(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

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

(10) **FI 941677 A7**

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 941677

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

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **30.07.1993**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **12.04.1994**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **12.04.1994**

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

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **30.07.1993 PCT/EP1993/002046**

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

13.08.1992 EP 92810618 25.05.1993 EP 93810380

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • BRACCO International B.V., 7, de Boelelaan, 1083 HJ Amsterdam, ALANKOMAAT, (NL)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Tournier, Herve, France, RANSKA, (FR)
2 • Hyacinthe, Roland, France, RANSKA, (FR)
3 • Schneider, Michel, Troinex, SVEITSI, (CH)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

NMR-kuvaukseen soveltuvia hiukkasia ja valmistusmenetelmä

För NMR-avbildning lämpliga partiklar och deras framställningsförfaran de

NMR-kuvaukseen soveltuvia hiukkasia ja valmistusmenetelmä

Keksinnön kenttä

Keksintö koskee rautaoksidihiukkasia, jotka ovat suspendoituina injektoitavissa potilaiden verenkiertoon. Hiukkasilla on parantunut stabiilisuus agglomeroitumista vastaan ja koska ne ovat suhteellisen "näkymättömiä" retikuloendoteelijärjestelmälle (RES), niillä on suurentunut vastustuskyky makrofagien toimesta tapahtuvaa poistoa kohtaan. Hiukkaset soveltuvat varjoaineiden valmistamiseen verenkierron kuvantamista varten.

Alan tausta

Rautaoksidihiukkasten käyttö injektoitavissa olevien vesisuspensioiden muodossa diagnostisiin tarkoituksiin on herättänyt paljon kiinnostusta menneisyydessä. Ferromagneettisia lajikkeita tai superparamagneettisia magnetiittimikrokiteitä on käytetty varjoaineina maksan ja pernan magneettikuvauksessa (MRI). Niiden käyttö varjoaineina kyseisissä elimissä perustuu huomioon, että RES tunnistaa ne pian injektoinnin jälkeen ja ne kaapataan nopeasti. Hiukkaset poistetaan sitten verenkierrosta, varastoidaan maksassa ja pernassa ja poistetaan myöhemmin. Paljon ponnisteluja on uhrattu tunnettujen formuloiden parantamiseen päämääränä superparamagneettisten hiukkasten vastaanoton kohde-elimiin, esimerkiksi maksaan, pernaan tai luuytimeen, lisääminen ennen niiden poistoa kehosta ja niiden käytön tekeminen siten järkevämmäksi.

NMR-analyysin kehittymisen myötä on havaittu, että huomattava parannus tekniikkaan ja tärkeä edistysaskel alalla saavutettaisiin saamalla aikaan varjoaine, jonka ominaisuudet mahdollistaisivat NMR-analyysin käyttämisen koko kehon alueella eikä vain sen tietyissä osissa. Tätä tarkoitusta varten olisi kuitenkin välttämätöntä valmistaa varjoaine, jonka magneettiset ominaisuudet ovat ainakin yhtä hyvät kuin tähän saakka tunnetuilla rautaoksidihiuk-

kasilla, mutta jolla on pitempi viipymisaika verenkierrossa kuin millään muulla hiukkasella, joka on tällä alalla tunnettu. Tässä suhteessa ratkaistavana ongelmana oli siis löytää hiukkanen, jota RES ei tietyn ajanjakson jälkeen tunnistaisi. On kuitenkin raportoitu, että parannettuja rautaoksidihiukkasia voidaan saada aikaan käyttämällä erilaisia päällystysaineita, jotka niille levitettyinä joko muuntavat viipymisaikoja tai auttavat hiukkasten toimittamista muihin spesifisiin kohtiin eläin- tai ihmisruumiissa.

EP-hakemusjulkaisussa 0 272 091 (Vestar) on tuotu esille kiinteiden hiukkasten, jotka sisältävät aktiivista aineosaa, so. magnetiittia (tai muita diagnostisia aineita tai lääkeaineita), joka aineosa muodostaa mainittujen hiukkasten ytimen, päällystys yhden molekyylin paksuisella ensimmäisellä kerroksella, joka koostuu amfifiilista, joka voi olla liittyneenä ytimen aineosaan; systeemi käsittää sitten ulomman toisen kerroksen, joka voi sisältää kahden molekyylin paksuisen kerroksen fosfolipidejä (so. liposomikalvoa vastaavan kerroksen), joka koteloi amfifiilin. Esimerkeissä magnetiittihiukkaset, jotka oli päällystetty käyttäen palmitiinihappoa pinta-aktiivisena aineena, koteloitiin kolesterolin ja distearoyylifosfatidyylikoliinin seoksesta valmistettujen liposomien sisään. Järjestelyn yksi tarkoitus on stabiloida aktiivinen aineosa verenkierrossa poistoa vastaan.

EP-hakemusjulkaisussa 0 275 285 (Advanced Magnetics) on esitetty päällystettyjä ja päällystämättömiä magnetiittihiukkasia käytettäviksi varjoaineena NMR-kuvauksessa. Päällystettäessä hiukkaset ympäröidään polymeerilla, johon voidaan sitoa biologisesti aktiivisia molekyylejä. Päällystettyjen hiukkasten tapauksessa biologiset molekyylit voidaan valita asettaen kohteiksi määrätyt elimet tai kudokset. Esitettyjä polymeeripäällysteitä voidaan valmistaa proteiineista, kuten albumiinista, polysakkari-

deista, kuten dekstraanista, polypeptideistä, kuten polyglutamaateista tai polylysiineistä, tai organosilaaneista, kuten N-2-aminoetyyli-3-aminopropyylitrimetoksisilaanista. Biologiset molekyylit, joita voidaan liittää kovalenttisesti päällysteeseen, ovat vasta-aineita, hiilihydraatteja tai hormoneja, jotka voivat parantaa hiukkasten spesifisyyttä ja biojakaantumista määrättyihin kohtiin elimistössä .

EP-hakemusjulkaisussa 0 354 855 (Terumo) on tuotu esille liposomeja lääkeaineiden kantajina toimivina rakkuloina, jotka liposomit sisältävät rakkulan lipidikerroksessa polyetyleeniglykoliin sitoutunutta fosfolipidiä. Hydrofobinen fosfolipidiosa on uponneena kalvon muodostaviin lipideihin tai sitoutuneena niihin, kun taas hydrofiilinen polyetyleeniglykoliosa on niistä ulkoneva ja ulottuu ympäröivään väliaineeseen. Liposomirakkuloiden mainitaan olevan käyttökelpoisia keinotekoisten erytrosyyttien valmistamisessa koteloimalla hemoglobiini rakkuloiden sisään.

US-patenttijulkaisussa 4 904 479 (Illum) on tuotu esille polystyreenihiukkasten päällystys amfifiilisilla lohkopolymeereilla, joissa on samanaikaisesti hydrofiilisia ja hydrofobisia segmenttejä (esim. Poloxamer^{R} ja Poloxamine^{R}). Päällysteen on tarkoitus minimoida opsonisaatio injektoinnin jälkeen ja mahdollistaa hiukkasten ohjaaminen mieluummin luuytimeen kuin maksaan tai pernaan. Poloxamer^{R} ja Poloxamine^{R} ovat amfifiilisia lohkopolymeereja, jotka sisältävät peräkkäisiä hydrofobisia polyoksipropyleenisegmenttejä ja hydrofiilisia polyoksietyleenisegmenttejä; mitä tulee suojaukseen maksaan vastaanotolta, arvellaan, että hydrofiiliset segmentit pistävät esiin hiukkasen ulomman päällysteen pinnasta estäen siten opsoniinin saostumisen sille ja tehden hiukkasista vaikeammin makrofagien tunnistettavissa olevia.

Vaikka tekniikan tasoa edustavilla menetelmillä on ansionsa, ne käsittelevät vain yhtä hyvin spesifistä sellaisten hiukkasten ongelmaa, jotka voidaan kohdentaa selektiivisesti eri mutta spesifisiin kohtiin (esim. maksaan, pernaan, keuhkoihin, imusolmukkeisiin, luuytimeen jne.), kun taas tämän keksinnön tavoitteeksi on asetettu sellaisten hiukkasten valmistusta koskevan ongelman ratkaisu, joita RES ei tunnista, jotka säilyvät veressä pitkiä ajanjaksoja ja soveltuisivat pitkäikäisten verenkiertoon annettavien aineiden valmistukseen.

Tekniikan tasoa edustavat hiukkaset edellyttävät kalliita valmistustekniikkoja ja tuottavat tulokseksi hiukkasia, jotka RES injektoinnin jälkeen tunnistaa ja jotka poistuvat helposti verestä. Sellaisia hiukkasia ja niistä valmistettuja varjoaineita ei voida käyttää sovellutuksissa, joissa vaaditaan suhteellisen pitkää biologista puoliintumisaikaa.

Varjoaineet, jotka säilyvät veressä pitkään, ts. joilla on vastustuskykyä RES-vastaanoton suhteen ja suhteellisen pieni diffundoituvuus kudokseen eli ekstravaskulaarisiin kohtiin, tunnustetaan alalla erityisen käyttökelpoiseksi "verenkiertoon annettavina" aineina. Pitkä biologinen puoliintumisaika on joskus toivottava verenkiertoon annettavilla aineilla, mikäli halutaan saada mielekkäitä analyysituloksia toistuvaa injektointia ja varjoaineiden runsasta käyttöä. Sellaisten pitkäikäisten verenkiertoon annettavien aineiden aikaansaamiseksi olisi vältämätöntä valmistaa "salassa pysyviä" hiukkasia, joita RES ei tietyn ajanjakson kuluessa tunnistaisi, ja jotka kuitenkin saisivat aikaan riittävän magneettisen relaksaatiovasteen. Todellisen "salassa pysyvän" rautaoksidihiukkasen olemassaolo mahdollistaisi NMR-analyysin tekemisen kehosta kokonaisuudessaan eikä vain sen paikallisista osista tai määrätyistä elimistä, kuten tähän saakka tunnetuilla varjoaineilla on tehty. Salahiukkaset tekisivät siten mahdol-

lisiksi mittaukset suurista veritilavuuksista ja eri elinten, aivot mukaan luettuina, veriperfuusion ei-invasiivisia menettelytapoja käyttäen. Esimerkiksi aivokuoren verihappitilanteessa aktivaatiotehtävien aikana tapahtuvien muutosten seuraaminen kävisi mahdolliseksi.

Hiukkaset, jotka kykenisivät säilymään verenkierrossa pitkiä aikoja, antaisivat myös erittäin arvokasta tietoa solujen tilasta ja ravintoaineiden jakautumisesta eri elimissä erilaisissa fyysisissä olosuhteissa. Sellaisista hiukkasista valmistetut varjoaineet mahdollistaisivat suoraan selvän käsityksen saamisen mikroverenkierrosta ja solujen aineenvaihduntasykleistä kehossa ja avaisi siten uusia teitä elollisissa eliöissä tapahtuvien prosessien ymmärtämiseksi paremmin johtaen siten anomalioiden, kuten kasvainten kehittymisen, havaitsemiseen paremmin. Aikaisemmin ei ole kuitenkaan onnistuttu saamaan aikaan pitkäikäisiä magnetiittihiukkasia ja niistä verenkiertoon annettavia varjoaineita, jotka mahdollistaisivat sellaisten mittausten tekemisen ja haluttujen tietojen saamisen näillä analysointimenettelytavoilla.

Yhteenveto keksinnöstä

Lyhyesti ilmaistuna tämä keksintö koskee verenkiertoon annettavia varjoaineita, jotka soveltuvat ihmis- ja eläinruumiin diagnostiseen kuvantamisanalyysiin, edullisesti MRI-analyysillä, ja jotka säilyvät verenkierrossa pitkiä ajanjaksoja ja mahdollistavat siten mittaukset suurista veritilavuuksista ja eri elinten veriperfuusion. Tarkemmin määriteltynä keksintö koskee varjoaineita, jotka ovat erityisen vastustuskykyisiä nopean RES-vastaanoton suhteen ja säilyvät injektoinnin jälkeen verenkierrossa paljon pitempään kuin tähän saakka tunnetut verenkiertoon annettavat varjoaineet. Keksinnön mukaiset verenkiertoon annettavat varjoaineet sisältävät rautaoksidihiukkasia, jotka on stabiloitu kolmiulotteisella kuorikerroksella, joka sisältää amfipaattisen yhdisteen ja ionittoman pinta-

aktiivisen aineen molekyylejä. Amfipaattisessa yhdisteessä on hydrofiilinen, negatiivisesti varautunut, fosforia sisältävä pääosa sitoutuneena hydrofobiseen häntäosaan ja sille on tunnusomaista, että se on misellimuodossa. Kolmiulotteisen kuorikerroksen ioniton pinta-aktiivinen aine aiheuttaa amfipaattisen yhdisteen olemisen mainitussa misellimuodossa, ja amfifiilin hydrofiilisessa, fosforia sisältävässä pääosassa (edullisesti fosforyyliosassa) on vähintään kaksi negatiivista varausta. Kolmiulotteinen kuori muodostetaan amfipaattisen yhdisteen molekyyleistä, joiden negatiiviset fosforyylipääosat osoittavat rautaoksidiydintä kohti ja hydrofobiset häntäosat työntyvät siitä ulospäin muodostaen siilimäisen rakenteen. Siilimäinen rakenne toimii pohjana kolmiulotteisen kuoren muodostamiselle kiinnittämällä siihen ioniton pinta-aktiivinen aine. Amfipaattisen yhdisteen ollessa fosforihapon monoalkyyli- tai -alkenyyliesteri tai glyserofosfolipidi ulkokerros sisältää ionitonta pinta-aktiivista ainetta, jonka hydrofobiset osat ovat lomittain tai kietoutuneina yhteen esterin alkyyli- tai alkenyyliketjun tai glyserofosfolipidin kanssa stabiloiden rakennetta lisää. Kummassakin tapauksessa on tarkoitus käyttää hyväksi ionittoman pinta-aktiivisen aineen luontaista kykyä muodostaa näistä molekyyleistä misellejä.

Edulliset glyserofosfolipidit koostuvat substituoidun tai osittain substituoidun polyalkoholin monofosfaattiesteristä ainakin yhden mainitun polyalkoholin muista funktionaalisista alkoholiryhmistä ollessa esteröity pitkäketjuisella, tyydyttyneellä tai tyydyttymättömällä, alifaattisella rasvahapolla tai eetteröity pitkäketjuisella, tyydyttyneellä tai tyydyttymättömällä alkoholilla ja fosforihapon kahden muun funktionaalisen happoryhmän ollessa joko vapaita tai muunnettu suoloiksi alkali- tai maa-alkalimetalleilla. Tarkemmin määriteltynä glyserofosfolipidi on edullisesti rasvahappoglyseridin monofosfaatti, joka

voi olla dimyristoyylifosfatidihappo, dipalmitoyylifosfatidihappo tai distearyylifosfatidihappo.

Yksi edullinen ioniton pinta-aktiivinen aine on fysiologisesti hyväksyttävä pinta-aktiivinen aine, joka koostuu ainakin yhdestä lohkopolymeerista, joka sisältää polyoksietyleeni- ja polyoksipropyleenisegmenttejä, tai polyetyleeniglykoliheksadekyylieetteristä. Tällaisia pinta-aktiivisia aineita on myytävinä kauppanimillä Pluronic^{R}, Poloxamer^{R}, Poloxamine^{R}, Synperonic^{R} ja BRIJ^{R}.

Valmistuksensa jälkeen keksinnön mukaiset hiukkaset voidaan steriloida ja sen jälkeen kylmäkuivata steriilin jauheen aikaansaamiseksi, jota voidaan varastoida pitkiä ajanjaksoja. Sellaisessa tapauksessa keksinnön mukainen varjoaine muodostetaan kylmäkuivatusta jauhemaisesta formulasta dispergoimalla jauhe fysiologisesti hyväksyttävään nestemäiseen kantaja-aineeseen. Saatava suspensio on valmis annettavaksi.

Keksintö koskee lisäksi menetelmää hiukkasten valmistamiseksi samoin kuin niiden käyttöä varjoaineina ihmis- tai eläinruumiin NMR-kuvauksessa.

Lyhyt selitys piirroksista

Kuvio 1a on poikkileikkauskaaviokuva rautaoksidin siilimäisestä rakenteesta, joka on ominainen keksinnön mukaiselle hiukkaselle ja jossa ioniton pinta-aktiivinen aine muodostaa kolmiulotteisen kuoren hiukkasen ympärille.

Kuvio 1b on osa kolmiulotteisesta kuvasta, joka esittää rautaoksidin siilimäistä rakennetta, joka on ominainen keksinnön mukaiselle hiukkaselle.

Kuvio 2 on kaavio, joka kuvaa keksinnön mukaisten rautaoksidihiukkasten ja tekniikan tasoa edustavilla hiukkasilla saavutettujen viipymisaikojen tai "aktiivisuuden" [(ilmaistuna käyrän alapuolelle jäävän alueen pinta-alana (AUC)] vertailua.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Tämän keksinnön mukaiset hiukkaset koostuvat pohjimmiltaan rautaoksidiytimestä ja ulommasta kerroksesta, joka koostuu amfipaattisen yhdisteen ja ionittoman pinta-aktiivisen aineen molekyyleistä. Amfipaattinen yhdiste, joka sisältää suhteellisen voimakkaasti varautuneen hydrofiilisen osan, joka on kiinni rautaoksidin pinnassa, voi olla fosforihapon monoalkyyli- tai -sykloalkyyli- tai -alkenyyliesteri tai negatiivisesti varautunut glyserofosfolipidi. Termi "syklo" tarkoittaa tässä käytettynä sitä, että molekyylin rengasrakenteinen osa voi olla 5 - 7-jäseninen, voi olla tyydyttynyt tai tyydyttymätön (aromaattinen) tai voi sisältää heteroatomeja (heterosykliset ryhmät). Kussakin tapauksessa ulkokerros, jolla on kolmiulotteisen kuoren muoto, sisältää ionitonta pinta-aktiivista ainetta, jonka hydrofobiset osat ovat lomittain tai kietoutuneina yhteen esterin alkyyli- tai alkenyyliketjun kanssa stabiloiden kolmiulotteista rakennetta lisää. Ionittoman pinta-aktiivisen aineen täytyy myös kyetä muodostamaan fosforihapon monoesteristä tai fosfolipidistä misellejä, koska vain misellimuodossa mainituilla yhdisteillä on riittävä affiniteetti rautaoksidiytimen suhteen ja niitä siis voidaan käyttää magnetiittihiukkasten stabiloijina. Fosforyylipään ja Fe_3O_4:a välisen affiniteetin täytyy olla sellainen, että ionittoman pinta-aktiivisen aineen läsnä ollessa ja ultraäänellä käsiteltäessä misellaarinen fosfolipidi tai monoesteri muodostaa siilimäisen esiasteen, joka sen jälkeen toimii pohjana kolmiulotteisen ulkokuoren muodostamiselle, joka kuori muodostetaan saattamalla pinta-aktiivisen aineen hydrofobiset segmentit ja amfipaattisen yhdisteen hydrofobiset osat vuorovaikutukseen keskenään. Kolmiulotteinen rakenne muodostaa silloin stabiilin hiukkasen, jota RES ei kykene tunnistamaan. Siksi keksinnön mukaisessa verenkiertoon annettavassa aineessa on tärkeätä, että ulkokerroksen muodostava amfipaatti-

nen yhdiste, edullisesti glyserofosfolipidi, ei muodosta rautaoksidiytimen ympärille liposomirakkuloita tai liposomimaista kalvoa. Syynä tähän on se, että kolmiulotteinen kuori muodostetaan fosfolipidimolekyyleistä, joiden negatiiviset fosforyylipääosat osoittavat rautaoksidiydintä kohti ja hydrofobiset häntäosat työntyvät siitä ulospäin muodostaen siilimäisen esiasterakenteen. Siilimäinen rakenne toimii aina pohjana kolmiulotteisen kuoren tai kerroksen muodostamiselle, onpa amfipaattinen lähtöyhdiste sitten fosforihapon monoalkyyli- tai monoalkenyyliesteri tai misellaarinen glyserofosfolipidi. Kummassakin tapauksessa tuloksena olevilla hiukkasilla on lisääntynyt stabiilisuus poistoa vastaan ja erinomaiset varjoaineominaisuudet. Tulisi pitää mielessä, että liposomimaisiin kalvoihin osaa ottavat amfifiiliset molekyylit ovat järjestyneet päinvastaiseen järjestykseen, häntä häntään, hydrofiilisten päiden työntyessä ulospäin.

Käytettäessä siilimäisen pohjan aikaansaantiin rautaoksidihiukkasten ympärille glyserofosfolipidejä, jolloin voidaan muodostaa täydellinen kolmiulotteinen kuori, on tärkeätä joko (a) aktivoida rautaoksidihiukkaset glyserofosfolipidin ja ionittoman pinta-aktiivisen aineen ollessa läsnä samanaikaisesti tai (b) valmistaa rautaoksidihiukkasia ja glyserofosfolipidiä sisältävä suspensio, aktivoida suspensio, lisätä ionitonta pinta-aktiivista ainetta ja mahdollisesti toistaa sitten aktivointivaihe. Aktivointi toteutetaan dispergoimalla rautaoksidihiukkaset tasaisesti tai homogenoimalla dispersio, mikä kiihdyttää misellien muodostumista ja/tai aikaisemmin ehkä muodostuneiden liposomien tai lamellirakenteiden hajoamista. Aktivointi voidaan toteuttaa erilaisia menetelmiä käyttäen, joihin kuuluu sekoitus; edullisia ovat kuitenkin ultraäänikäsittely ja mikrofluidisaatio, edullisesti samalla lievästi lämmittäen (30 - 50 °C).

Hiukkaset stabiloivan kolmiulotteisen kuoren muodostus edellytetään toteutettavan siilimäisen pohjarakenteen kautta, joka muodostetaan rautaoksidin ja misellimuodossa olevan glyserofosfolipidin välille. Fosfolipideistä muodostetaan ensin misellejä ultraäänikäsittelyn tai mikrofluidisaation avulla pinta-aktiivisen aineen ollessa läsnä, ja sen jälkeen miselleissä olevan amfifiilin negatiiviset varaukset ovat vuorovaikutuksessa rautaoksidiytimen kanssa, kun taas pinta-aktiivinen aine vetää puoleensa niiden sähköisesti neutraaleja hydrofobisia päitä.

Kokeellinen todistusaineisto osoittaa, että pinta-aktiivisella aineella on kolmiulotteisen kuoren muodostusprosessin aikana monia tehtäviä. Se saa aikaan misellien muodostumisen amfifiilista, auttaa misellejä orientoitumaan ja järjestymään ytimen ympärille (helpottaen siilimäisen esiasteen muodostumista) ja kiinnittyy itse lopuksi amfifiilin hydrofobisiin segmentteihin, jolloin hiukkasen ympärille muodostuu kolmiulotteinen kuori.

Siilimäisen välirakenteen, kuten esimerkiksi sellaisen, joka on kuvattuna kuviossa 1 (a & b), muodostus on selvästikin erittäin tärkeätä, koska on todettu, että ioniton pinta-aktiivinen aine ei kykene yksinään antamaan magnetiittihiukkasille riittävää suojaa nopeaa RES-vastaanottoa vastaan. On todettu, että fosfolipidien käyttö yksinään tai ionittomien pinta-aktiivisten aineiden kanssa yhdistettyinä ei tuottanut hiukkasia, jotka ovat käytännössä käyttökelpoisia pitkäikäisinä verenkiertoon annettavina varjoaineina, ellei niitä valmistettu tämän keksinnön mukaisesti. Rautaoksidihiukkasten menestyksellinen stabilointi ennenaikaista poistoa verenkierrosta vastaan voidaan saavuttaa fosfolipidejä käyttämällä vain, jos tuhotaan se fosfolipidin liposomirakenne, joka tekniikan tasoa edustavissa formuloissa normaalisti esiintyy hiukkasten ympärillä. Tämän on havaittu pätevän jopa sellaisten magnetiittisuspensioiden tapauksessa, jotka fosfolipidien li-

säksi sisältävät polyoksietyleenisegmenttejä (POE) ja polyoksipropyleenisegmenttejä (POP) sisältäviä pinta-aktiivisia aineita. Pinta-aktiivinen aine, joka on lohkopolymeeri, toimii siten halutulla tavalla vain, jos se on stabiloitu sopivasti magnetiittiytimen ympärillä olevan kuoren uloimmassa kohdassa. Sen pelkkä mukanaolo suspensiossa ei riitä. Tämä pätee jopa, jos edellä mainittu suspensio sisältää fosfolipidillä stabiloitua magnetiittia, ts. jos magnetiittihiukkaset päällystetään ensin fosfolipidillä (joka sitten leviää laminaarisena kalvona Fe_3O_4:n pinnalle) ja pinta-aktiivinen aine lisätään jälkeenpäin ilman aktivointia. Edellä esitettyä johtopäätöstä tuki havainto, että ainoastaan misellaarisista fosfolipideistä muodostettu kolmiulotteinen, esimerkiksi siilimäinen, rakenne kykenee kaappaamaan ja kiinnittämään riittävästi pinta-aktiivista ainetta stabiilin, RES:ltä salassa pysyvän rautaoksidihiukkasen aikaansaamiseksi.

Pinta-aktiivisen aineen kiinnitys tapahtuu oletettavasti sen hydrofobisten polyoksipropyleenisegmenttien (POP) kautta, jotka ovat vuorovaikutuksessa glyserofosfolipidin tai fosforihapon monoesterin hydrofobisen osan kanssa. Kuten kuviossa 1 (a & b) on esitetty, van der Waalsin voimat kiinnittävät hydrofobisen osan polyoksipropyleenisegmentteihin (POP), kun taas hydrofiiliset polyoksietyleenisegmentit (POE) työntyvät ulospäin liuokseen estäen todennäköisesti siten opsonisaatiota ja magnetiittihiukkasten agglomeroitumista.

Fosforihapon alkyyli- tai alkenyyliestereiden tapauksessa siilimäisen rakenteen muodostuminen on pohjimmiltaan samanlaista kuin edellä ja ionittoman pinta-aktiivisen aineen hydrofobiset osat ovat lomittain tai kietoutuneina yhteen fosforihappoesterin alkyyli- tai alkenyyliketjujen kanssa ja sen hydrofiiliset osat työntyvät liuokseen.

Rautaoksidiytimen ja fosforyylipääryhmien välisen vuorovaikutuksen täsmällistä luonnetta ei tunneta tarkasti. On kuitenkin todettu, että hyvän vastustuskyvyn saavuttamiseksi keksinnön mukaisille "salassa pysyville" rautaoksidihiukkasille veressä on tärkeätä, että negatiiviset varaukset fosforyyliosan molemmissa happiatomeissa säilyvät käytettävissä vuorovaikutukseen ytimen kanssa. Niinpä kun käytettävissä on vain yksi negatiivinen happiasema, syntyvillä hiukkasilla ei ole samaa stabiilisuutta ja ne ovat helpommin poistettavissa verenkierrosta. Tämän vuorovaikutuksen tärkeyttä ja stabiilisuutta ei ole tähän saakka käsitetty alalla, ja se saattaa siis selittää, miksi aikaisemmat yritykset valmistaa pitkäikäisiä verenkiertoon annettavia magnetiittihiukkasia ovat epäonnistuneet.

On havaittu, että käytettäessä fosfolipidejä, joissa negatiiviset varaukset on neutraloitu, kuten esimerkiksi dipalmitoyylifosfatidyylikoliinin (DPPC) tai dimyristoyylifosfatidyylikoliinin (DMPC) tapauksessa, vastaavat hiukkasrakenteet, joita muodostuu, ovat heikosti suojattuja ja kyseisiä yhdisteitä käyttäen valmistetut varjoaineet saattavat soveltua maksan ja pernan kuvantamiseen, mutta eivät pitkäikäisiksi verenkiertoon annettaviksi aineiksi, koska sellaiset hiukkaset eivät ole suojattuja ennenaikaiselta poistumiselta verenkierrosta. Sama pätee fosfolipideihin, joiden fosforyylipääosissa on vain yksi negatiivinen varaus käytettävissä vuorovaikutukseen magnetiittiytimen kanssa. Esimerkiksi dipalmitoyylifosfatidyyliglyseroli, (DPPG), dimyristoyylifosfatidyyliglyseroli (DMPG) ja disetyylifosfaatti (DCP) ovat amfifiileja, jotka tuottavat hiukkasrakenteita, jotka ovat riittämättömästi suojattuja nopeaa poistoa verestä vastaan. Tällä tavalla valmistetut varjoaineet eivät sen vuoksi ole käyttökelpoisia verenkiertoon annettavina aineina, koska niillä on suhteellisen lyhyt viipymisaika verenkierrossa. Toisaalta käytettäessä fosfolipidejä, joiden negatiiviset varaukset fosforyyli-

osan molemmissa happiatomeissa ovat käytettävissä vuorovaikutukseen ytimen kanssa, tuloksena olevat rakenteet ovat erittäin stabiileja ja kyseisiä yhdisteitä käyttäen tuotetut rautaoksidihiukkaset ovat hyvin suojattuja verenkierrosta poistoa vastaan. Esimerkkejä sellaisista yhdisteistä ovat dipalmitoyylifosfatidihappo (DPPA) ja dimyristoyylifosfatidihappo (DMPA).

Hyvien salassapysymisominaisuuksienvarmistamiseksi hiukkaselle yhdisteen, joka rajoittuu välittömästi hiukkaseen, tulisi sen lisäksi, että negatiiviset varaukset fosforyylipään molemmissa happiatomeissa ovat käytettävissä, sisältää suhteellisen pitkä alkyyli- tai alkenyyliketju tai hydrofobinen sykloalkyyliryhmä sitoutuneena fosforiatomiin joko suoraan tai välissä olevan alkyleeni- tai happisillan kautta. Stabiilien, salassa pysyvien hiukkasten ja niistä keksinnön mukaisten varjoaineiden aikaansaamiseksi magnetiittiytimeen välittömästi rajoittuvan yhdisteen on siten oltava fosforihapon monoalkyyli- tai -alkenyyli- tai -sykloalkyyliesteri, monoalkyylifosfonaatti tai glyserofosfolipidi, joiden alkyyli- tai alkenyyliketjuilla on suhteellisen voimakas hydrofobinen luonne. Kokeet ovat osoittaneet, että vain riittävän pitkät alkyyli- tai alkenyyliketjut kykenevät sopivaan vuorovaikutukseen toisen amfipaattisen yhdisteen kanssa ja tarjoamaan kiinnityskohdan riittävälle määrälle ionitonta pinta-aktiivista ainetta tai lohkopolymeeria, jotta rautaytimen ympärille syntyy stabiili kolmiulotteinen rakenne. Erityisen toivottavia ovat alkyyli- tai alkenyyliketjut, jotka sisältävät vähintään 8 hiiliatomia, edullisesti vähintään 10 ja vielä edullisemmin vähintään 12 hiiliatomia. Lyhyet hydrofobiset alkyyli- tai alkyleeniketjut tai makrosykliset ligandit eivät tuota stabiileja hiukkasia, mikä viittaa siihen, että tulisi olla joko tiivis vuorovaikutus välikerroksen ja pinta-aktiivisen aineen välillä tai käytettävissä täytyy olla riittävä määrä kiinnittynyttä pinta-aktiivista

ainetta toivotun tuloksen saavuttamiseksi. Tämän yksityiskohdan jääminen käsittämättä voi olla toinen mahdollinen selitys siihen, miksi RES:lle näkymättömiä tai RES:ltä salassa pysyviä rautaoksidihiukkasia ei ole tätä ennen ollut saatavissa pitkäikäisenä, verenkiertoon annettavana aineena, joka on käytännössä käyttökelpoinen. Tämän keksinnön yhteydessä sopivista monofosfaattiestereistä voidaan mainita C_{8-18}-alkyyli- ja -alkenyylifosfaatit, kolesteryylifosfaatti, sykloheksyylidekyylifosfaatti, setyylifosfaatti, kumyylifosfaatti ja vastaavat.

Keksinnön mukaisesti voidaan siten saavuttaa erittäin tehokas hiukkasten suojaus poistumiselta verenkierrosta, mikäli hiukkaseen välittömästi rajoittuva primaarikerros sisältää amfipaattista yhdistettä, joka käsittää suhteellisen voimakkaasti ionisoituneen, negatiivisen, funktionaalisen ryhmän sekä suhteellisen pitkän ja tehokkaan, hydrofobisen, orgaanisen ketjun, ja sen kanssa lomittainen tai yhteen kietoutunut lisäkerros koostuu lohkopolymeerista, joka sisältää peräkkäin hydrofiilisia ja hydrofobisia segmenttejä, esimerkiksi Poloxamer^R-, Synperonic^R- tai Pluronic^R-tyyppiä olevasta pinta-aktiivisesta aineesta. Fosforihapon monoalkyyli- tai -alkenyyliesteriksi tai fosfonaatiksi rajattujen primaarikerroksen aineiden vaikutus oli täysin odottamaton ja mykistävä, erityisesti erään aikaisemman julkaisun valossa (ks. WO 91/09 629, sivu 17. ensimmäinen kappale), jossa mainitaan, että negatiivisesti varautuneiden fosfolipidien esiintyminen liposomien kalvossa lisää retikuloendoteelijärjestelmän toimesta tapahtuvaa mainittujen liposomien vastaanottoa.

On myös todettu, mitä keksinnön mukaisiin hiukkasiin tulee, että fosforihapon monoalkyyliesterin tai glyserofosfolipidin ja lohkopolymeerin määrien, suhteessa toisiinsa, tulisi olla oleellisia, so. edellisen massasuhteen jälkimmäiseen tulisi olla 1:100 - 10:1, edullisesti 1:30 - 1:5 ja vielä edullisemmin 1:10 - 1:1. Fosforihapon

monoalkyyliesterin ja rautaoksidiytimen massasuhteen tulisi myös olla 1:5 - 100:1, edullisesti 20:1 - 1:1. Eräät kokeelliset tiedot viittaavat myös siihen, että pinta-aktiivisen aineen suhde misellaariseen fosfolipidiin tai fosforihapon monoesteriin tulisi pitää tietyissä rajoissa, koska suuri määrä pinta-aktiivista ainetta saattaa dispergoida fosfolipidin tai monoesterin siinä määrin, että sen affiniteetti magnetiittihiukkasen suhteen pienenee ja siilimäisen rakenteen muodostuminen estyy. Vastaavasti hiukkaset, jotka on valmistettu käyttämällä liian vähän pinta-aktiivista ainetta, agglomeroituvat eivätkä ole riittävästi suojattuja opsonisaatiolta.

On osoitettu, että stabiileja, RES:lle näkymättömiä hiukkasia voidaan valmistaa kahden tai useamman yhdisteen seoksesta, joina voidaan käyttää ionisia ja neutraaleja fosfolipidejä, fosfolipidien monoalkyyli- tai -alkenyyliestereitä ja/tai muita ei-fosfolipidiyhdisteitä, menetelmällä, jossa rautaoksidihiukkaset suspendoidaan tai sekoitetaan yhdessä negatiivisesti varautuneen amfipaattisen yhdisteen tai negatiivisesti varautuneiden fosfolipidien ja muiden ei-fosfolipidiyhdisteiden seoksen sekä pinta-aktiivisen aineen kanssa fysiologisesti hyväksyttävään vesifaasiin. Muodostunut seos ultraäänikäsitellään tai mikrofluidisoidaan misellien muodostamiseksi amfipaattisesta yhdisteestä, siilimäisen rakenteen aikaansaamiseksi ja kolmiulotteisen kuoren muodostamiseksi siitä rautaoksidihiukkasten ympärille. Saatavat hiukkaset ovat hyvin suojattuja ennenaikaiselta poistumiselta verenkierrosta, ja niiden havaitaan olevan hyvin käyttökelpoisia erinomaisina verenkiertoon annettavina kuvantamisaineina. Esimerkkejä ei-fosfolipidiyhdisteistä, jotka voivat olla käyttökelpoisia keksinnön mukaisissa stabiileissa magnetiittihiukkasissa, ovat sellaiset yhdisteet kuin kolesteroli, ergosteroli, fytosteroli, sitosteroli, lanosteroli, tokoferoli jne.

Ultraäänikäsittelyn tai mikrofluidisaation jälkeen seos voidaan vielä steriloida ja/tai kylmäkuivata kuivan jauheen aikaansaamiseksi, joka kestää pitkään varastointia.

Menetelmän yhdessä muunnelmassa pinta-aktiivinen aine voidaan lisätä rautaoksidin ja amfipaattisen yhdisteen seokseen ultraäänikäsittelyn tai mikrofluidisaation jälkeen. Siinä tapauksessa ultraäänikäsittely-, mikrofluidisaatio- tai kuumennusvaihe mahdollisesti kuitenkin toistetaan kaikkien komponenttien ollessa koossa.

Keksinnön mukaiset suspensiot voidaan valmistaa myös hienojakoisista eli jauhemaisista formuloista, jotka sisältävät rautaoksidihiukkasia. Jauhemuodossa olevia formuloita valmistetaan tavallisesti lyofilisoimalla tai kuivaamalla vastavalmistetut rautaoksidihiukkasia sisältävät vesiliuokset. Ennen lyofilisointia tai kuivausta liuokset steriloidaan. Sterilointi voidaan toteuttaa mitä tahansa tunnettua menettelytapaa, so. kuumennusta, suodatusta, γ-säteitä jne., käyttäen. Vaihtoehtoisesti saattaa myös olla mahdollista steriloida saatavat suspensiot pitempään varastoituja kylmäkuivattuja jauheita käyttäen.

Keksinnön mukaisesti valmistettujen hiukkasten havaitaan olevan käyttökelpoisia verenkiertoon annettavina varjoaineina, jotka soveltuvat ihmis- tai eläinruumiin elinten NMR-kuvaukseen *in vivo*. Kuvantaminen toteutetaan antamalla potilaille, tavallisesti laskimonsisäisenä ruiskeena, vesisuspensiota, joka sisältää tämän keksinnön mukaisia magnetiittihiukkasia fysiologisesti hyväksyttävässä vesipitoisessa kantaja-aineessa, ja analysoimalla H_2O-protonispinin magneettisen relaksaation (T_1- & T_2-komonentin) muutos tutkittavien elinten läheisyydessä NMR-analysaattorin synnyttämässä magneettikentässä.

Seuraavat esimerkit valaisevat keksintöä tarkemmin:

Esimerkki 1

40 ml:aan vettä liuotettiin 81,1 mg (0,3 mmol) $FeCl_3 \cdot 6H_2O$:a ja 25,8 mg (0,13 mmol) $FeCl_2 \cdot 4H_2O$:a (Fe:n kokonaismäärä 0,43 mmol eli 24,1 mg). Liuokseen lisättiin 0,1 mCi ^{59}Fe:aa (merkkiainemäärä) $FeCl_3$:n muodossa. Seosta sekoitettiin ja lisättiin pisaroittain ammoniakin 7,5-%:ista vesiliuosta, kunnes pH saavutti stabiilin arvon 8,6. Muodostui mustien hiukkasten suspensio, jota kuumennettiin 5 min lämpötilassa 75 °C, ja hiukkasten annettiin saostua ja laskeutua huoneenlämpötilassa. Sakka pestiin kolmesti dekantoiden 100 ml:n erillä vettä. Pesun jälkeen hiukkaset suspendoitiin uudelleen 45 ml:aan vettä samalla sekoittaen. Raudan pitoisuus suspensiossa oli 0,533 mg/ml.

10 ml:aan viimeksi mainittua suspensiota (5,33 mg Fe:aa) lisättiin (aineosana a) 100 mg dipalmitoyylifosfatidihapon mononatriumsuolaa (DPPA-Na), ja tehtiin 20 min:n ultraäänikäsittely [Branson 250 Sonifier, 3,2 mm:n (1,8") mikropää, teho 20 (15 - 20 W)]. Ultraäänikäsittelyn aikana noin arvoon 68 °C nousseen lämpötilan annettiin laskea huoneenlämpötilaan, ja lisättiin (aineosana b) 100 mg Synperonic^R F-108:aa (ICI) tai Poloxamer^R-338:aa. Sen jälkeen tehtiin taas 15 min:n ultraäänikäsittely samoissa olosuhteissa täydellisen dispergoitumisen ja liposomirakkuloiden hajoamisen varmistamiseksi ja misellaarisen fosfolipidikerroksen aikaansaamiseksi rautaoksidihiukkasten ympärille.

Keksinnön mukaisesti aikaansaatu hiukkassuspensio (näyte 1A) sisälsi, millilitraa kohden, 0,5 mg rautaa, 10 mg DPPA:ta ja 10 mg Synperonic^R-pinta-aktiivisuusainetta (ainosan a massasuhde aineosaan b = 1:1). Mittaukset Coulter Nanosizer -laskurilla osoittivat, että keskimääräinen hiukkaskoko oli 120 nm ja polydispersiivisyys 3.

Muut näytteet valmistettiin samanlaisissa olosuhteissa, mutta korvaamalla osa DPPA:sta DPPC:llä; siten saatiin seuraavat näytteet (moolisuhde DPPC/DPPA): 1C

(9:1), 1D (7,5:2,5), 1E (5:5), 1F (2,5:7,5). Lopuksi valmistettiin vertailunäyte (1B), joka sisälsi ainoastaan DPPC:tä.

Taulukko 1

Näyte / Aika (min)	1A *0 : 10	1B *10 : 0	1C *9 : 1	1D * 7.5 : 2.5	1E *5 : 5	1F *2.5 : 7.5	$1V_1$	$1V_2$
10	80,5	12,3	52,7	72,5	76,1	79,9	1,2	1,5
30	72,7	1,4	22,2	63,8	72,4	72,8	0,8	0,7
60	59,3	1,0	10,3	53,4	63,5	66,1	0,8	0,7
90	54,0	-	5,7	48,7	58,3	57,3	-	-
120	41,4	-	4,0	41,3	52,2	48,0	-	-
AUC % min	7545	747	2386	6865	7889	7941	562	561

* DPPC:n ja DPPA:n moolisuhde

Lisää vertailunäytteitä valmistettiin erään aikaisemman dokumentin, EP-hakemusjulkaisun 0 272 091, mukaista tapaa käyttäen. Toistamalla mainitun dokumentin esimerkissä 1 käytetty menettely valmistettiin näyte $1V_1$. Magnetiittihiukkaset päällystettiin ensin yhden molekyylin paksuisella kerroksella palmitiinihappoa ja koteloitiin sitten lipidikalvon sisään, joka oli valmistettu distearoyylifosfatidyylikoliinin (DSPC) ja kolesterolin (CHOL) seoksesta (2:1). Näyte $1V_2$ oli tuloksena $1V_1$:n lisäsuojaamisesta Synperonic^R F-108 -kerroksella.

Erilaiset suspensionäytteet testattiin ruiskuttamalla 1 ml erä niitä Sprague-Dawley-laboratoriorottien häntälaskimoon ja ottamalla sen jälkeen verinäytteitä ilmoitetuin aikavälein; verinäytteistä analysoitiin sitten γ-laskennalla jäljellä oleva rauta ja tulokset rekisteröitiin prosenttiosuutena alunperin injektoidusta rauta-annoksesta (ID) ajan funktiona. Tietyn valmisteen säilyvyyt-

tä veressä karakterisoitiin määrittämällä käyrän alapuolelle jäävän alueen pinta-ala (AUC) %-osuutta ID:stä ajan funktiona kuvaavan käyrän tapauksessa aikojen 0 ja 120 min injektoinnista välillä. Tulokset on esitetty taulukossa 1.

Tulokset osoittavat puhdistumisen kaikista näytteistä, joista DPPA puuttuu (1B, $1V_1$, $1V_2$), nopeaksi. Sitä vastoin näytteet, jotka sisältävät DPPA:ta, poistuvat paljon hitaammin vaikutuksen vaihdellessa negatiivisesti varautuneen fosfolipidin määrän mukaan. Tämä vaikutus käy erityisen merkitykselliseksi käytännön käyttötarkoituksia ajatellen, kun DPPA:n mooli- tai massasuhde fosfolipidien kokonaismäärään on 1 - 4 tai suurempi. Taulukossa esitetyistä tuloksista voidaan havaita myös, että hiukkasten suojaamiseksi parhaiten verenkierrosta poistoa vastaan DPPA:n ja ytimen massasuhde on 5:1 tai sitä suurempi.

Jos mononatriumsuolansa muodossa oleva DPPA korvataan edellisissä kokeissa vapaalla hapolla tai muilla vesiliukoisilla suoloilla (joita saadaan muista metalleista), saavutetaan samankaltaisia tuloksia. Lisäksi, jos DPPA korvataan muilla fosfatidihapoilla, kuten analogisilla distearoyyli-, dimyristoyyli- ja dilauroyyliyhdisteillä ja korkeammilla homologeilla C_{20-26}-hapoilla), tulokset eivät ole merkittävästi erilaisia. Tulisi myös huomata, että aineosan b puuttuessa saavutetaan pelkällä aineosalla a kuitenkin jonkinasteinen magnetiittihiukkasten suojaus. Jälkimmäinen aineosa on kuitenkin riittämätön diagnostisiin tarkoituksiin käytettävien hiukkasten suojaamiseen. Minkä osoittavat alla olevassa taulukossa 1A esitetyt tulokset, jotka saatiin näytteillä $1D_2$, $1E_2$ ja $1F_2$, jotka ovat identtisiä näytteiden 1D, 1E ja 1F kanssa, tässä järjestyksessä, paitsi että Synperonic^R on jätetty pois. Taulukossa 1A esitetyt tulokset on ilmoitettu sinä prosenttiosuutena alkuperäisestä rauta-annoksesta, joka on jäljellä erilaisten ajanjaksojen jälkeen, jotka ilmaistaan minuutteina.

Taulukko 1A

Aika (min)	$1D_2$ (7.5:2.5)	$1E_2$ (5:5)	$1F_2$ (2.5:7.5)
10	23,3	26,9	24,4
30	10,3	8,9	7,2
60	6,6	4,3	3,0
90	4,9	2,8	1,8
120	3,8	2,0	1,4

AUC % min	1509	1369	1211

Taulukko 2

Näyte / Aika (min)	1G	1H	1J
0	100	100	100
5	15,6	16,5	15,1
10	3,1	3,4	-
15	0,8	1,5	8,3
30	0,4	0,8	3,6
45	-	-	2,9
60	-	-	-

AUC % min	355	371	543

Taulukossa 2 on esitetty tuloksia (kokeista, jotka tehtiin samalla tavalla kuin ne, joista on raportoitu taulukossa 1), jotka osoittavat, että korvattaessa DPPA (aineosa a) analogisella yhdisteellä, jossa on kuitenkin vain yksi ionifunktio fosfaattiryhmässä, so. dipalmitoyylifosfatidyyliglyserolilla (DPPG) (näyte 1G), aikaansaatava kerros ei tarjoa käytännöllisesti katsoen minkäänlaista

suojaa. Näin on jopa Synperonicia[R] lisättäessä (näyte 1H). Vertailuksi (näyte 1J) on taulukossa 2 esitetty myös tulokset, jotka saatiin näytteellä, joka koostui dekstraanilla päällystetystä magnetiitista (Advanced Magnetics, Inc:n tuote AMI-25, joka valmistetaan EP-hakemusjulkaisun 0 274 285 mukaisesti).

Esimerkki 2

Esimerkissä 1 kuvatuissa olosuhteissa tehtyjen kokeiden kuvaukset kuviossa 2 ja taulukossa 3 antavat lisätukea niitä ilmiöitä koskeville ensihavainnoille, joista on mainittu pohdittaessa tuloksia, joista on raportoitu esimerkissä 1. Tyypilliset ryhmiä b, c, d ja f edustavat näytteet valmistettiin EP-hakemusjulkaisun 0 272 091 ja vastaavasti EP-hakemusjulkaisun 0 274 285 ohjeiden mukaisesti, kun taas kaikki muut näytteet valmistettiin keksinnön mukaisella menetelmällä, jota on kuvattu esimerkissä 1. Tulokset osoittavat selvästi, että magnetiittihiukkaset, jotka valmistetaan ainoastaan yhtä ionitonta pinta-aktiivista ainetta käyttäen (ryhmä a), viipyvät verenkierrossa lyhyen ajan. DSPC-kolesteroliliposomirakkuloiden käyttö ionittiman pinta-aktiivisen aineen kera tai ilman sitä ei paranna verenkiertoon annettavien aineiden (ryhmä b) karakteristisia ominaisuuksia. Erilaisten fosfolipidien väitetään olevan stabiilien rautaoksidihiukkasten valmistukseen soveltuvia materiaaleja. Todellisuudessa kuitenkin, mikäli käytetään fosfolipidejä, joiden negatiiviset varaukset neutraloidaan, kuten esimerkiksi dipalmitoyylifosfatidyylikoliinin (DPPC) tai dimyristoyylifosfatidyylikoliinin (DMPC) tapauksessa (ryhmä c), vastaavat muodostuvat rakenteet ovat heikosti suojattuja ja niistä valmistettavat varjoaineet saattavat soveltua maksan ja pernan tai luuytimen kuvantamiseen, mutta eivät pitkäikäisiksi verenkiertoon annettaviksi aineiksi. Suunnilleen sama on havaittu fosfolipidien tapauksessa, joiden fosforyylipääosissa on ainoastaan yksi negatiivinen varaus käytettävis-

sä vuorovaikutukseen magnetiittiytimen kanssa. Esimerkiksi dipalmitoyylifosfatidyyliglyseroli, (DPPG), dimyristoyylifosfatidyyliglyseroli (DMPG) ja disetyylifosfaatti (DCP) ovat fosfolipidejä, jotka tuottavat rakenteita, jotka ovat riittämättömästi suojattuja nopeaa poistoa verestä vastaan (ryhmä d). On lisäksi osoitettu, että jopa käytettäessä fosfolipidejä, joiden negatiiviset varaukset fosforyyliosan molemmissa happiatomeissa ovat käytettävissä vuorovaikutukseen ytimen kanssa, ilman ionittoman pinta-aktiivisen aineen mukanaoloa tuloksena olevat rakenteet eivät sovellu keksinnön mukaisiin, pitkäikäisiin, verenkiertoon annettaviin aineisiin. Tämä on osoitus siitä, että jos rautaoksidihiukkaset eivät ole misellimuodossa, ne eivät edes dipalmitoyylifosfatidihappoa (DPPA) tai dimyristoyylifosfatidihappoa (DMPA) käytettäessä ole hyvin suojattuja verenkierrosta poistoa vastaan (ryhmä e).

Taulukko 3

Ryhmä	FORMULAT	AUC (% min)
a)	MAG/ F 108	924
	MAG/ BRIJ 56	763
b)	MAG / LIPOSOMIT / F 108	1039
	LIPOSOMIT / MAG (V)	610
	LIPOSOMIT / MAG (V)/F 108	596
c)	MAG/ DAPC	1053
	MAG/ DAPC/F 108	875
	MAG/ DPPC	725
	MAG/ DPPC/F108	860
	MAG/ DMPC	774
	MAG/ DMPC/F108	1011
d)	MAG/ DPPG	728
	MAG/ DPPG/F 108	791
	MAG/ DMPG	600
	MAG/ DMPG/F 108	798
e)	MAG/ DPPA	1428
	MAG/ DMPA	1736
f)	AMI 25 (S)-DEKSTRAANI	2866
g)	MAG/ DMPA/F 108	9984
	MAG/ DPPA/F 108	7813
	MAG/ DPPA. 2 Na /F 108	7767
	MAG/ DPPA/F 108 + STERILOINTI	7855
	MAG/ DPPA/F 108 + KYLMÄKUIVAUS	7804
	MAG/ DSPA/F 108	7557
	MAG/ SPA -3 /F 108	7639
	MAG/ SETYYLIFOSFAATTI /F108	6657
	MAG/ (DPPC/DPPA):$(7.5/2.5)_2$ /F 108	6865
	MAG/ (DPPC/DPPA):$(5.0/5.0)_3$ /F 108	7889
	MAG/ (DPPC/DPPA):$(2.5/7.5)_4$ /F 108	7941
	MAG/ (DPPA/CHOL):(1/1) /F 108	8352
	MAG/ DPPA/BRIJ 56	6051
	MAG/ DPPA/TWEEN 80	4035
	MAG/ DPPA/BRIJ 58	3278

Selitykset

Pinta-aktiiviset aineet

Pluronic, Poloxamer 338, Synperonic F 108 = lohkopolymeereja, joissa kopolymeeriketju on: $(oksietyleeni)_n$-$(oksipropyleeni)_m$-$(oksietyleeni)_n$

Fosfatidihapot

DLPA = 1,2-dilauroyyliglysero-3-fosfatidihappo (tyydytetyt C_{12}-rasvahappo)

DMPA = 1,2-dimyristoyyliglysero-3-fosfatidihappo (tyydytetyt C_{14}-rasvahappo)

DPPA = 1,2-dipalmitoyyliglysero-3-fosfatidihappo (tyydytetyt C_{16}-rasvahappo)

DSPA = 1,2-distearoyyliglysero-3-fosfatidihappo (tyydytetyt C_{18}-rasvahappo)

SPA-3 = 1,2-dialkanoyyliglysero-3-fosfatidihappo (saadaan soijaperäisestä hydratusta C_{16}- ja C_{18}-rasvahappojen seoksesta)

Fosfokoliinit (lesitiinit)

DMPC = 1,2-dimyristoyyliglysero-3-fosfokoliini

DPPC = 1,2-dipalmitoyyliglysero-3-fosfokoliini

DSPC = 1,2-distearoyyliglysero-3-fosfokoliini

DAPC = 1,2-diarakidoyyliglysero-3-fosfokoliini

P 90H = 1,2-dialkanoyyliglysero-3-fosfokoliini, hydrattu soijalesitiini (C_{16}- ja C_{18}-rasvahappojen seos = sama kuin DPPC)

Fosfoglyserolit

DMPG = 1,2-dimyristoyyliglysero-3-fosfoglyseroli

DPPG = 1,2-dipalmitoyyliglysero-3-fosfoglyseroli

Muut

CHOL = kolesteroli

Setyylifosfaatti = setyylialkoholin (C_{16}) fosforihappomonoesteri

Tween = polysorbaatti = polyoksietyleenisorbitaanirasvahappoesteri

BRIJ = polyetyleeniglykoliheksadekyylieetteri

MAG(V) = liposomeja sisältävä magnetiitti, joka on valmistettu EP-hakemusjulkaisun 0 272 091 mukaisesti

AMI 25 = dekstraanilla päällystetty magnetiitti, joka on valmistettu EP-hakemusjulkaisun 0 275 285 mukaisesti

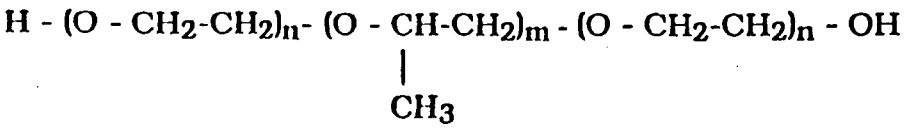
$DPPC/DPPA_2$ = DPPC:n massasuhde DPPA:han 7,5:2,5

$DPPC/DPPA_3$ = DPPC:n massasuhde DPPA:han 5,0:5,0

$DPPC/DPPA_4$ = DPPC:n massasuhde DPPA:han 2,5:7,5

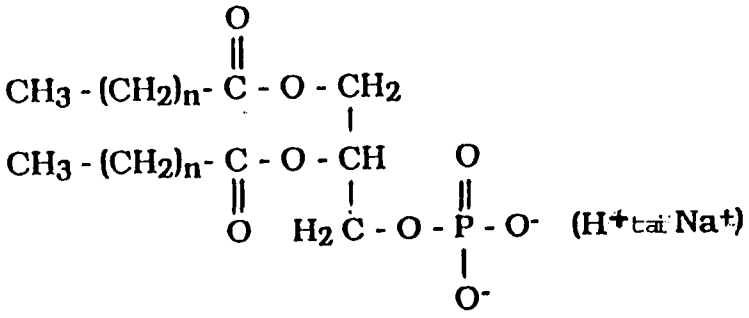
Pinta-aktiiviset aineet

F 108



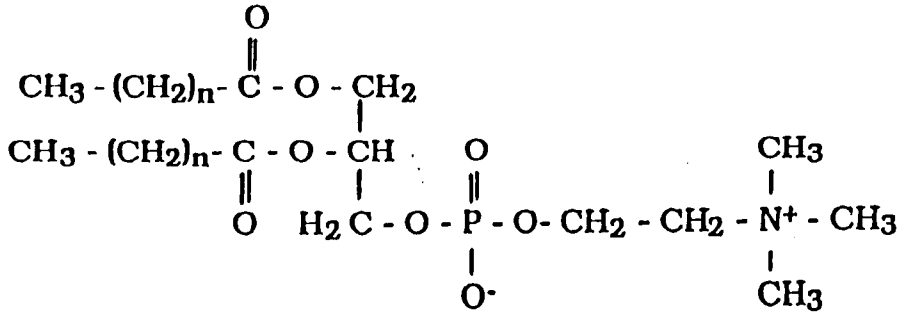
M = 14 000

Fosfatidihapot



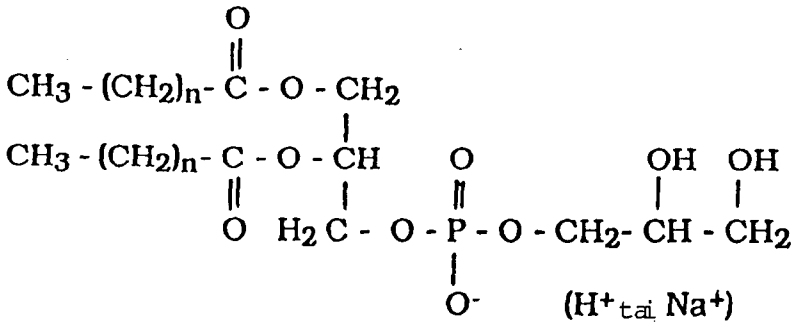
DLPA : n = 10 **DMPA**: n = 12 **DPPA**: n = 14 **DSPA**: n = 16

Fosfokoliinit



DMPC: n = 12 **DPPC**: n = 14 **DSPC**: n = 16 **DAPC**: n = 18

Fosfoglyserolit



DMPG: n = 12 **DPPG:** n = 14

Oli kuitenkin yllättävää todeta, että dekstraania käytettäessä saavutetaan parempi magnetiitin suojaus kuin käytettäessä tekniikan tasoa edustavia fosfolipidiformuloita (ryhmä f). Näin oli jopa silloin, kun nämä tyypilliset liposomiformulat sisälsivät ionittomia pinta-aktiivisia aineita. Dekstraanilla päällystettyjä magnetiittihiukkasia käytetään normaalisti varjoaineina, jotka on tarkoitettu nimenomaan maksan ja pernan kuvantamiseen ja poistettaviksi suhteellisen nopeasti verenkierrosta.

Käytettäessä fosfolipidejä, joiden negatiiviset varaukset fosforyyliosan molemmissa happiatomeissa ovat käytettävissä vuorovaikutukseen ytimen kanssa, tuloksena olevat magnetiittihiukkaset ovat erittäin stabiileja verenkierrossa edellyttäen, että fosfolipidit ovat misellimuodossa. Rautaoksidihiukkaset, jotka valmistetaan esimerkiksi misellaarista dipalmitoyylifosfatidihappoa (DPPA) ja Synperonic® F108:aa käyttäen keksinnön mukaisella menetelmällä, tuottavat siten tulokseksi hiukkasia, jotka ovat hyvin suojattuja verenkierrosta poistoa vastaan. Sama pätee silloin, kun DPPA korvataan DMPA:lla, DSPA:lla tai setyylifosfaatilla tai lesitiinien ja fosfatidihappojen seoksilla (ryhmä g). Tuloksia analysoitaessa on käynyt ilmi, että aineen stabiilisuutta verenkierrossa voidaan järkeistää käyttämällä mallia, jossa alkuvaiheessa riittävän pitkän hydrofobisen ketjun sisältävän fosfolipidin

fosforyylipääosat ovat vuorovaikutuksessa magnetiittiytimen kanssa muodostaen siilimäisen rakenteen, joka sitten tarjoaa kiinnityskerroksen ionitonta pinta-aktiivista ainetta varten ja muodostaa siten ytimen ympärille kolmiulotteisen kerroksen. Erilaiset kokeet ovat myös osoittaneet, että eri lähteistä peräisin olevien ionittomien pinta-aktiivisten aineiden käytöllä on vain minimaalinen vaikutus lopputulokseen.

Esitettyä mallia tukee lisäksi havainto, että fosfolipidin suhde ionittomaan pinta-aktiiviseen aineeseen tulisi, vaikka se ei olekaan kovin ratkaiseva, pitää arvojen 0,01 ja 10 välillä, edullisesti arvojen 0,1 ja 1 välillä. Kuten taulukosta 4 ilmenee, kokeet ovat osoittaneet, että rautaoksidin pitoisuuden pysyessä muuttumattomana magnetiittihiukkaset, jotka on valmistettu käyttämällä liian suuria määriä ionitonta pinta-aktiivista ainetta (suhteessa DPPA:n määrään), eivät ole riittävästi suojattuja nopealta poistumiselta verenkierrosta.

Taulukko 4

Fe_3O_4 (mg/ml)	DPPA (mg/ml)	Synperonic F108 (mg/ml)	AUC (% min)
0,5	0,1	1,0	>8000
0,5	0,3	3,0	7000
0,5	0,3	10,0	>8000
0,5	3,5	3,5	6500
0,5	5,0	5,0	7500
0,5	10,0	10,0	8000
0,5	0,1	10,0	≈4000
0,5	1,0	10,0	6500

Toisaalta kokeet ovat osoittaneet myös, että hiukkaset, jotka on valmistettu samoissa olosuhteissa, mutta käyttämällä paljon pienempää määrää pinta-aktiivista ainetta, olivat yhtä heikosti suojattuja ennenaikaista pois-

toa vastaan. Näiden tulosten taustalla olevat perussyyt viittaavat siihen, että liian suuri määrä pinta-aktiivista ainetta saattaa dispergoida fosfolipidin tai monoesterin siinä määrin, että sen affiniteetti magnetiittihiukkasen suhteen häviää ja sen myötä sopivat olosuhteet siilimäisen rakenteen muodostumiselle häviävät. Vastaavasti hiukkaset, jotka on valmistettu käyttämällä liian vähän pinta-aktiivista ainetta, agglomeroituvat eivätkä ole suojattuja nopealta poistumiselta verestä.

Patenttivaatimukset:

1. Ihmis- tai eläinpotilaiden NMR-kuvauksessa käytettäväksi soveltuva hiukkanen, joka käsittää rautaoksidiytimen ja kerroksen, joka koostuu ainakin yhdestä amfipaattisesta, negatiivisesti varautunutta fosforia sisältävästä yhdisteestä, joka sisältää pääosan sitoutuneena hydrofobiseen häntäosaan, ja yhdestä tai useammasta pinta-aktiivisesta aineesta, t u n n e t t u siitä, että amfipaattinen yhdiste on misellimuodossa ja kerroksella on kolmiulotteisen kuoren muoto, joka kuori sisältää ainakin yhtä pinta-aktiivista ainetta, joka aiheuttaa amfipaattisen yhdisteen olemisen mainitussa misellimuodossa.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen hiukkanen, jossa amfipaattisen yhdisteen molekyylit ovat järjestyneet siten suhteessa rautaoksidiytimeen, että amfipaattisen yhdisteen fosforia sisältävä pääosa osoittaa rautaoksidiydintä kohti, kun taas hydrofobinen häntäosa ulkonee siitä muodostaen siilimäisen rakenteen.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen hiukkanen, jossa pääosa on fosforyylipää, jossa molempien happiatomien negatiiviset varaukset ovat käytettävissä vuorovaikutukseen ytimen kanssa.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen hiukkanen, jossa amfipaattinen yhdiste on fosforihapon alkyyli-, alkenyyli- tai sykloalkyylimonoesteri tai fosfolipidi.

5. Patenttivaatimuksen 3 mukainen hiukkanen, jossa alkyyli- tai alkenyyliryhmä sisältää vähintään 8 hiiliatomia, edullisesti vähintään 10 hiiliatomia ja vielä edullisemmin vähintään 12 hiiliatomia.

6. Patenttivaatimuksen 4 mukainen hiukkanen, jossa misellimuodossa oleva fosfolipidi koostuu substituoidun tai osittain substituoidun polyalkoholin monofosfaattiesteristä ainakin yhden mainitun polyalkoholin muista funktionaalisista alkoholiryhmistä ollessa esteröity pitkäket-

juisella, tyydyttyneellä tai tyydyttymättömällä, alifaattisella rasvahapolla tai eetteröity pitkäketjuisella, tyydyttyneellä tai tyydyttymättömällä alkoholilla ja fosforihapon kahden muun funktionaalisen happoryhmän ollessa joko vapaita tai muunnettu suoloiksi alkali- tai maa-alkalimetalleilla.

7. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukainen hiukkanen, jossa amfipaattinen yhdiste on rasvahappoglyseridin monofosfaatti, joka voi olla dimyristoyylifosfatidihappo, dipalmitoyylifosfatidihappo tai distearyylifosfatidihappo.

8. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukainen hiukkanen, jossa pinta-aktiivinen aine on fysiologisesti hyväksyttävä ioniton pinta-aktiivinen aine, jotka sijaitsee lomittain amfifaattisen yhdisteen kanssa.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen hiukkanen, jossa ionittomana pinta-aktiivisena aineena on ainakin yksi lohkopolymeeri, joka sisältää polyoksietyleeni- ja polyoksipropyleenisegmenttejä, tai polyetyleeniglykolialkyylieetterin.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen hiukkanen, jossa pinta-aktiivinen aine on Pluronic^{R}, Poloxamer^{R}, Poloxamine^{R}, Synperonic^{R} tai BRIJ^{R}.

11. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukainen hiukkanen, jossa amfipaattinen yhdiste on kahden tai useamman yhdisteen seos, joina tulevat kysymykseen ioniset ja neutraalit fosfolipidit, fosforihapon monoalkyyli- ja -alkenyyliesterit ja/tai kolesteroli, ergosteroli, fytosteroli, sitosteroli, lanosteroli ja tokoferoli.

12. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukainen hiukkanen, jossa fosfolipidin massasuhde pinta-aktiiviseen aineeseen on 1:10 - 10:1.

13. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukainen hiukkanen, jossa ulkokerroksen amfipaattisen yhdisteen ja pinta-aktiivisen aineen massasuhde ytimeen on pienempi kuin 1:1.

14. Patenttivaatimusten 1 - 13 mukaisten rautaoksidihiukkasten käyttö ihmis- tai eläinruumiin elinten NMR-kuvaukseen.

15. Jauhemainen formula, joka sisältää jonkin patenttimuksista 1 - 13 mukaisia rautaoksidihiukkasia, jotka fysiologisesti hyväksyttävään nestemäiseen kantaja-aineeseen dispergoitaessa muodostavat suspension, joka on käyttökelpoinen varjoaineena NMR-kuvauksessa.

16. Injektoitavissa oleva vesisuspensio, joka sisältää patenttivaatimusten 1 - 13 mukaisia rautaoksidihiukkasia suspendoituina fysiologisesti hyväksyttävään nestemäiseen kantaja-aineeseen ja on käyttökelpoinen varjoaineena ihmis- tai eläinruumiin NMR-kuvauksessa.

17. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisten hiukkasten valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että

a) valitaan rautaoksidihiukkaset ja suspendoidaan ne yhdessä amfipaattisen yhdisteen tai pinta-aktiivisen aineen kanssa vesifaasiin seoksen muodostamiseksi ja

b) seos aktivoidaan ultraäänikäsittelyllä, mikrofluidisaatiolla tai kuumentamalla kolmiulotteisen kuorimaisen kerroksen muodostamiseksi rautaoksidihiukkasten ympärille.

18. Patenttivaatimuksen 17 mukainen menetelmä, jossa seos ultraäänikäsittelyn, mikrofluidisaation tai kuumennuksen jälkeen steriloidaan ja/tai kylmäkuivataan.

19. Patenttivaatimuksen 17 tai 18 mukainen menetelmä, jossa pinta-aktiivinen aine lisätään rautaoksidin ja amfipaattisen yhdisteen seokseen mainitun aktivoinnin ja mahdollisesti ultraäänikäsittelyn, mikrofluidisaation tai kuumennuksen toistamisen jälkeen.

20. Patenttivaatimuksen 17 tai 18 mukainen menetelmä, jossa pinta-aktiivinen aine on fysiologisesti hyväksyttävä ioniton pinta-aktiivinen aine, joka koostuu ainakin yhdestä lohkopolymeerista, joka sisältää polyoksiety-

leeni- ja polyoksipropyleenisegmenttejä, tai polyetyleeniglykoliheksadekyylieetteristä.

21. Patenttivaatimuksen 17 tai 18 mukainen menetelmä, jossa amfipaattinen yhdiste on fosfolipidi, joka on muunnettu misellimuotoon pinta-aktiivisen aineen avulla.

22. Patenttivaatimuksen 21 mukainen menetelmä, jossa misellimuodossa oleva fosfolipidi koostuu orgaanisesta substituoidun tai osittain substituoidun polyalkoholin monofosfaattiesteristä ainakin yhden mainitun polyalkoholin muista funktionaalisista alkoholiryhmistä ollessa esteröity pitkäketjuisella, tyydyttyneellä tai tyydyttymättömällä, alifaattisella rasvahapolla tai eetteröity pitkäketjuisella, tyydyttyneellä tai tyydyttymättömällä alkoholilla ja fosforihapon kahden muun funktionaalisen happoryhmän ollessa joko vapaita tai muunnettu suoloiksi alkali- tai maa-alkalimetalleilla.

23. Patenttivaatimuksen 22 mukainen menetelmä, jossa fosfolipidi on rasvahappoglyseridin monofosfaatti, joka voi olla dimyristoyylifosfatidihappo, dipalmitoyylifosfatidihappo tai distearyylifosfatidihappo.

Patentkrav:

1. Partikel för användning i NMR-avbildning av människo- eller djurpatienter och omfattande en järnoxidkärna och ett skikt av åtminstone en amfipatisk förening med en negativt laddad fosforhaltig huvuddel, vilken bundits vid en hydrofobisk änddel och ett eller flera ytaktiva medel, k ä n n e t e c k n a d därav, att den amfipatiska föreningen är i micellform och att skiktet har formen av ett tredimensionellt skal som omfattar åtminstone ett ytaktivt medel, vilket förorsakar att den amfipatiska föreningen föreligger i nämnda micellform.

2. Partikel enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att den amfipatiska föreningens molekyler är ordnade i förhållande till järnoxidkärnan så, att den fosforhaltiga huvuddelen av den amfipatiska föreningen pekar mot järnoxidkärnan medan igen den hydrofobiska änddelen står ut från densamma under bildande av en igelkottsliknande struktur.

3. Partikel enligt patentkrav 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a d därav, att huvuddelen är ett fosforylhuvud, i vilket de negativa laddningarna i bägge syreatomerna är tillgängliga för växelverkan med kärnan.

4. Partikel enligt patentkrav 3, k ä n n e t e c k n a d därav, att den amfipatiska föreningen är en alkyl-, alkenyl- eller cykloalkylmonoester av fosforsyra eller en fosfolipid.

5. Partikel enligt patentkrav 3, k ä n n e t e c k n a d därav, att alkyl- eller alkenylgruppen omfattar åtminstone 8 kolatomer, företrädesvis åtminstone 10 kolatomer och allra helst åtminstone 12 kolatomer.

6. Partikel enligt patentkrav 4, k ä n n e t e c k n a d därav, att fosfolipiden i micellform består av en monofosfatester av en substituerad eller partiellt substituerad polyalkohol, varvid åtminstone en annan al-

koholfunktion i nämnda polyalkohol förestrats genom en långkedjad, mättad eller omättad, alifatisk fettsyra eller företrats genom en långkedjad, mättad eller omättad alkohol och de två andra syrafunktionerna hos fosforsyran är antingen fria eller salifierade med alkali- eller jordalkalimetaller.

7. Partikel enligt patentkrav 1, 2 eller 3, k ä n n e t e c k n a d därav, att den amfipatiska föreningen är ett monofosfat av en fettsyraglycerid som valts bland dimyristoylfosfatidsyra, dipalmitoylfosfatidsyra och distearoylfosfatidsyra.

8. Partikel enligt patentkrav 1, 2 eller 3, k ä n n e t e c k n a d därav, att det ytaktiva medlet är ett fysiologiskt godtagbart, joniskt inaktivt, ytaktivt medel, vilket insnärjts med den amfipatiska föreningen.

9. Partikel enligt patentkrav 8, k ä n n e t e c k n a d därav, att den joniskt inaktiva, ytaktiva föreningen omfattar åtminstone en block-sampolymer med polyoxietylen- och polyoxipropylensegment eller en polyetylenglykolalkyleter.

10. Partikel enligt patentkrav 9, k ä n n e t e c k n a d därav, att det ytaktiva medlet är Pluronic^{R}, Poloxamer^{R}, Poloxamine^{R}, Synperonic^{R} eller BRIJ^{R}.

11. Partikel enligt patentkrav 1, 2 eller 3, k ä n n e t e c k n a d därav, att den amfipatiska föreningen är en blandning av två eller flera föreningar som valts bland joniska och neutrala fosfolipider, monoalkyl- eller alkenylestrar av fosforsyra och/eller kolesterol, ergosterol, fytosterol, sitosterol, lanosterol och tokoferol.

12. Partikel enligt patentkrav 1, 2 eller 3, k ä n n e t e c k n a d därav, att viktförhållandet fosfolipid till ytaktivt medel är 1:10 - 10:1.

13. Partikel enligt patentkrav 1, 2 eller 3, k ä n n e t e c k n a d därav, att viktförhållandet amfipatisk

förening och det ytaktiva medlet i det yttre skiktet till kärnan är mindre än 1:1.

14. Användning av järnpartiklarna enligt patentkraven 1 - 13 för NMR-avbildning av organ i människo- eller djurkroppen.

15. Pulverulent sammansättning som omfattar järnoxidpartiklar enligt något av patentkraven 1 - 13 och vilken vid dispersion i en fysiologiskt godtagbar, flytande bärare kommer att bilda en suspension, vilken är användbar som ett kontrastmedel vid NMR-avbildning.

16. Injicerbar, vattenhaltig suspension som omfattar järnoxidpartiklar enligt patentkraven 1 - 13, vilka partiklar suspenderats i en fysiologiskt godtagbar, flytande bärare och användbar som ett kontrastmedel vid NMR-avbildning av människo- eller djurkroppen.

17. Förfarande för framställning av partiklarna enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att det omfattar steg, vid vilka man

a) väljer och suspenderar järnoxidpartiklar tillsammans med en amfipatisk förening och ett ytaktivt medel i en vattenfas för bildande av en blandning, och

b) matar energi till blandningen genom matande av ljudvågor, mikrofluidisering eller uppvärmning för åstadkommande av ett tredimensionellt, skalliknande skikt kring järnoxidpartiklarna.

18. Förfarande enligt patentkrav 17, k ä n n e t e c k n a t därav, att efter matningen av ljudvågor, mikrofluidiseringen eller uppvärmningen steriliseras och/eller lyofiliseras blandningen.

19. Förfarande enligt patentkrav 17 eller 18, k ä n n e t e c k n a t därav, att det ytaktiva medlet tillsätts i blandningen av järnoxid och den amfipatiska föreningen efter energimatningen och eventuellt därefter upprepas ljudvågsmatningen, mikrofluidiseringen eller uppvärmingen.

20. Förfarande enligt patentkrav 17 eller 18, k ä n n e t e c k n a t därav, att det ytaktiva medlet är ett fysiologiskt godtagbart, joniskt inaktivt, ytaktivt medel i form av åtminstone en blocksampolymer med polyoxietylen- och polyoxipropylensegment eller en polyetylenglykolalkyleter.

21. Förfarande enligt patentkrav 17 eller 18, k ä n n e t e c k n a t därav, att den amfipatiska föreningen är en fosfolipid som omvandlats till micellform av det ytaktiva medlet.

22. Förfarande enligt patentkrav 21, k ä n n e t e c k n a t därav, att fosfolipiden i micellform består av en organisk monofosfatester av en substituerad eller partiellt substituerad polyalkohol, varvid åtminstone en annan alkoholfunktion av nämnda polyalkohol förestrats med en långkedjad, mättad eller omättad, alifatisk fettsyra, eller företrats med en långkedjad, mättad eller omättad alkohol, och de två andra syrafunktionerna i fosforsyran är antingen fria eller salifierade med alkali- eller jordalkalimetaller.

23. Förfarande enligt patentkrav 22, k ä n n e t e c k n a t därav, att fosfolipiden är ett monofosfat av en fettsyraglycerid, vilken valts bland dimyristoylfosfatidsyra, dipalmitoylfosfatidsyra och distearoylfosfatidsyra.

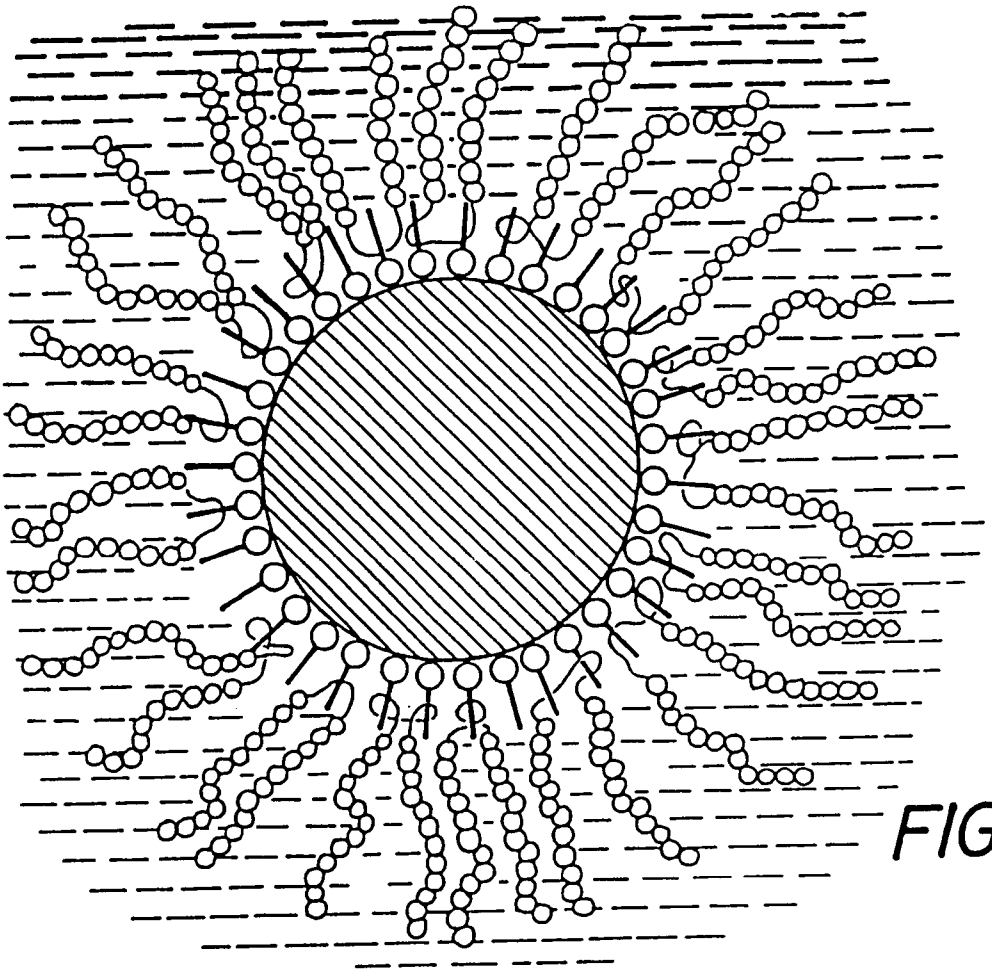


FIG. 1a

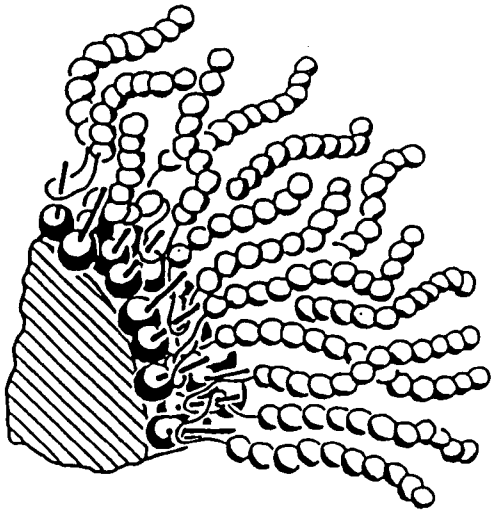


FIG. 1b

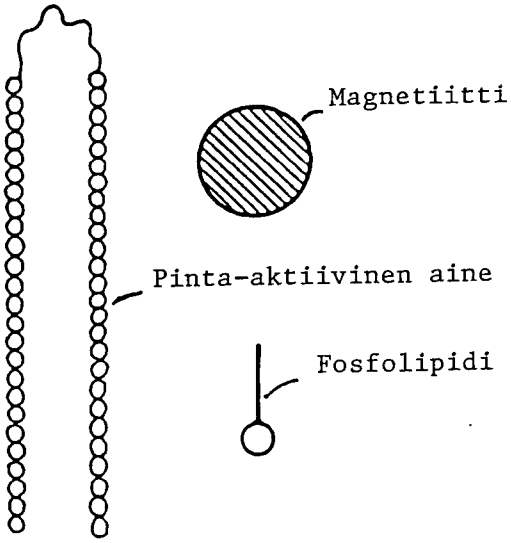


FIG. 1

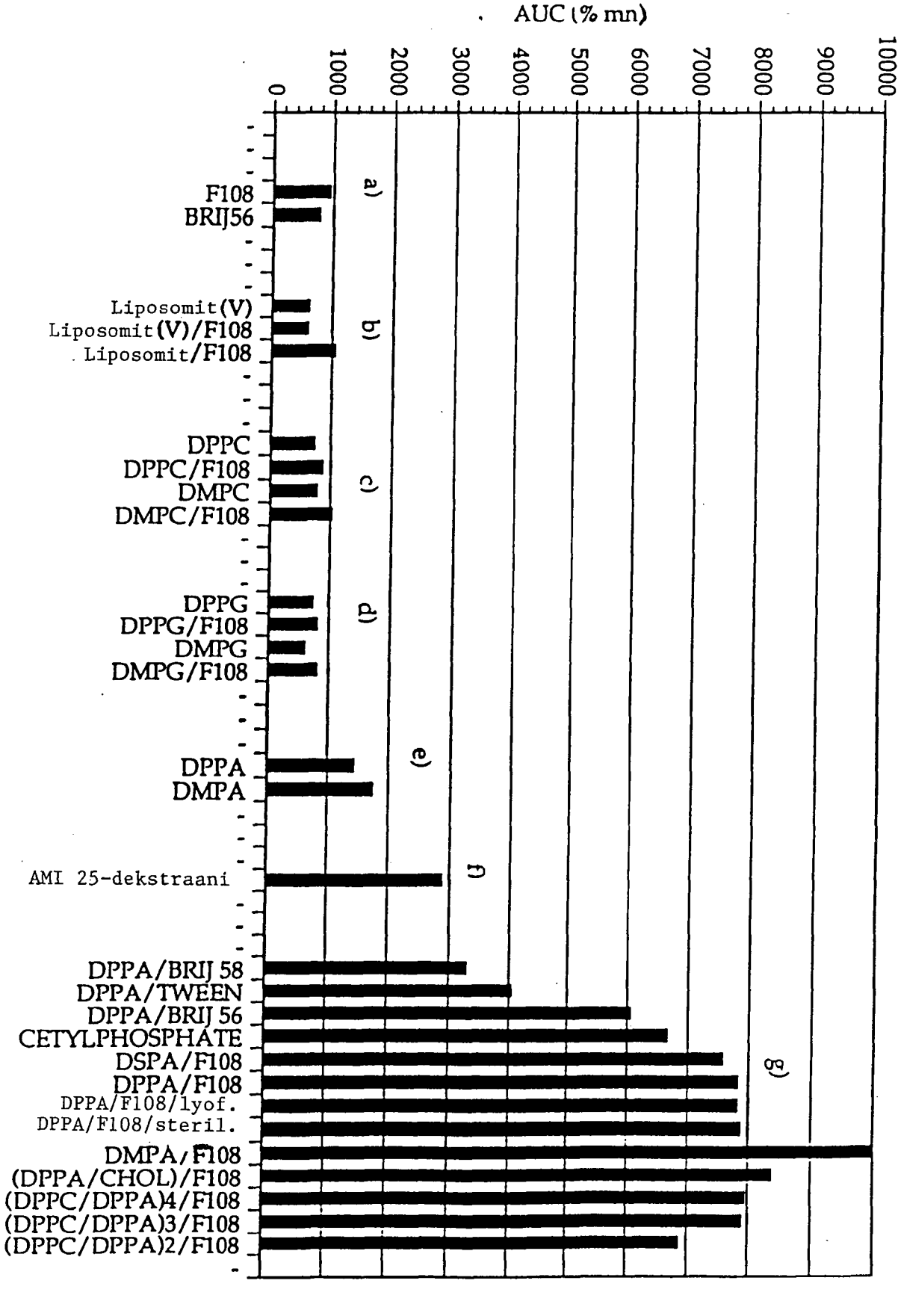

AUC (% mn)
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
9000
10000
F108
BRIJ56
Liposomit(V)
Liposomit(V)/F108
Liposomit/F108
DPPC
DPPC/F108
DMPC
DMPC/F108
DPPG
DPPG/F108
DMPG
DMPG/F108
DPPA
DMPA
AMI 25-dekstraani
DPPA/BRIJ 58
DPPA/TWEEN
DPPA/BRIJ 56
CETYLPHOSPHATE
DSPA/F108
DPPA/F108
DPPA/F108/lyof.
DPPA/F108/steril.
DMPA/F108
(DPPA/CHOL)/F108
(DPPC/DPPA)4/F108
(DPPC/DPPA)3/F108
(DPPC/DPPA)2/F108
a)
b)
c)
d)
e)
f)
g)

FIG. 2