre og vanligvis mer oppløselige hovedkomponentene A. Derimot utviser den aktiverende eller minoritetskomponentgassen (B) høyere affinitet for den lipofile delen av det overflateaktive middelet anvendt for stabilisering av den flyktige kappen enn oksygen eller luft. Ifølge en annen hypotese ser disse gassene ut til å bli konsentrert i nærheten av membranen som forhindrer eller som reduserer diffusjonen av de mindre gassene over membranen. De eksperimentelle dataene som er blitt innsamlet tyder på at for fremstilling av ekkografisk medium ifølge oppfinnelsen er den nødvendige mengden av den aktiverende gassen i blandingen den som tilsvarer blokkering av porøsiteten til det aktuelle membranmaterialet eller mengden nødvendig for et monomolekylært lag som blir dannet på den indre veggen av mikroboblene. Den minimale mengden som er nødvendig er følgelig den som er nødvendig for å blokkere porene eller

dekke den indre veggen til membranen for å forhindre at komponenten med lav molekylvekt flykter eller bli resorbert.

Det antas også at de overlegne egenskapene til ultralyd-
5 kontrastmediet ifølge oppfinnelsen er et resultat av den kombinerte anvendelsen av nitrogen, karbondioksyd, oksygen eller luft (vesentlig en oksygen/nitrogen blanding) med andre gasser. Disse biologisk og fysiologisk kompatible gassene tilveiebringer viktige karaktertrekk til mediet og sikrer
10 dermed deres fordelaktige egenskaper. Til tross for at ultralydkontrastmediet ifølge oppfinnelsen kan bli dannet med et antall andre gasser som virker som den viktigste eller komponent A, er oksygen eller luft foretrukket. I denne beskrivelsen blir luft behandlet som en "én-komponent" gass.

15 Ifølge oppfinnelsen kan ultralydkontrastmedium med høy motstand mot trykkvariasjoner kombinert med relativt hurtig resorpsjon, dvs. fjerning fra kroppen bli oppnådd ved anvendelse av en gass eller gasser hvor molekylvektene er
20 over 80 dalton blandet sammen med en gass eller gasser hvor oppløselighetene i vann er høyere enn 0,0144 ml/ml vann og molekylvektene er vanligvis under 80 dalton. Gasser så som oksygen eller luft blandet med forbindelser som er gasser ved kroppstemperatur, men som ved romtemperaturer kan være i
25 flytende tilstand vil produsere ekkografisk medium som vil ha alle de fordelene til gasser i blandingen. Med andre ord vil disse blandinger når injisert som suspensjoner av mikrobobler tilveiebringe klare og skarpe bilder med tydelige kontraster (vanlig for mikrobobler med god motstand mot
30 trykkvariasjoner) og på samme tid vil bli resorbert vesentlig som tidligere som om de var fylt med luft eller bare oksygen. Ved følgelig å kombinere luft, nitrogen, karbondioksyd eller oksygen med en viss kontrollert mengde av hvilke som helst av de kjente biokompatible forbindelsene med høy molekylvekt som
35 ved kroppstemperatur er gasser, blir ultralydkontrastmedium med viktige og totalt uventetede fordeler oppnådd. Som forklart ovenfor tilveiebringer disse mediene det beste av

hver komponent, dvs. en god motstand mot trykkvariasjoner fra en og en relativt hurtig resorpsjon fra den andre og på samme tid elimineres de respektive ulempene til hver komponent sett på alene i mediet. Dette er spesielt over-
 5 raskende i det man kunne forventet egenskaper som er et gjennomsnitt av komponentene hver for seg.

Dersom molekylvekten til slike biokompatible forbindelser (B) er høyere enn 80 dalton og deres oppløselighet i vann er
 10 under 0,0283 ml gass pr ml vann under standardbetingelser, er slike forbindelser i gassformig eller flytende tilstand nyttig for kontrastmediet ifølge oppfinnelsen. Til tross for at i sammenheng med egnede overflate aktive midler og stabiliserende midler, kan gasser som svovelheksafluorid, tetrafluormetan, klortrifluormetan, diklordifluormetan,
 15 bromtrifluormetan, bromklordifluormetan, dibromdifluormetan, diklortetrafluoretan, klorpentafluoretan, heksafluoretan, heksafluorpropylen, oktafluorpropan, heksafluorbutadien, oktafluor-2-buten, oktafluorcyklobutan, dekafluorbutan, perfluorcyklopentan, dodekafluorpentan og mer foretrukket
 20 svovelheksafluorid og/eller oktafluorcyklobutan, bli anvendt i kategori B, i det mediet ifølge oppfinnelsen fortrinnsvis inneholder som gass B en gass valgt fra svovelheksafluorid, tetrafluormetan, heksafluoretan, heksafluorpropylen, oktafluorpropan, heksafluorbutadien, oktafluor-2-buten,
 25 oktafluorcyklobutan, dekafluorbutan, perfluorcyklopentan, dodekafluorpentan og mer foretrukket er svovelheksafluorid og/eller oktafluorcyklobutan.

Et annet uventet og overraskende trekk ifølge oppfinnelsen er
 30 det faktumet at når kriteriet ifølge WO 93/05819 blir anvendt i mediet ifølge foreliggende oppfinnelse er Q-koeffisienten oppnådd med foreliggende gassblandinger under 5. Dette er overraskende på grunn av at ifølge WO 93/05819 er mediet med
 35 Q-koeffisient under 5 utelukket fra gasser som er egnede for fremstilling av nyttige ultralydkontrastmedier. Til tross for dette er det blitt oppdaget at gassblandingene ifølge

oppfinnelsen til tross for at de har en Q-koeffisient som er godt under 5, tilveiebringer kontrastmidler som er nyttige for ultralydbilleddannelse.

- 5 Når fylt med kontrastmedium ifølge oppfinnelsen og dispergert i en vandig bærer inneholdende vanlige overflateaktive midler, additiver og stabiliserende midler, tilveiebringer de dannede mikroboblene et nyttig kontrastmiddel for ultralyd-billeddannelse. I tillegg til mikrobobler vil kontrast-
- 10 middelet ifølge oppfinnelsen inneholde overflateaktive midler, additiver og stabiliserende midler. Overflateaktive midler kan innbefatte en eller flere filmdannende overflateaktive midler, i lamellær eller laminær form anvendt for å stabilisere den mikrobobleuvarige gass/væskekappen.
- 15 Hydreringsmidler og/eller hydrofile stabiliserende forbindelser så som polyetylenglykol, karbohydrater så som laktose eller sukrose, dekstran, stivelse og andre polysakkarider eller andre konvensjonelle additiver som polyoksypropylenglykol og polyoksyetylenglykol; etere av fett-
- 20 alkoholer med polyoksyalkylenglykoler; estere og fettsyrer med polyoksyalkylert sorbitan; såper; glycerolpolyalkylenstearat; glycerolpolyoksyetylenricinoleat; homo- og kopolymerer av polyalkylenglykoler; polyetoksylert soya-olje og laksørolje samt hydrogenerte derivater; etere og etere av
- 25 sukrose eller andre karbohydrater med fettsyrer, fettalkoholer, i det disse fortrinnsvis er polyoksyakylerte; mono-, di- og triglycerider av mettede eller umettede fettsyrer; glycerider av soyaolje og sukrose kan også være nyttige. Overflateaktive midler kan være filmdannende og
- 30 ikke-filmdannende og kan innbefatte polymeriserbare amfifile forbindelser av type linoleyl-lecitiner eller polyetylen-dodekanoat. De overflateaktive midlene er fortrinnsvis filmdannende og er fortrinnsvis fosfolipider valgt fra fosfatidinsyre, fosfatidylcholin, fosfatidyletanolamin,
- 35 fosfatidylserin, fosfatidylglycerolfosfatidylinositol, kardiolipin, sphingomyelin og blandinger derav.

Oppfinnelsen er ikke begrenset til kontrastmidler hvor bare mikrobobler blir anvendt som bærere av ultralydkontrastmediet ifølge oppfinnelsen. En hvilke som helst egnet partikkel fylt med ultralydkontrastmedium for eksempel liposomer eller mikroballer som har en kappe produsert av syntetiske eller naturlige polymerer eller proteiner kan hensiktsmessig bli anvendt. Det er følgelig blitt bestemt at mikroballer fremstilt med albumin, eller liposomvesikler eller iodipamidetyl ester porøse partikler når fylt med ultralydkontrastmedium ifølge oppfinnelsen, tilveiebringer gode ekkografiske kontrastmidler. Suspensjoner hvor mikrobobler ble stabilisert med sorbitol eller ikke-ioniske overflateaktive midler så som polyoksyetylen/polyoksypropylen kopolymerer (kommersielt kjent som Pluronic) har demonstrert like god billeddannende evne når sammenlignet med opprinnelige formuleringene dannet med rene forbindelser alene. Det antas derfor at oppfinnelsen tilveiebringer et mer generalisert konsept av ultralydmedier og gir bedre innsikt i problemene med ultralydbilledannelse og også bedre kontroll med kontrastmiddelegenskapene. Medier og kontrastmidler inneholdende medier ifølge oppfinnelsen betraktes følgelig som produkter som gjør at teknikken utvikles ytterligere.

Foreliggende oppfinnelse omfatter også en fremgangsmåte for å fremstille ultralydkontrastmiddelet, hvor en gassblanding av minst to komponenter blir suspendert i en fysiologisk akseptabel vandig bæreøske inneholdende vanlige overflateaktive midler og stabiliserende midler for å danne gassfylte mikrobobler eller mikroballer, kjennetegnet ved at den minimale effektive andel av minst en gasskomponent (B) i nevnte blanding av gasser blir bestemt ifølge kriteriene

$$B_c\% = K / e^{bMwt} + C$$

35

hvor $B_c\%$ (i volum) er den totale mengden av komponent B i blandingen, K og C er konstanter med verdier på 140 og -10.8.

M_{wt} angir molekylvekten til komponenten B som overskrider 80 og B er mengden som er en kompleksfunksjon av drifts-temperatur og tykkelse til membranen (en lipidfilm) som stabiliserer mikroboblene. Siden kroppstemperaturen hovedsakelig er konstant og stabiliseringsfilmstrukturen vesentlig uavhengig av lipidkonsentrasjonen er verdiene av b innenfor intervallet 0.011-0.012 og kan bli betraktet som konstant. Kontrastmidlene fremstilt ifølge fremgangsmåten omfatter suspensjoner av mikrobobler eller mikroballer med meget god motstand overfor trykkvariasjoner og en relativ hurtig resorpsjon. Begge egenskapene er kontrollert i den grad at omtrent skreddersydde ekkografiske midler nå er mulig. Med ovennevnte kriterier er det mulig å fremstille et middel med ønskede karaktertrekk utgående fra en hvilke som helst tilgjengelig ikke-toksisk ("fra hyllen") forbindelse som ved kroppstemperatur er gass og som har molekylvekt og oppløselighet i vann som angitt ovenfor.

Oppfinnelsen omfatter også en tørr formulering omfattende overflateaktive midler, additiver og stabiliserende midler lagret under en blanding av forbindelser som ved kroppstemperatur er gasser, der minst én er en gass hvor molekylvekten er høyere enn 80 dalton og hvor oppløseligheten i vann er under 0,0283 ml pr vann under standardbetingelser. Før injeksjon omfatter formuleringen lyofilisert filmdannende overflateaktive midler og eventuelt, hydreringsmidler som polyetylenglykol eller andre konvensjonelle hydrofile forbindelser, er blandet sammen med en fysiologisk akseptabel bærerløsning for å fremstille ultralydkontrastmiddelet ifølge oppfinnelsen. Det filmdannende overflateaktive middelet er fortrinnsvis et fosfolipid valgt fra fosfatidinsyre, fosfatidylcholin, fosfatidyletanolamin, fosfatidylserin, fosfatidylglycerolfosfatidylinositol, kardiolipin, sphingomyelin og blandinger derav.

I en variant kan stabilisering av den mikrobobleuvarige gass/væskeapparatet bli sikret av ikke-ioniske overflateaktive

midler så som kopolymerer av polyoksyetylen og polyoksypropylen i kombinasjon med et filmdannende overflateaktivt middel så som dipalmitoylfosfatidylglycerol. Som før kan den vandige flytende bæreren ytterligere inneholde hydrofile
5 additiver så som glycerol, PEG, sorbitol osv. Ytterligere nyttige midler ifølge oppfinnelsen kan bli fremstilt med saltvannsoppløsninger inneholdende Tween 20, sorbitol, soyabønneolje og eventuelt andre additiver.

10 Også beskrevet er et to-komponent sett omfattende som første komponent en tørrformulering av overflateaktive midler, additiver og stabiliserende midler lagret under en blanding av gasser og som en andre komponent en fysiologisk akseptabel bærervæske som når bragt i kontakt med den første komponenten
15 tilveiebringer et ultralydkontrastmedium. Settet kan innbefatte et system av to separate beholdere, hver inneholdende en av komponentene, som er koblet sammen slik at komponentene hensiktsmessig kan bli bragt sammen før anvendelse av kontrastmiddelet. Beholderen inneholdende den
20 tørre formuleringen vil på samme tid inneholde ultralydmediet ifølge oppfinnelsen. Det er hensiktsmessig at kittet er i form av en på forhånd fylt to-roms sprøyte og kan videre innbefatte midler for å tilkoble en nål på en av endene.

25 Oppfinnelsen omfatter videre anvendelse av ultralydkontrastmediet ifølge oppfinnelsen for fremstilling av ultralydkontrastmidler, samt anvendelse av en tørrformulering ifølge oppfinnelsen for fremstilling ultralydkontrastmidler.

30 Når anvendt for billeddannelse av organer i humane- eller dyrelegemer blir ultralydkontrastmediet ifølge oppfinnelsen administrert til pasienten i form av en vandig suspensjon i ovennevnte fysiologiske akseptable bærervæske og pasienten blir scannet med en ultralydprobe hvorved et bilde av organet
35 eller delen av kroppen blir billeddannet.

Følgende eksempler illustrerer oppfinnelsen ytterligere.

Eksempel 1

5 Multilamellære vesikler (MLV) ble dannet ved oppløsning av
120 mg diarachidoylfosfatidylcholin (DAPC fra Avanti Polar
Lipids) og 5 mg dipalmitoylfosfatidinsyre (DPPA syreform, fra
Avanti Polar Lipids) i 25 ml heksan/etanol (8/2, v/v) og
deretter avdampning av oppløsningsmidlene til tørrhet i en
10 rundbunnet flaske ved anvendelse av en roterende avdamper.
Den gjenværende lipidfilmen ble tørket i en vakuumdessikator
og etter tilsetning av vann (5 ml) ble blandingen inkubert
ved 90°C i 30 minutter og aggitering. Den resulterende
oppløsningen ble ekstrudert ved 85°C gjennom et 0,8 µm
15 polykarbonatfilter (Nukleopore). Dette preparatet ble tilsatt
til 45 ml av en 167 mg/ml oppløsning av dekstran 10.000 MW
(Fluka) i vann. Oppløsningen ble grundig blandet, overført
til en 500 ml rundbunnet flaske, frosset ved -45°C og
lyofilisert under 13.33 Nt/m² (0.1 torr). Fullstendig
20 sublimering av isen ble oppnådd over natt. Alikvoter (100 mg
av det resulterende lyofilisatet ble introdusert i 200 ml
glassbeholdere. Beholderene ble lukket med gummikorker og
luften fjernet fra beholderene ved anvendelse av vakuum.
Blandinger av luft med forskjellige mengder svovelheksa-
25 fluorid ble ført inn i beholderene via en nål gjennom korken.

Suspensjoner av boblene ble oppnådd ved injisering i hver
beholder av 10 ml av en 3% glyceroloppløsning i vann
etterfulgt av omfattende blanding. De resulterende suspen-
30 sjoner av mikroboblene ble opptelt ved anvendelse av et
hemacytometer. Gjennomsnittlig boblestørrelse var 2.0 µm. In
vitro målinger (som definert i EP-A-0 554 213) av kritisk
trykk (Pc), ekkogenisitet (dvs. tilbakespredningskoeffisient)
og tallet på bobler for forskjellige prøver ble utført (se
35 tabell 1).

Som det fremgår fra resultatene har mikroboblene inneholdende 100% luft (prøve A) en lav motstand mot trykk. Ved bare 5% SF₆ øker motstanden mot trykket betraktelig (prøve B). Med 25% SF₆ er motstanden mot trykket nesten identisk med den til 100% SF₆. Når derimot konsentrasjonen av boblene, gjennom-

5 snittlig størrelse på boblene og tilbakespredningskoeffisientene er nesten uavhengig av prosentandelen SF₆.

prøve	luft % vol	SF ₆ % vol	Q koeff.	Pc mmHg	Ekkogenisitet 1/(cm.sr)x100	konsentrasjon (bobler/ml)
A	100	0	1.0	43	1.6	1.5x10 ⁸
B	95	5	1.3	68	2.1	1.4x10 ⁸
C	90	10	1.6	85	2.4	1.5x10 ⁸
D	75	25	3.1	101	2.3	1.4x10 ⁸
E	65	35	4.7	106	2.4	1.5x10 ⁸
F	59	41	5.8	108	2.4	1.6x10 ⁸
G	0	100	722.3	115	2.3	1.5x10 ⁸

De resulterende suspensjonene ble injisert intravenøst inn i minipigs (Pitman Moore) i en dose på 0,5 ml pr 10 kg og bildene av venstre ventrikulære hulrom ble registrert på en videomaskin. In vivo ekkografiske målinger ble utført ved

25 anvendelse av et Acuston XP128 ultralydsystem (Acuson Corp. USA) og en 7 MHz sektortransducer. Intensiteten til kontrasten ble målt ved videodensitometri ved anvendelse av en billedanalysator (Dextra Inc.). Figur 5 viser videodensitometriske registreringer i venstre hjerte til en minipig.

30 Igjen blir en betraktelig forskjell observert mellom tilfeller med 100% luft (prøve A) og nytt tilfelle med 95% luft (prøve B). Med 5% SF₆ ble den maksimale intensiteten allerede nesten oppnådd og halv tid i sirkulasjon viser også

35 en meget hurtig økning. Med 10% SF₆ er det ingen ytterligere økning i intensitet, men bare en forlenging av halveringstiden. Ut fra eksempelet fremkommer det at ved anvendelse av

mer enn 10% til 25% SF_6 i gassblandingen tilveiebringes ingen reell fordel. Det er interessant å merke seg at verdiene av Q koeffisienten oppnådd for blandingene anvendt var godt under den kritiske verdien på 10 stipulert ifølge

5

WO-A-93/05819.

Eksempel 2

Alikvoter (25 mg) PEG/DAPC/DPPA lyofilisatet oppnådd som
10 beskrevet i eksempel 1 (ved anvendelse av PEG 4000 i
stedenfor dextran 10.000) ble ført inn i 10 ml glass-
beholdere. Tedlar prøvebagger ble fylt med luft og oktafluor-
cyklobutan (C_4F_8). Kjente volum ble tatt ut fra baggene med
sprøyter og innholdet ble blandet via et treveis stoppe-lokk
15 system. Valgte gassblandinger ble deretter ført inn i
glassbeholderene (på forhånd evakuerte). Lyofilisater ble
deretter suspendert i 2,5 ml saltvann (0,9% NaCl). Resul-
tatene presentert nedenfor viser motstanden mot trykk,
boblekonsentrasjonen og tilbakesprednings ("backsatter")
20 koeffisienten til suspensjonene. Tilfellet med 100% C_4F_8
nådde motstanden mot trykk 225 mm Hg (sammenlignet med 43 mm
Hg når det gjelder luft). Igjen ble en betraktelig økning i
trykkmotstand allerede observert med bare 5% C_4F_8 ($P_c=117$ mm
Hg).

25

Etter intra-aorta injeksjon i kaniner (0,03 ml/kg) ble en
viss forlenging av kontrasteffekten i myokard observert
allerede med 2% C_4F_8 (når sammenlignet med luft). Med 5% C_4F_8
var varigheten av kontrasten øket betraktelig som om den var
30 over en terskelverdi i motstanden mot trykk, og vedvarelse av
hoblene økte betraktelig (se figur 6).

35

TABELL 2

prøve	luft % vol	C ₄ F ₈ % vol	Q koeff.	Pc mmHg	Ekkogenisitet 1/(cm.sr)×100	konsentrasjon (bobler/ml)
A	100	0	1.0	43	1.6	1.8×10 ⁸
B	95	5	1.4	117	2.2	3.1×10 ⁸
C	90	10	1.7	152	3.1	4.7×10 ⁸
D	75	25	3.3	197	3.5	4.9×10 ⁸
E	65	35	4.6	209	3.4	4.3×10 ⁸
F	59	41	5.5	218	2.8	4.0×10 ⁸
G	0	100	1531	225	2.3	3.8×10 ⁸

Denne kombinasjonen av gasser ga meget gode bilder ved 5% gass B i blandingen, mens meget gode bilder av venstre hjerte ble oppnådd med blandinger inneholdende opp til 25% oktafluorcyklobutan.

Tilsvarende diagram av kritisk trykk som en funksjon av C₄F₈ i blandingen med luft er gitt i figur 2. Dette eksempelet viser igjen at anvendelse av blanding av gasser muliggjør en forbedring av motstanden mot trykk av luftbobler ved bare å tilsette en liten prosentandel av en gass med høy molekylvekt/lav oppløselighet. Figuren viser videre at ved hensiktsmessig valg av gassblanding blir det mulig å oppnå en hvilke som helst motstand mot trykk.

Eksempel 3

Det samme lyofilisatet som beskrevet i eksempel 5 ble anvendt. Gassfasen ble dannet av dodekafluorpentan (C₅F₁₂) og luft. C₅F₁₂ er en væske ved romtemperatur med et kokepunkt på 29,5°C. 24 ml glassbeholdere hver inneholdende 50 mg

PEG/DSPC/DPPG lyofilisat oppnådd som beskrevet i eksempel 5 ble satt under vakuum, lukket under vakuum, deretter oppvarmet ved 45°C. Små volum (noen få milliliter) av C₅F₁₂ ble injisert i beholderene fortsatt ved 45°C gjennom korken. 5 Luft ble deretter ført inn for å gjenopprette atmosfærisk trykk i beholderene. Etter avkjøling ved romtemperatur ble saltvann (5 ml) injisert gjennom korken og beholderene ble omfattende agitert.

10

15

20

25

30

35

TABELL 3

prøve	luft % vol	C ₅ F ₁₂ % vol	Q koeff.	Pc mmHg	Ekkogen (cm.sr) ⁻¹	kons. (bob.ml.)	halverings- tid (t _{1/2})	Inten Grey niva	AUC (t _{1/2})
A	100	0	1.0	43	0.017	1.8x10 ⁸	11	22	78
B	99.5	0.5	1.0	80*	-	-	-	-	-
C	98.6	1.4	1.1	133	0.026	3.9x10 ⁸	14	97	609
D	97.1	2.9	1.4	182	0.028	3.9x10 ⁸	17	98	860
E	94.2	5.8	1.7	295	0.040	5.2x10 ⁸	59	99	3682
F	85.5	14.5	3.4	394	0.036	4.5x10 ⁸	78	97	5141

* beregnet

Den aktuelle prosentandelen av C_5F_{12} i gassfasen ble beregnet ved å anta fullstending fordampning av den tilførte væsken. Dette er en overestimering fordi ved denne temperaturen vil en del av væsken ikke være i gasstilstand. Som vist i figur 3 kunne en økning i motstanden til trykket allerede bli detektert med bare 0,5% C_5F_{12} i luft. Ved 1,4% C_5F_{12} overskrider motstanden mot trykket 120 mm Hg. Disse suspensjonene ble også injisert intravenøst inn i minigriser (0.5 ml pr 15 kg). Intensiteten ble målt ved videodensitometri som beskrevet i eksempel 1. Som vist i tabell 3 ble maksimal intensitet allerede oppnådd med 1,4% C_5F_{12} . Høyere prosentandeler C_5F_{12} resulterte i en forlengelse av halveringstiden og økning i AUC. Halveringstiden ($t_{1/2}$) ble bestemt ut fra den tiden som forløper fra injeksjon og til tidspunkt hvor intensiteten hadde falt til 50% av maksimalverdi. Arealet under kurven (AUC) ble målt frem til $t_{1/2}$.

Ekemplene 1-3 demonstrerer også at i motsetning til uttalelsene som er fremkommet i WO-A-93/05819 er det mulig å oppnå gode kontrastøkende midler fra gassblandinger hvor Q-verdiene er mindre og i visse tilfeller mye mindre enn 5.

Eksempel 4

58 milligram diarachidoylfosfatidylcholin (DAPC), 2.4 mg dipalmitoylfosfatidinsyre (DPPA) begge fra Avanti Polar Lipids (USA) og 3.94 g polyetylenglykol (PEG 4000 fra Siegfried) ble løst opp ved 60°C i tert-butanol (20 ml) i en rund-bunnet glassbeholder. Den klare oppløsningen ble hurtig avkjølt ved -45°C og lyofilisert. Alikvoter (25 mg) av den hvite kaken som ble oppnådd ble ført inn i 10 ml glassbeholdere.

"Tedlar"- gass prøvebagger ble fylt med gass, en med luft og en med svovelheksafluorid (SF_6). Forutbestemte volumer av gassene ble samlet fra hver bag gjennom septum ved anvendelse

av to separate sprøyter og innholdet blandet via en treveis stoppekran. De resulterende gassblandinger ble ført inn i 10
5 ml glassbeholdere som ble evakuert og lukket med gummipropper mens de fortsatt var under vakuum. 7 beholder inneholdt gassblandinger av luft og SF_6 i forskjellige forhold. Konsentrasjonen av SF_6 var mellom 0 og 100%. Den virkelige prosentandelen SF_6 i gassfasen ble bekreftet ved densimetri
10 (A. Paar densimeter). Saltvann (0.9% NaCl) ble deretter injisert gjennom korken inn i hver beholder (5 ml pr beholder) og pulveret løst opp ved omfattende risting. Resulterende mikroboblesuspensjonene ble vurdert in vitro og in vivo. Motstand mot trykk P_c ble bestemt ved anvendelse av
15 en nefelometrisk analyse og tilbakespredningskoeffisienten ble målt ved anvendelse av et pulsekkooppsett (begge beskrevet i EP-A-0 554 213). Boblekonsentrasjonen og gjennomsnittlig boblestørrelse ble bestemt ved analyser med en Coulter Multisizer II (Coulter Electronics Ltd.). Oppnådde
20 resultater var omtrent de samme som de som er angitt i eksempel 1.

25

30

35

TABELL 4

Gass A	Gass B	Gass B vol-%	Pc mmHg	Gass A M _{wt}	Gass B M _{wt}	Oppløselighet* gass A	Oppløselighet* gass B
O ₂	C ₄ F ₈	0	40	32	200	0.083	0.016
	C ₄ F ₈	5	112				
	C ₄ F ₈	10	148				
CO ₂	C ₄ F ₈	0	50	44	200	0.74	0.016
	C ₄ F ₈	5	-				
	C ₄ F ₈	10	204				
CHClF ₂	C ₄ F ₈	0	-	86.5	200	0.78	0.016
	C ₄ F ₈	5	106				
	C ₄ F ₈	10	163				
Xenon	C ₄ F ₈	0	50	131	200	0.108	0.016
	C ₄ F ₈	5	147				
	C ₄ F ₈	10	181				
SF ₆	C ₄ F ₈	0	124	146	200	0.005	0.016
	C ₄ F ₈	5	159				
	C ₄ F ₈	10	193				
N ₂	SF ₆	0	55	28	146	0.0144	0.005
	SF ₆	5	80				
	SF ₆	10	108				
CF ₄	SF ₆	0	84	182	146	0.0038	0.005
	SF ₆	5	91				
	SF ₆	10	106				
Xenon	SF ₆	0	50	131	146	0.108	0.005
	SF ₆	5	67				
	SF ₆	10	83				

* Bunsen-koeffisient

Eksempel 5

Et PEG/DSPC/DPPG-lyofilisat ble dannet som beskrevet i eksempel 4 ved anvendelse av 30 mg distearoylfosfatidylcholin (DSPC) og 30 mg dipalmitoyl-fosfatidylglycerol (DPPG) (begge fra SYGENA, Sveits). Alikvoter (25 mg) av den resulterende kaken ble ført inn i 10 ml glassbeholdere. Forskjellige

glassblandinger ble ført inn i forskjellige beholdere ved at hensiktsmessige volumer ble tatt ut fra Tedlar bagger fylt med forskjellige gasser. Tabell 4 viser de undersøkte gassblandingene, deres molekylvekt og deres oppløseligheter (uttrykt som Bunsen-koeffisient) og motstand mot trykk til mikroboblene som ble oppnådd. Det er spesielt interessant å merke seg at meget oppløselige gasser så som CO₂, xenon, CHClF₂ som alene er meget dårlig til å danne stabile og resistente bobler til tross for dette kan gi opphav til bobler som er meget stabile dersom en liten prosentandel gass så som SF₆ eller C₄F₈ blir tilsatt.

Eksempel 6

Frengangsmåten ifølge oppfinnelsen ble anvendt på en mikroboblesuspensjon fremstilt som beskrevet i eksempel 1 i WO 92/11873. Tre gram "Pluronic F68" (en kopolymer av polyoksyetylen-polypksypropylen med en molekylvekt på 8400), 1 g dipalmitoylfosfatidylglycerol og 3,6 g glycerol ble tilsatt til 80 ml destillert vann.

TABELL 5

Luft vol-%	C ₄ F ₈ vol-%	Pc (mmHg)	høyre t _{1/2}	ventr. intens	opacif. AUC	venstre t _{1/2}	ventr. intens	opacif. AUC
100	0	54	4	96	280	9	101	514
99	1	89	7	98	377	12	98	632
95	5	136	14	94	829	40	101	2693

luft C₅F₁₂

95	5	177	*	*	*	43	111	3249
----	---	-----	---	---	---	----	-----	------

* skyggevirkning

Etter oppvarming ved omtrent 80°C ble en klar homogen oppløsning oppnådd. Tensidoppløsningen ble avkjølt til

romtemperatur og volumet justert til 100 ml. Boblesuspensjonen ble oppnådd ved anvendelse av to sprøyter koblet via en 3-veis ventil. En av sprøytene ble fylt med 5 ml tensidoppløsning, mens den andre ble fylt med 0,5 ml luft eller luft/C₄F₈ blanding (se tabell 5). Tre-veis ventilen ble fylt med tensidoppløsningen før den ble koblet til den gassinneholdende sprøyten. Ved alternativt å betjene de to stemplene ble tensidoppløsningen overført frem og tilbake mellom de to sprøytene (5 ganger i hver retning) og melkeaktige suspensjoner ble oppnådd. Etter fortynning (1/50) i destillert vann mettet med luft ble motstanden mot trykk (Pc) bestemt. Alikvoter ble injisert intravenøst inn i bedøvede kaniner (0,03 ml/kg) og ekkografiske bilder av venstre ventrikkel ble registrert. Arealet under kurven (AUC) samt halveringstiden (t_{1/2}) ble bestemt. En betraktelig økning i halveringstiden og AUC ble observert ved anvendelse av 5% C₄F₈ (sammenlignet med luft). Lignende resultater ble oppnådd med 5% C₅F₁₂.

Eksempel 7

En suspensjon av mikrobobler ble oppnådd som beskrevet i WO-A-93/05819 ved anvendelse av blandinger av luft og oktafluorcyklobutan C₄F₈. En vandig oppløsning inneholdende (20 g), NaCl (0.9 g), søyabønneolje (6 ml), "Tween 20" (0,5 ml) ble fremstilt og justert til 100 ml destillert vann.

TABELL 6

Luft vol-%	C ₄ F ₈ vol-%	høyre ventr. opacif.	venstre ventr. opacif.	luft vol-%	C ₅ F ₁₂ vol-%	høyre ventr. opacif.	venstre ventr. opacif.
100	0	+	-	100	0	+	-
99	1	+	-	99	1	+	+
95	5	++	-	95	5	++	++

"-" ingen opacifisering
"+" moderat opacifisering
5 "++" god opacifisering

En annen 10 ml sprøyte ble fylt med blandingen av luft og C_4F_8 . To sprøyter ble koblet via en 3-veis stoppekran. Ved alternativt å drive hver av de to stemplene totalt 20 ganger
10 ble melkeaktive suspensjoner oppnådd. Disse suspensjonene ble testet for deres motstand mot trykk. Alikvotene ble også injisert intravenøst med bedøvede kaniner (0,1 ml/kg) og ekkografiske bilder av venstre ventrikkel ble registrert. Det var interessant at det ikke ble detektert noen kontrast i den
15 venstre ventrikkel med 1% eller til og med 5% C_4F_8 . Opacifisering av venstre ventrikkel ble derimot oppnådd med 1% og til og med mer med 5% C_5F_{12} .

20 Eksempel 8

Et PEG/DSPC/DPPG-lyofilisat ble fremstilt som beskrevet i eksempel 4 ved anvendelse av 30 mg distearoylfosfatidylcholin (DSPC) og 30 mg dipalmitoyl-fosfatidylglycerol (DPPG) (begge
25 fra SYGENA, Sveits). Alikvoter (25 mg) av den resulterende kaken ble ført inn i 10 ml glassbeholdere. Forskjellige gassblandinger ble ført inn i forskjellige beholdere ved å ta ut hensiktsmessige volumer fra Tedlar baggene fylt med forskjellige gasser. Tabell 7 viser gassblandinger som ble
30 undersøkt og motstanden mot trykk til mikroboblene som ble oppnådd. Det er å bemerke at gassen med høy molekylvekt til og med kan være en blanding av to eller flere gasser med høy molekylvekt og oppløselighet (uttrykt som Bunsen-koeffisient) som er under 0,0283.

TABELL 7

5	Prøve	C ₄ F ₈ vol-%	CF ₄ vol-%	luft vol-%	Pc mmHg	Aborbanse
	A ₁	5	15	80	113	0.284
	A ₂	10	10	80	147	0.281
10	A ₃	15	5	80	167	0.281

Det fremgår at i stedet for en enkelt gass (B) kan blandinger av to eller flere aktiverende eller mindre komponentgasser også bli anvendt. I dette eksempelet er det kritiske trykket proporsjonal med prosentandelen av den tyngre av de to komponentene, men til tross for dette antas det at andre kombinasjoner av gasser kan ytterligere redusere den totale mengden av den uoppløselige gassen(ene) i blandingen gjennom synergi.

25

30

35

P a t e n t k r a v

1.

Injiserbart ultralydkontrastmedium omfattende forbindelser som er

- 5 biokompatible gassformige ved kroppstemperatur som når de suspenderes i en
vandig bærevæske inneholdende vanlige overflateaktive midler, additiver og
stabiliserende midler tilveiebringer kontrastmidler for ultralydekkografi,
k a r a k t e r i s e r t v e d at mediet er en blanding av gassene (A) og (B),
hvor gass (B), er en fluor-inneholdende biokompatibel gass valgt fra gruppen
10 bestående av SF₆, CF₄, C₂F₆, C₃F₆, C₃F₈, C₄F₆, C₄F₈, C₄F₁₀, C₅F₁₀, C₅F₁₂ og
blandinger derav, tilstede i en mengde på mellom 0,5 – 41 vol %, har en
molekylvekt som er høyere enn 80 dalton og dets oppløselighet i vann er under
0,0283 ml gass per ml vann målt under standardbetingelser, i det likevekten til
blandingen utgjøres av gassen A utvalgt fra gruppen bestående av luft,
15 oksygen, nitrogen, karbondioksyd og blandinger derav.

2.

Ultralydkontrastmedium ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den fluor-
inneholdende gassen (B) er svovelheksafluorid eller oktafluorsyklobutan.

20

3.

Ultralydkontrastmedium ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at den
vandige bærervæsken omfatter kopolymerer av polyoksyetylen,
polyoksypropylen og glyserol.

25

4.

Injiserbart ultralydkontrastmiddel omfattende en suspensjon av gassfylte
mikrobobler og mikrobeballonger i en fysiologisk akseptabel bærervæske
omfattende vanlige overflateaktive midler, additiver og stabiliserende midler, k a

30

r a k t e r i s e r t

v e d at gassen er en gassblanding av minst to biokompatible gasser A og B
hvor gassen (B) er en fluor-inneholdende biokompatibel gass valgt fra gruppen
bestående av SF₆, CF₄, C₂F₆, C₃F₆, C₃F₈, C₄F₆, C₄F₈, C₄F₁₀, C₅F₁₀, C₅F₁₂ og
blandinger derav, tilstede i en mengde på mellom 0,5 – 41 vol %, har en
35 molekylvekt som er høyere enn 80 dalton og oppløselighet i vann under 0,0283
ml per ml vann ved standardbetingelser, i det likevekten til blandingen utgjøres

av gassen A utvalgt fra gruppen bestående av luft, oksygen, nitrogen, karbondioksyd eller blandinger derav.

5 5.

Ultralydkontrastmiddel ifølge krav 4, k a r a k t e r i s e r t v e d at den fluor-inneholdende gassen (B) er svovelheksafluorid eller oktafluorsyklobutan.

6.

10 Ultralydkontrastmiddel ifølge krav 4, k a r a k t e r i s e r t v e d at de overflateaktive midlene omfatter minst et filmdannende overflateaktivt middel til stede i laminær og/eller lamellær form og, eventuelt, hydrofile stabiliserende midler.

15 7.

Ultralydkontrastmiddel ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at det filmdannende overflateaktive middelet er et fosfolipid.

8.

20 Ultralydkontrastmiddel ifølge krav 7, k a r a k t e r i s e r t v e d at fosfolipidet velges fra gruppen bestående av fosfatidinsyre, fosfatidylcholin, fosfatidyletenolamin, fosfatidylserin, fosfatidylglyserol, fosfatidylinositol, kardiolipin, sphingomyelin og blandinger derav.

25 9.

Ultralydkontrastmiddel ifølge krav 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at i tillegg til fosfolipidet omfatter den vandige bæreren kopolymerer av polyoksyetylen og polyoksypropylen og glyserol.

30 10.

Ultralydkontrastmiddel ifølge krav 4, k a r a k t e r i s e r t v e d at de overflateaktive midlene er soyabønneolje, polysorbat ("Tween") og/eller sorbitol.

11.

35 Tørrformulering, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter overflateaktive midler, additiver og stabiliserende midler lagret under en blanding av forbindelser som ved kroppstemperatur er biokompatible gasser (A) og (B) der

gassen (B) er en fluor-inneholdende biokompatibel gass utvalgt fra gruppen bestående av SF₆, CF₄, C₂F₆, C₃F₈, C₃F₆, C₄F₆, C₄F₈, C₄F₁₀, C₅F₁₀, C₅F₁₂ og blandinger av disse, til stede i en mengde mellom 0,5 – 41 vol %, har en molekylvekt som er høyere enn 80 dalton og oppløselighet i vann under 0,0283 ml per ved standardbetingelser, idet likevekten til blandingen utgjøres av gassen (A) utvalgt fra gruppen bestående av luft, oksygen, nitrogen, karbondioksid og blandinger av disse.

12.

Tørrformulering ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at den fluor-inneholdende gass (B) er svovelheksafluorid eller oktafluorsyklobutan.

13.

Tørrformulering ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at de overflateaktive midler omfatter minst ett filmdannende overflateaktivt middel til stede i laminær og/eller lamellær form og, eventuelt, hydrofile stabiliserende midler.

14.

Tørrformulering ifølge krav 13, k a r a k t e r i s e r t v e d at det filmdannende overflateaktive middel er et fosfolipid.

15.

Tørrformulering ifølge krav 14, k a r a k t e r i s e r t v e d at fosfolipidet velges fra gruppen bestående av fosfatidinsyre, fosfatidylcholin, fosfatidyletanolamin, fosfatidylserin, fosfatidylglyserol, fosfatidylinositol, kardiolipin, sphingomyelin og blandinger derav.

16.

To-komponentsett, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter, som første komponent, tørrformuleringen ifølge krav 11-15 og, som den andre komponent en fysiologisk akseptabel bærervæske der, når den blandes med den første komponent frembringer, som en suspensjon av de to komponentene, et ultralydkontrastmiddel.

17.

Fremgangsmåte for fremstilling av ultralydkontrastmiddel ifølge krav 4, k a r a k t e r i s e r t v e d at en gassblanding av minst to biokompatible komponenter

- (A) og (B) suspenderes i en fysiologisk akseptabel vandig bærervæske inneholdende vanlige overflateaktive midler, additiver og stabiliserende middel for å danne gassfylte mikrobobler eller mikrobulloner kjennetegnet ved at den minimale effektive proporsjonen av minst én gasskomponent i nevnte blanding
5 av gasser blir bestemt ifølge kriteriene

$$B_c\% = K/e^{bM_{wt}} + C$$

- 10 hvor $B_c\%$ (i volum) er den totale mengden av komponent B i blandingen, K, C og b er konstanter med verdiene henholdsvis 140, -10,8 og 0,012, M_{wt} representerer molekylvekten til komponent B som er >80.

18.

- 15 Fremgangsmåte for fremstilling av ultralydkontrastmiddel ifølge krav 17, karakterisert ved at det overflateaktive middelet er et fosfolipid valgt fra gruppen bestående av fosfatidinylsyre, fosfatidylcholin, fosfatidyletanolamin, fosfatidylserin, fosfatidylglyserol, fosfatidylinositol, kardiolipin, sphingomyelin og blandinger derav.

20 19.

Anvendelse av ultralydkontrastmedium ifølge krav 1 for fremstilling av ultralydkontrastmidler.

20.

- 25 Anvendelse av tørrformuleringen ifølge krav 11 for fremstilling av ultralydmediet ifølge krav 1-3.

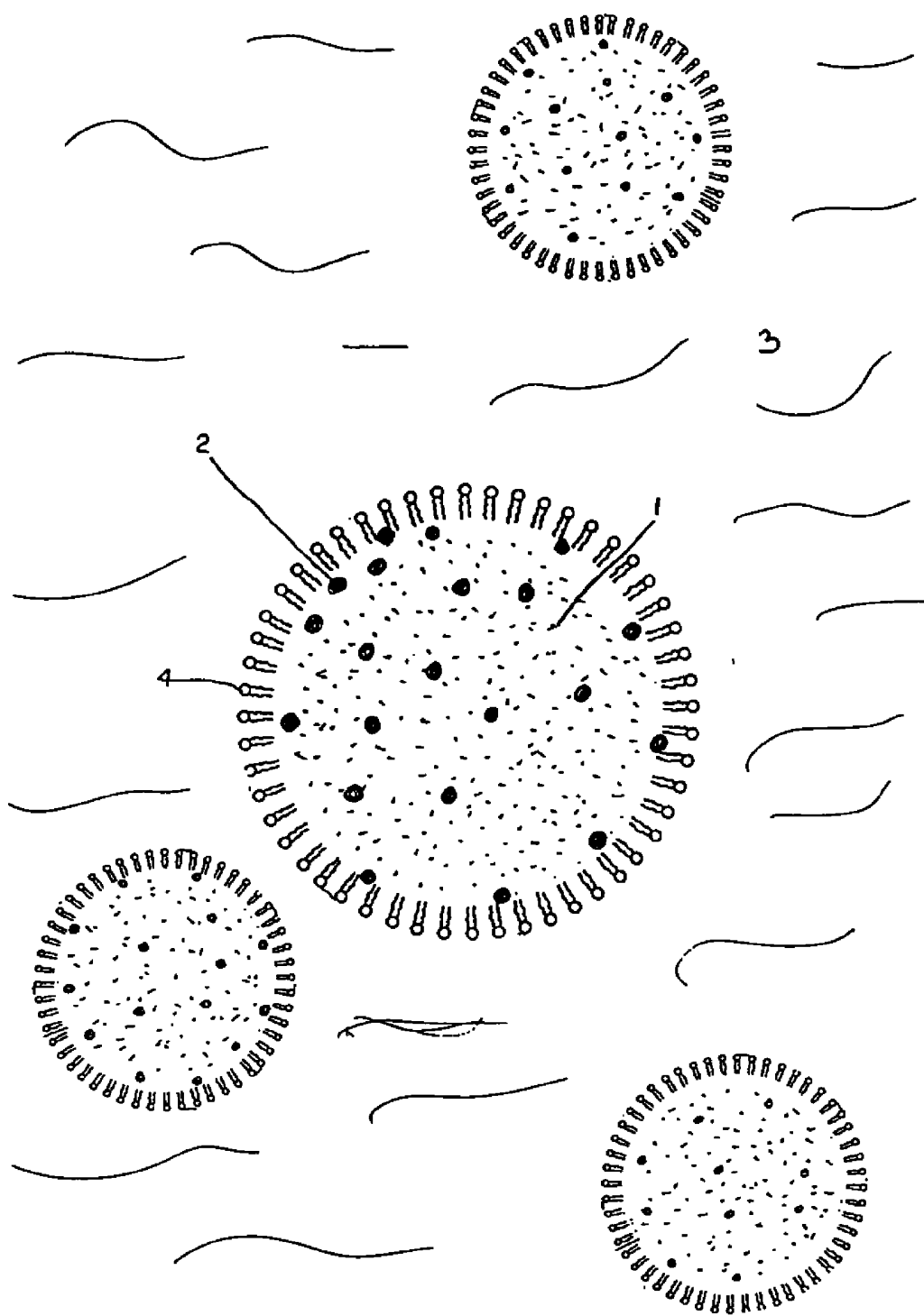


Fig. 1

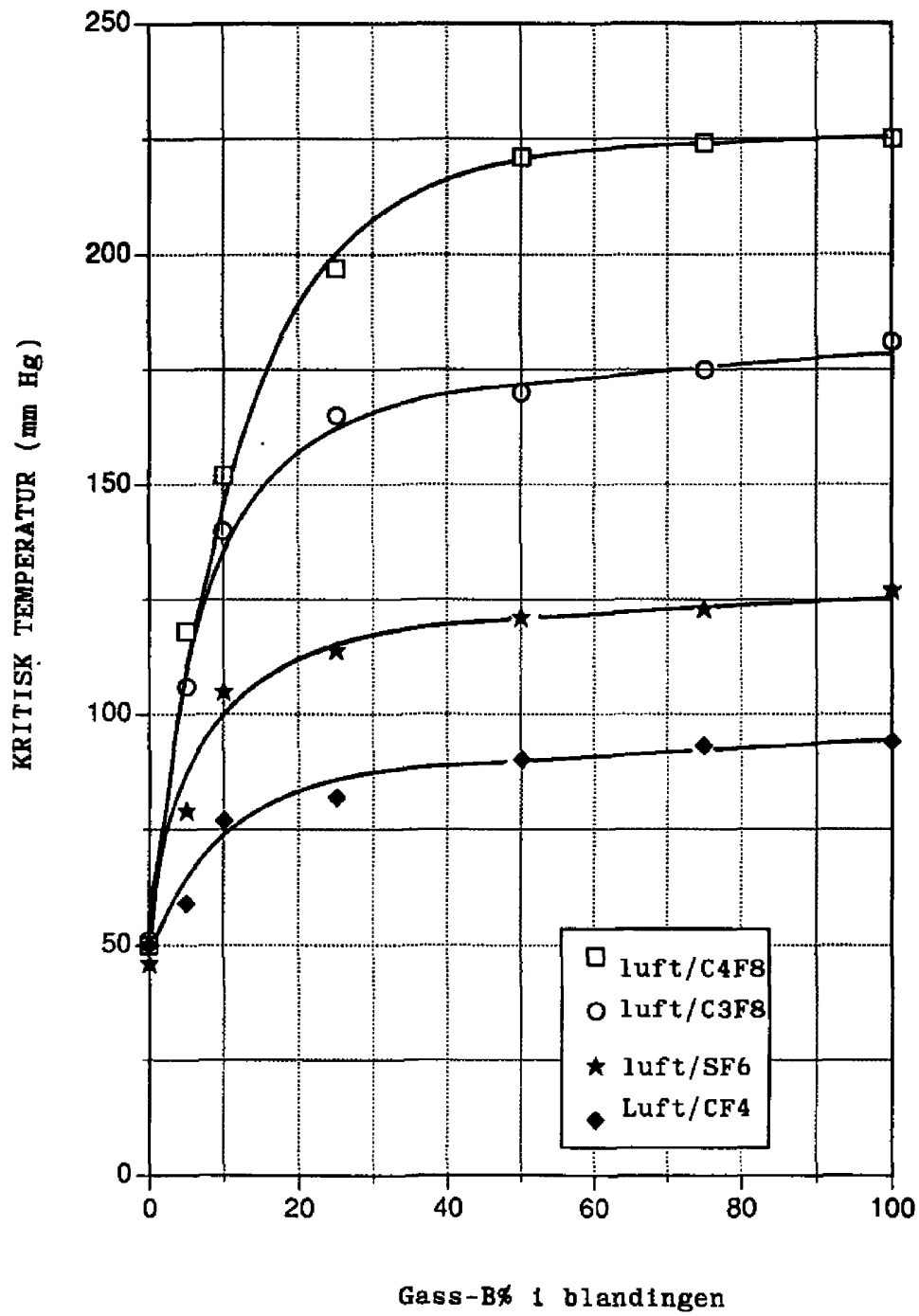
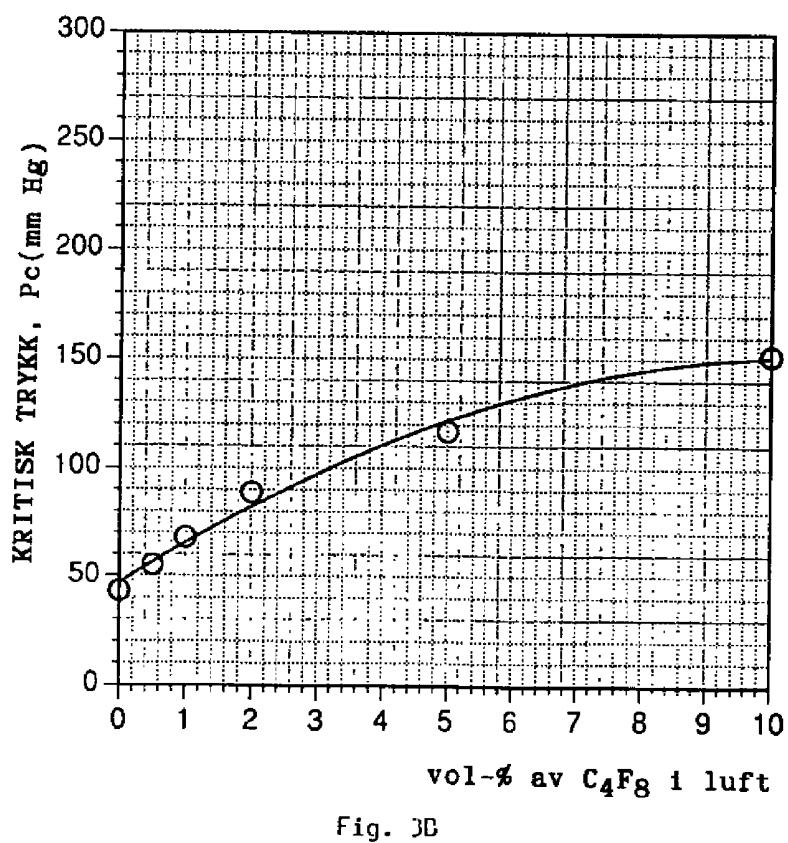
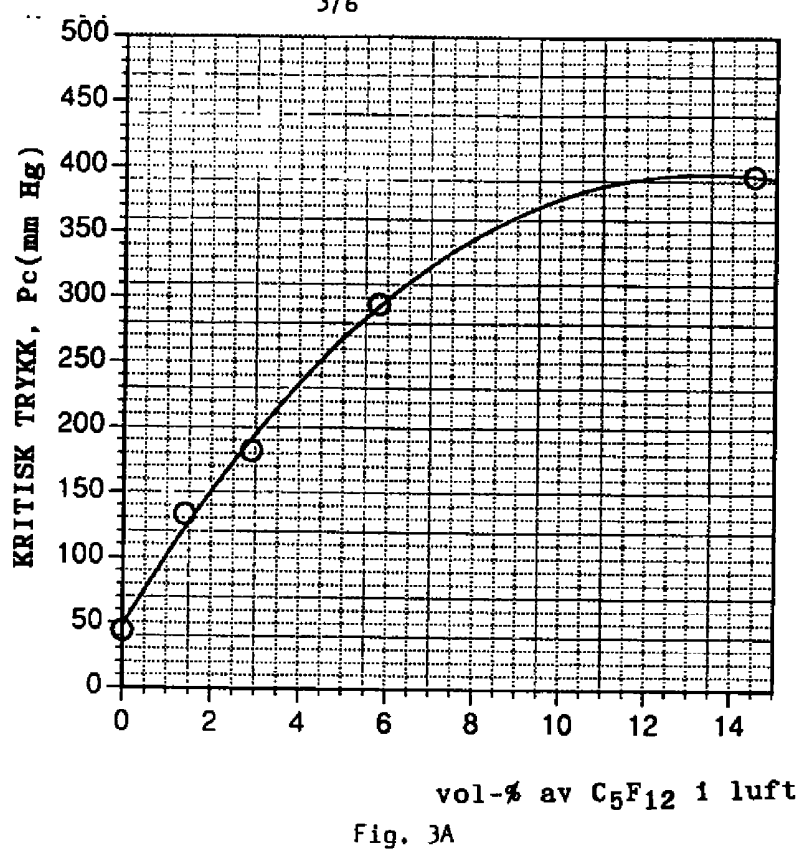


Fig. 2



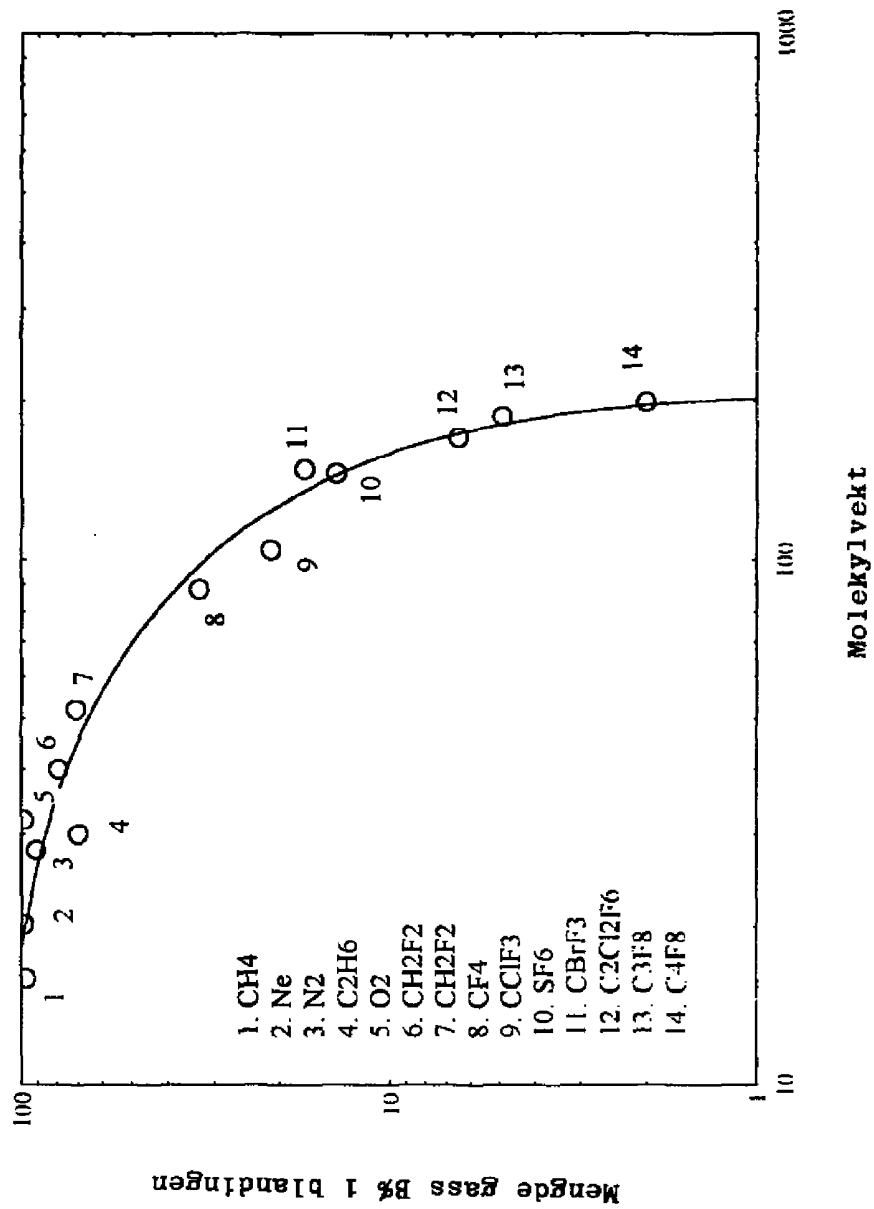


Fig.4

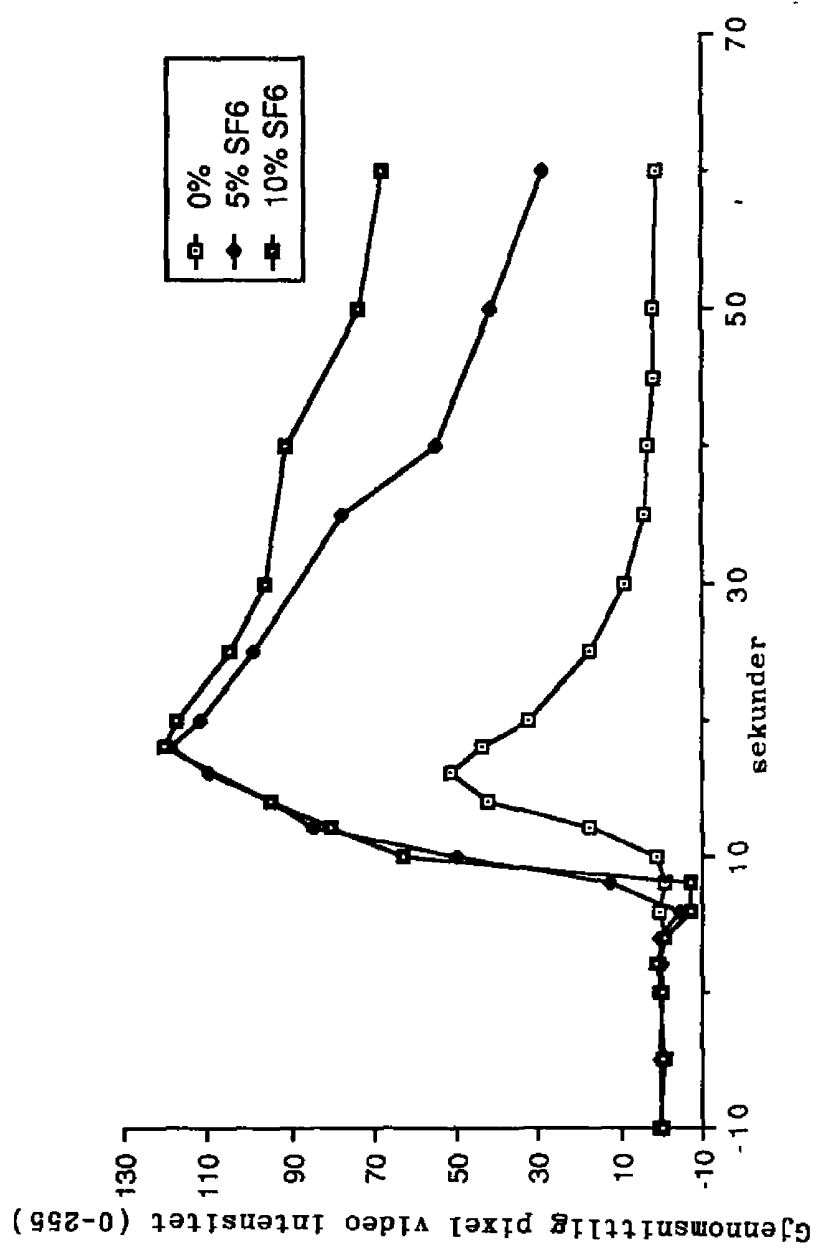


Fig. 5

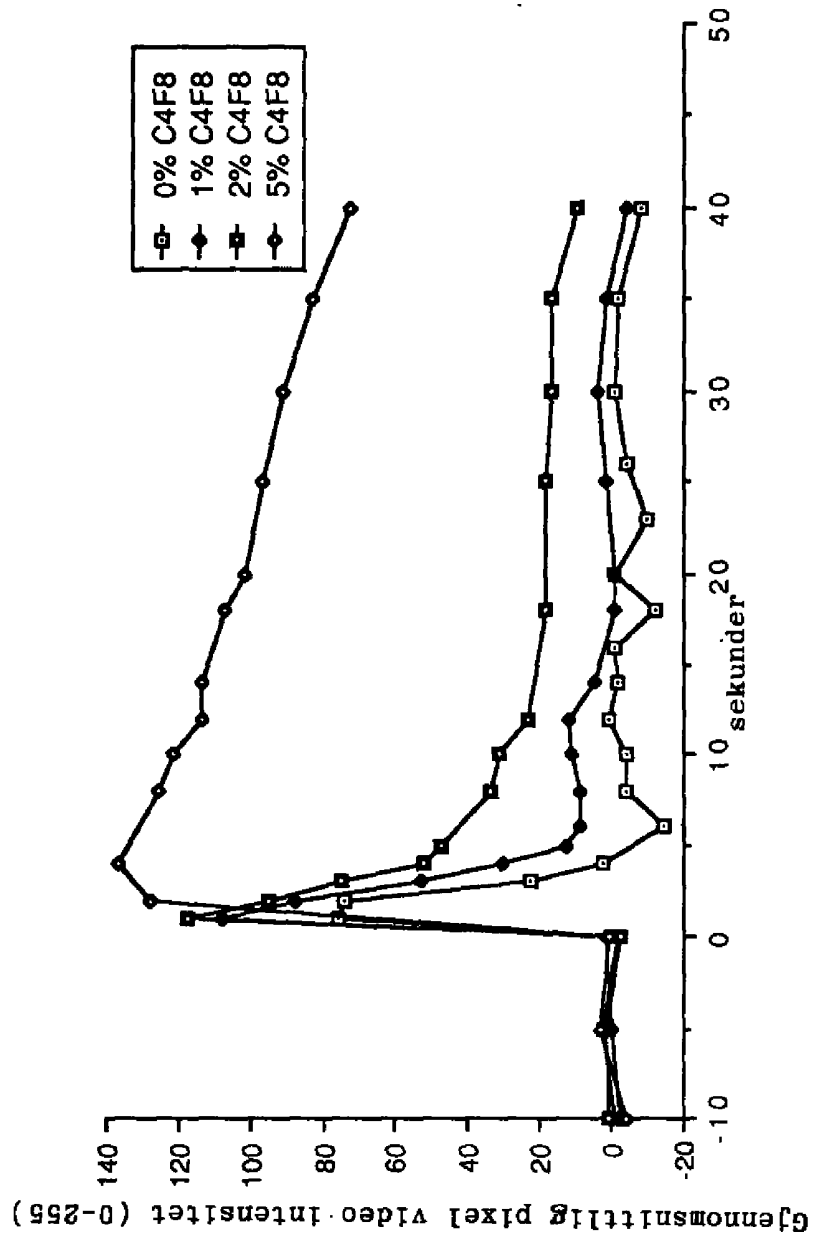


Fig. 6