NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO (11) **313491** (13) B1

(51) Int Cl[7] A 61 K 49/00, B 01 J 13/04

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19962994	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1995.11.15. PCT/GB95/02673
(22) Inng. dag	1996.07.18	(85) Videreføringsdag	1996.07.18
(24) Løpedag	1995.11.15	(30) Prioritet	1994.11.19. GB. 9423419
(41) Alm. tilgj.	1996.07.18		
(45) Meddelt dato	2002.10.14		

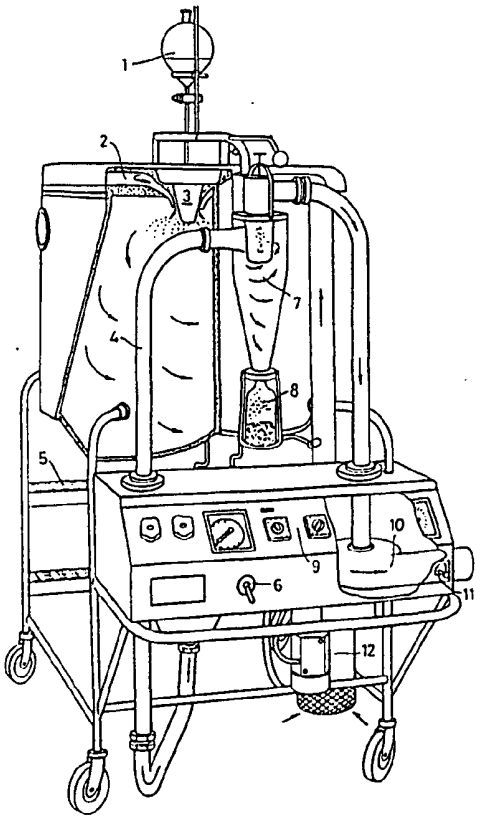
(71) Patenthaver Andaris Ltd, 3-5 College Street, Nottingham NG1 5AQ, England, GB
(72) Oppfinner Nicholas Osborne, Colwick, Nottingham, England, GB
Andrew Derek Sutton, Ruddington, Nottinghamshire, England, GB
Richard Alan Johnson, West Bridgford, Nottingham, England, GB
(74) Fullmektig Curo AS, 7231 Lundamo

(54) Benevnelse **Framgangsmåte for framstilling av hule mikrosfærer**

(56) Anførte publikasjoner EP 512693

(57) Sammendrag

Framgangsmåte for framstilling av mikrokapsler ved å (i) framskaffe en løsning av et protein i et vandig løsningsmiddel og (ii) spraye løsningen i en gass slik at det vandige løsningsmidlet fordamper, for derved å framstille hule mikrosfærer. Den vandige løsningen inneholder en væske med større flyktighet enn vann. Proteinet er fortrinnsvis albumin og den flyktige væsken er fortrinnsvis etanol. Mikrokapslene kan anvendes som ultralydkontrastmiddel.



Oppfinnelsen angår framstilling av hule proteinholdige mikrokapsler, i samsvar med den innledende del av patentkrav 1. Én anvendelse for disse mikrokapslene er å fremme ultralydavbildning.

Bakgrunn

Det faktum at luftbobler i kroppen kan anvendes til ekkokardiografi har vært kjent i en viss tid.

WO patentpublikasjon 92/18164 beskriver spraytørking av en løsning av et vegg-dannende materiale, fortrinnsvis et protein slik som albumin, til framstilling av mikro-kapsler. I WO patentpublikasjon 94/08627 blir trykket med hvilket løsningen sprayes inn i det oppvarmete kammeret redusert for å danne større mikrokapsler, eller halveringstiden for mikrokapslene i blodstrømmen økes, for eksempel ved å inkludere et tensid i løsningen som sprayes, eller mikrokapslene målrettes til en spesiell del av kroppen, f.eks. ved å suspendere dem i en løsning av en elektrisk ladet forbindelse.

US patentskrift 4.420.442 beskriver tilsats av organiske løsningsmidler til dispersjoner av flim-dannende faststoff, før suspensjonen spraytørkes for å danne hule mikrosfærer, men løsningsmidlene (for eksempel cellosolve eller diglym) er mindre flyktige enn vann.

Oppfinnelsen

En har nå framskaffet en framgangsmåte for å dannes mikrokapsler med forbedrete egenskaper med større utbytte, med smalere størrelsesfordeling og tynnere skall, i samsvar med den karakteriserende delen av patentkrav 1. Ytterligere fordelaktige trekk framgår av de uselvstendige krav. Oppfinnelsen angår også bruk av mikrokapsler, i samsvar med krav 10-12.

Ett aspekt ved oppfinnelsen vedrører en framgangsmåte for framstilling av mikrokapsler omfattende (i) å framskaffe en løsning av et vannløselig materiale i et vandig løsnings-middel og (ii) spraye løsningen inn i en gass slik at det vandige løsningsmidlet fordamper, for derved å danne hule mikrokapsler, kjenneteknet ved at den vandige løsningen inne-holder en væske med større flyktighet enn vann.

Egnete flyktige væsker omfatter etanol (den foretrukne flyktige forbindelse) (kokepunkt 78.3 °C), metanol (kokepunkt 64.5 °C) og aceton (kokepunkt 56 °C). Den flyktige væsken

må tjene som et løsningsmiddel for det vegg-dannende materialet og må være blandbar med vann i de mengdeforhold som anvendes.

Andelen av den vandige løsningen som er den flyktige væsken vil variere i henhold til identiteten av den flyktige forbindelsen, konsentrasjonen og identiteten av den flytige forbindelsen, konsentrasjonen og identiteten av det vegg-dannende materialet, temperaturen og trykket som løsningen skal sprayes med, samt det ønskete mikrokapsel-produktet. Den flyktige væsken utgjør typisk mellom 0.1% og 80% (volum/volum), fortrinnsvis 1-50% og aller helst 5-30%, f.eks. omlag 20% av løsningen. Det kan anvendes blandinger av flyktige væsker, hvorved prosentandelene foran viser til det totale innhold av flyktig væske.

Spraytørkingen kan være en ett-trinns prosess for eksempelvis å framskaffe det ønskete mikrokapselprodukt umiddelbart. Alternativt kan det umiddelbare produkt underlegges ytterligere prosesstrinn, for eksempel oppvarming for å framskaffe ytterligere tverrbinding og trekke proteinskallet i mikrokapslene ut av løsning. Dette utgjør en totrinns prosess.

For et produkt som skal injiseres i blodstrømmen hos et menneske, f.eks. som et ekkogent kontrastmiddel i ultralyd-diagnostiske metoder (som er én tiltenkt bruk av produktet), utføres fortrinnsvis hele prosessen under sterile betingelser. Følgelig er proteinløsningen steril og ikke-pyrogen, gassen i kammeret føres først gjennom et 0.2 μm filter, spraytørkeren blir innledningsvis autoklavert osv. Alternativt kan det ferdige produkt like godt steriliseres, for eksempel ved eksponering overfor ioniserende stråling.

Det vegg-dannende materialet er et vannløselig materiale, fortrinnsvis et protein (betegnelsen brukes for å inkludere ikke-naturlig forekommende polypeptider og polyaminosyrer). Det kan f.eks. være kollagen, gelatin eller (serum) albumin, i hvert tilfelle (dersom mikrokapslene skal administreres til mennesker) fortrinnsvis av human opprinnelse (dvs. avledet fra mennesker eller med en struktur tilsvarende det humane protein) eller polylysin eller polyglutamat. Det kan være humant serumalbumin (HA) avledet fra blod-donasjoner eller fra fermentering av mikroorganismer (inkludert cellelinjer) som har blitt transformert eller 'transfected' til å uttrykke HA. Alternativt kan det brukes enkle eller komplekse karbohydrater, enkle aminosyrer eller fettsyrer, f.eks. lysin, mannitol, dekstran, palmitinsyre eller behensyre.

Teknikker for ekspresjon av HA (en betegnelse som omfatter analoge og fragmenter av humant albumin, f.eks. de beskrevet i EP-A-322094, og polymerer av monomert albumin) er beskrevet i f.eks. EP-A-201239 og EP-A-286424. "Analoge og fragmenter" av HA

omfatter alle polypeptider (i) som er i stand til å danne en mikrokapsel i framgangsmåten ifølge oppfinnelsen og (ii) av hvilke et kontinuerlig område på minst 50% (fortrinnsvis minst 75%, 80%, 90% eller 95%) av aminosyresekvensen er minst 80% homolog (fortrinnsvis minst 90%, 95% eller 99% homolog) med et kontinuerlig område på minst 50% (fortrinnsvis 75%, 80%, 90% eller 95%) av et natur-identisk humant albumin. HA som er produsert ved rekombinante DNA-teknikker kan også anvendes. Følgelig kan HA produseres ved uttrykking av en HA-kodende nukleotidsekvens i gjær eller i en annen mikroorganisme etterfulgt av rensing av produktet, som kjent innen fagområdet. Slikt materiale mangler fettsyrene forbundet med serum-avledet materiale. Fortrinnsvis er HA generelt fri for fettsyrer; dvs. det inneholder mindre enn 1% av fettsyrenivået i serum-avledet materiale. Fortrinnsvis er fettsyre udetekterbart i HA.

Den vandige løsningen eller dispersjonen er fortrinnvis 0.1-50% w/v, helst 1.0-25.0 w/v eller 5.0-30.0 w/v protein, særlig når materialet er albumin. Et område på 5-15% w/v er optimalt. Blandinger av vegg-dannende materialer kan anvendes, der prosentandelene i de siste to setningene viser til totalinnholdet av vegg-dannende materiale.

Preparatet som skal sprayes kan inneholde substanser forskjellig fra det vegg-dannende materialet, vann og flyktig forbindelse. Følgelig kan den vandige fasen inneholde 1-20 vekt% vannløselige hydrofile forbindelser slik som sukker og polymerer som stabilisatorer, f.eks. polyvinylalkohol (PVA), polyvinylpyrrolidon (PVP), polyetylenglykol (PEG), gelatin, polyglutaminsyre og polysakkarider slik som stivelse, dekstran, agar, xanthan og tilsvarende.

Det kan innlemmes funksjonelle midler, f.eks. i en konsentrasjon fra 1.0 til 40.0 vekt% (w/w), slik som røntgenkontrastmidler (f.eks. Hexabrix (ioxaglinsyre), Optiray (ioversol), Omnipaque (iohexol) eller Isovice (iopamidol)) eller magnetsresonans-midler (for eksempel kolloidalt jernoksid eller gadolin-chelat, f.eks. gadopentetsyre).

Tilsvarende vandige faser kan anvendes som bærevæske der det endelige mikrokapsel-produktet suspenderes før bruk. Tensider kan anvendes (0.1-5 vekt%) inkludert de mest fysiologisk akseptable tensidene, f.eks. egg-lecitin eller soyabønnelecitin, eller syntetisk lecitin slik som mettet syntetisk lecitin, f.eks. dimyristoyl fosfatidylcholin, dipalmitoyl-fosfatidylcholin eller distearoyl-fosfatidylcholin eller umettet syntetisk lecitin, slik som dioleyl-fosfatidylcholin eller dilinoleyl-fosfatidylcholin. Andre tensider omfatter frie fettsyrer, estere av fettsyrer med polyoksyalkylen-forbindelser slik som polyoksypropylen-

glykol og polyoksyetylenglykol; etere av fettalkoholer med polyoksyalkylen-glykol; estere av fettsyrer med polyoksyalkylert sorbitan; såper; glycerol-polyalkylen-stearat; glycerol-polyoksyetylen-ricinoleat; homo- og ko-polymerer av polyalkylen-glykol; polyetoksylert soyaolje og lakserolje samt hydrogenerte derivater; etere og estere av sukrose eller andre karbohydrater med fettsyrer, fettalkoholer, som valgfritt kan være polyoksyalkylerte; mono-, di- og tri-glycerider av mettede eller umettede fettsyrer, glycerider eller soyaolje og sukrose. Bærevæsken inneholder imidlertid fortrinnsvis ikke noe tensid.

Additiver kan innlemmes i veggen av mikrokapslene for å modifisere de fysikalske egenskaper slik som dispergerbarhet, elastisitet og vannpermeabilitet.

Blant de nyttige additivene kan en nevne forbindelser som kan "hydrofobisere" veggen for å redusere vannpermeabilitet, slik som fett, voks og høymolekylære hydrokarboner. Additiver som øker dispergerbarheten av mikrokapslene i den injiserbare væskebærer er amfifatiske forbindelser slik som posfolipidene; og øker dessuten vannpermeabilitet og hastighet ved biodegradering. Mikrokapslene inneholder imidlertid fortrinnsvis ingen additiver som øker dispergerbarheten av mikrokapslene siden en har funnet at de er overflødige, i det minste når mikrokapslene er laget av albumin.

Mengden av additivene som skal innlemmes i veggen er svært variabel og avhenger av behovet. I noen tilfeller brukes det ingen additiver i det hele tatt; i andre tilfeller kan mengden av additiver nå opp i 40.0 vekt% av veggen.

Løsningen av veggdannende materiale forstøves og spraytørkes med enhver egnet teknikk som resulterer i separate mikrokapsler med diameter i området 0.05-50.0 μm. Disse tallene viser til minst 90% av mikrokapslenes volum, der diameteren måles med en Coulter Multisizer II. Betegnelsen "mikrokapsler" viser til hule partikler som inneslutter et hulrom som er fylt med en gass eller damp men uten noe fast materiale. Celleformete partikler som likner konfekt som selges i Storbritannia som "Maltesers" (varenavn) blir ikke dannet. Hulrommet trenger ikke være fullstendig lukket (selv om dette er foretrukket) og det er ikke nødvendig at mikrokapslene er fullstendig sfæriske, selv om de er generelt sfæriske. Dersom mikrokapslene ikke er sfæriske, viser diameteren foran til diameteren av en tilsvarende sfærisk mikrokapsel med samme masse og som inneslutter det samme volum av hulrom som den ikke-sfæriske mikrokapsel.

Forstøvingen omfatter framstilling av en aerosol ved f.eks. å tvinge blandingen gjennom minst ei dyse under trykk, eller ved bruk av en sentrifugalforstøver i et kammer med varm-

luft eller en annen inert gass. Kammeret bør være tilstrekkelig stort til at de største utstøtte dråpene ikke treffer veggen før tørking. Dersom mikrokapslene skal injiseres i blodstrømmen for diagnostisk avbildning er gassen eller dampen i kammeret ren (dvs. fortrinnsvis steril og pyrogen-fri) og ugiftig når de administreres inn i blodstrømmen i mengder i tråd med administrering av mikrokapslene innen ekkokardiografi. Hastigheten for fordamping av væsken fra proteinblandingen bør være tilstrekkelig høy til å danne hule mikrokapsler men ikke så høy at mikrokapslene brister. Fordampningshastigheten kan reguleres ved å variere gassstrømningshastigheten, konsentrasjonen av protein i proteinblandingen, egenskapene for væskebæreren, fødehastighet for løsningen og, aller viktigst, temperaturen i gassen som kontakter aerosolen. Smale størrelsesfordelinger oppnås ved spraytørking med en kombinasjon av lav fødehastighet for råmaterialet med svært høye nivå for forstøvning og tørkeluft. Resultatet blir framstilling av mikrokapsler med svært definert størrelse og smal størrelsesfordeling. Ulike medarbeidere har utarbeidet likinger for å definere den midlere dråpestørrelse i pneumatiske dyser; en enkel versjon av de ulike parametrene som påvirker midlere dråpestørrelse er som følger:

$$D = A/(V^2 \cdot d)^a + B \cdot (M_{luft}/M_{væske})^{-b}$$

der

D =	midlere dråpestørrelse
A =	konstant relatert til dysekonstruksjon
B =	konstant relatert til væskeviskositet
V =	relativ lufthastighet mellom væske og dyse
d =	luftdensitet
M_{luft}=	masse av luft
$M_{væske}$=	masse av væske
a og b =	konstanter relatert til dysekonstruksjon

(For å unngå tvil er V opphøyd i andre kvadrat, $(V^2 \cdot d)$ er opphøyd i potens a og $(M_{luft}/M_{væske})$ er opphøyd i potens -b.)

For en gitt dysekonstruksjon blir dråpestørrelsen for det meste påvirket av den relative hastighet ved dysa og samtidig masseforholdet mellom luft og væske. For de vanligste

tørkeanvendelser er forholdet mellom luft og væske i området 0.1-10 og ved disse forholdene ser det ut til at midlere dråpestørrelse er 15-20 μm. For framstilling av mikrokapsler i størrelsesområdet beskrevet her vil en generelt anvende luft/væske-forhold i området 20-1.000. Effekten er å framstille partikler ved høye forhold som er svært små ved sammenliknbare standarder, med svært smale størrelsesfordelinger. For mikrokapsler framstilt ved lavere forhold mellom luft og væske, blir det framstilt litt større partikler, men de har imidlertid fremdeles en smal størrelsesfordeling, noe som er overlegent sammenliknet med mikrokapsler framstilt med emulgeringsteknikker.

Ved en albuminkonsentrasjon på 5.0-25.0% i vann, er det generelt tilstrekkelig med en gasstemperatur ved innløp på minst 100°C, fortrinnsvis minst 110°C, for å sikre hulhet, og temperaturen kan være så høy som 250°C uten at kapslene brister. Et temperaturområde på 180-240°C, fortrinnsvis 210-230°C og aller helst omlag 220°C er optimalt, i det minste for albumin. Temperaturen kan, i ett-trinns-versjonen av prosessen ifølge oppfinnelsen, være tilstrekkelig til å uløseliggjøre i det minste deler (vanligvis utsiden) av det vegg-dannende materialet og ofte hovedsakelig alt vegg-dannende materiale. Siden temperaturen i gassen som medfølger aerosolen også vil være avhengig av tilførselshastigheten for aerosolen og av væskeinnholdet i proteinblandingen, kan utløpstemperaturen overvåkes for å sikre en passende temperatur i kammeret. En utløpstemperatur på 40-150°C har vist seg å være passende.

Dersom det vegg-dannende materialet er et protein omfatter de midlertidige mikrokapslene i to-trinns-prosessen typisk 96-98% monomerisk protein og oppviser samme vannløselighet som det vegg-dannende materialet selv. De har en begrenset levetid *in vivo* for ultralydavbildning. De kan imidlertid anvendes til ultralydavbildning eller kan lagres og transporteres før det andre trinnet i to-trinns-prosessen blir utført. De danner derfor et ytterligere aspekt ved oppfinnelsen.

I det andre trinnnet i prosessen er de midlertidige mikrokapslene framstilt i det første trinnet faste og er gjort mindre vannløselige slik at de kan eksistere lengre uten at de blir så uløselige og inerte at de ikke er biodegraderbare. Dette trinnet styrker også mikrokapslene slik at de er i bedre stand til å motstå belastningene ved administrering, vaskulære skjærkrefter og ventrikulært trykk. Dersom mikrokapslene brister blir de mindre ekkogene. Schneider et al (1992) Invest. Radiol. 27, 134-139 viste at ultralydbehandlete albuminmikrokapsler fra den kjente teknikk ikke har denne styrke og mister raskt deres ekkogenitet

når de underlegges trykk som er typisk i den venstre ventrikkel. Det andre trinnet i prosessen kan gjøre bruk av varme (for eksempel mikrobølgevarme, strålingsvarme eller varm luft, for eksempel i en konvensjonell ovn), ioniserende stråling (med f.eks. en 10.0-100.0 kGy dose gammastråler) eller kjemisk kryssbinding i løsningsmidler ved bruk av f.eks. formaldehyd, glutaraldehyd, etylenoksid eller andre midler for kryssbinding av proteiner, og utføres på de hovedsakelig tørre midlertidige mikrokapslene dannet i det første trinnet, eller på en suspensjon av slike mikrokapsler i en væske når mikrokapslene er uløselige, f.eks. i et egnet løsningsmiddel. I ett-trinns-versjonen av prosessen kan et kryss-bindingsmiddel slik som glutaraldehyd sprayes inn i spraytørkekammeret eller kan tilføres til proteinblandingen like oppstrøms for sprayorganet. Alternativt kan temperaturen i kammeret være tilstrekkelig høy til å uløseliggjøre mikrokapslene.

Sluttproduktet, målt på samme måte som de midlertidige mikrokapslene, kan om ønskelig bestå av mikrokapsler med en diameter på 0.1-50.0 μm, men volum i området 0.1-20.0 μm og særlig 1.0-8.0 μm er oppnåelig med framgangsmåten ifølge oppfinnelsen og er foretrukket for ekkokardiografi. En må ta i betraktning det faktum at det andre trinnet kan endre størrelsen av mikrokapslene under bestemmelse av størrelsen produsert i det første trinnet.

Det er funnet at framgangsmåten ifølge oppfinnelsen kan kontrolleres for å oppnå mikro-kapsler med ønsket karakteristikk. Følgelig kan trykket som proteinløsningen tilføres spraydysa med varieres, f.eks. fra $1.0\text{-}20.0\cdot10^5$ Pa, fortrinnsvis $5.0\text{-}10.0\cdot10^5$ Pa og aller helst omlag $7.5\cdot10^5$ Pa. Væskens strømningsrate kan reguleres tilsvarende. Andre parametre kan endres som beskrevet foran og i det etterfølgende. På denne måten kan det framskaffes nye mikrosfærer. En har funnet at mikrokapsler dannet fra råvarer som inneholder flyktige komponenter som gir mere inakte hule kapsler, med jevnere overflate, og med mindre størrelse enn kapsler dannet i fravær av en flyktig komponent. Det kan særlig oppnås et produkt med en høy grad av reflektivitet i forhold til mengde veggdannende materiale. For eksempel kan en homogen suspensjon av 13 μg/ml mikrokapsler gi en reflektivitet overfor 3.5 MHz ultralyd på minst -1.0 dB. Høyere reflektivitet enn -0.3 kan være unødvendig, og en reflektivitet i området -0.7 til -0.5 er passende.

Fortrinnsvis er minst 50% av proteinet i veggen av mikrokapslene kryssbundet. Fortrinnsvis er minst 75%, 90%, 95%, 98.0%, 98.5% eller 99% av proteinet tilstrekkelig kryssbundet til at det er resistent mot ekstraksjon med en 1% HCl-løsning i 2 minutter.

Ekstrahert protein detekteres ved bruk av proteinprøvemetoden Coomassie Blue, Bradford. Graden av kryssbinding kontrolleres eller reguleres ved å variere oppvarming, bestråling eller kjemisk behandling av proteinet. Under kryssbindingsprosessen blir proteinmonomereren kryssbundet og blir raskt utilgjengelig i en enkel oppløsningsprosess, som detektert ved gel-penetrerings HPLC eller gel-elektroforese, som vist i eksempel 3 nedenfor. En fortsatt behandling fører til ytterligere kryssbinding av allerede krysbundet materiale slik at det blir utilgjengelig i HCl-ekstraksjonen beskrevet foran. Under oppvarming ved 175 °C mister HA-mikrokapsler i henhold til oppfinnelsen omlag 99% av HCl-ekstraherbart protein i løpet av 20 minutter, mens ved 150°C vil en 20 minutter lang oppvarming fjerne kun omlag 5% HCl-ekstraherbart protein, 30 minutter fjerner 47.5%, 40 minutter 83%, 60 minutter 93%, 80 minutter 97% og 100 minutter fjerner 97.8% av HCl-ekstraherbart protein. For å oppnå god kryssbindingsgrad kan derfor mikrokapslene varmes ved 175 °C i minst 17-20 minutter, ved 150°C i minst 80 minutter og ved andre temperaturer i tilsvarende lengre eller kortere tid.

Mikrokapslene ifølge oppfinnelsen kan lagres tørt i nærvær eller fravær av additiver for å fremme konservering, hindre koalescens eller bistå resuspendering. Som additiver kan en velge fra 0.1 til 200.0 vekt% vannløselige fysiologisk akseptable forbindelser slik som mannitol, galaktose, laktose eller sukrose, eller hydrofile polymerer slik som dekstran, xanthan, agar, stivelse PVP, polyglutaminsyre, polyvinylalkohol (PVA) og gelatin. Den nyttige levetiden for mikrokapslene i den injiserbare væskebærerfasen, dvs. perioden der det observeres nyttige ekkografiske signaler, kan reguleres til å vare fra noen få minutter til flere måneder avhengig av behovet; dette kan utføres ved å regulere porøsitet, løselighet eller kryssbindingsgrad av veggen. Disse parametrene kan reguleres ved å foreta et passende valg av veggdannende materialer og additiver og ved å justere fordampingshastigheten og temperaturen i spraytørkekammeret.

For å minimere enhver agglomerering av mikrokapslene kan de males med et egnet inert hjelpestoff ved bruk av en Fritish sentrifugalpiggmølle (pin mill) forsynt med en 0.5 mm sikte, eller en Glen Creston luftstrålemølle. Egnete hjelpestoffer er finmalt pulver som er inert og egnet til intravenøs bruk, slik som laktose, glukose, mannitol, sorbitol, galaktose, maltose eller natriumklorid. Straks mikrokapsel/hjelpestoff-blandingen er malt kan den suspenderes i et vandig medium for å tillempe fjerning av ikke-funksjonelle eller defekte mikrokapsler, eller den kan plasseres i ferdigbeholdere for distribusjon uten ytterligere

behandling. For å tillempe påfølgende reorganisering i den vandige fasen, kan det tilsettes spormengder av tensid i maletrinnet og/eller i det vandige mediet for å hindre agglomerering. Anioniske, kationiske og ikke-ioniske tensider egnet til dette formål omfatter poloxamerer, sorbitanestere, polysorbater og lecitin.

Mikrokapselsuspensjonen kan deretter tillates å flyte eller kan sentrifugeres for å sedimentere eventuelle defekte partikler som har overflatedefekter som i bruk vil kunne fylles med væske slik at de ikke lenger vil være ekkogene.

Mikrokapselsuspensjonen kan deretter blandes på nytt for å sikre jevn partikkelfordeling, vaskes og reorganiseres i en buffer egnet for intravenøs injeksjon slik som isotonisk mannitol. Suspensjonen kan tilmåles for frysetørking og påfølgende sterilisering ved f.eks. gammastråling, tørrvarming eller etylenoksid.

En alternativ framgangsmåte for deagglomerering av de uløseliggjorte eller fikserte mikrokapslene er å suspendere dem direkte i et vandig medium som inneholder et egnet tensid, f.eks. poloksamer, sorbitanester, polysorbat og lecitin. Deagglomerering kan deretter oppnås ved bruk av en egnet homogenisator.

Mikrokapselsuspensjonen kan deretter tillates å flyte eller kan sentrifugeres for å sedimentere de defekte partiklene, som foran, og behandles ytterligere som angitt foran.

I en foretrukket utførelse av oppfinnelsen blir produktet fra varmeherdingstrinnet deagglomerert ved maling som angitt foran.

Selv om mikrokapslene ifølge oppfinnelsen kan markedsføres i tørr tilstand, kan det være ønskelig å selge også ferdiglagete blandinger, særlig når de er framstilt med en begrenset levetid etter injeksjon, dvs. suspensjoner av mikrokapsler i en vandig bærer klar for injeksjon.

Produktet er imidlertid generelt forsynt og lagret som et tørt pulver og er suspendert i en egnet steril og ikke-pyrogen væske like før administrering. Suspensjonen blir generelt administrert ved injeksjon av 1.0-10.0 ml til en passende vene slik som underarmsvenen eller andre blodkar. En mikrokapselkonsentrasjon fra $1.0 \cdot 10^5$ til $1.0 \cdot 10^{12}$ partikler/ml er passende, fortrinnsvis fra $5.0 \cdot 10^5$ til $5.0 \cdot 10^9$.

Selv om ultralydavbildning er anvendbart på mange ulike dyr samt på humane organsystem, er en av de sentrale anvendelser oppnåelsen av bilder av myokardinalt vev og perfusjon eller blodstrømningsmønster.

Teknikken gjør bruk av scanning-utstyr bestående av en scanner og et bildeapparat. Utstyret produserer visuelle bilder av et forutbestemt område, i dette tilfellet hjerteregionen av en menneskekropp. Typisk plasseres transduceren direkte på huden over området som skal avbildes. Scanneren huser ulike elektroniske komponenter inkludert ultralyd-transducere. Transduceren produserer ultralydbølger som danner et sektorsveip av hjerte-regionen. Ultralydbølgene reflekteres av de ulike delene av hjerteregionen og mottas av den mottagende transducer og prosesseres i henhold til pulsekko-metoder som er kjent innen faget. Etter prosessering blir signalene sendt til bildeapparatet (også velkjent i faget) for avbildning.

I framgangsmåten ifølge oppfinnelsen, etter at pasienten er "forberedt" og scanneren er på plass, blir mikrokapselsuspensjonen injisert, f.eks. gjennom en armvene. Kontrastmidlet strømmer gjennom venen til den høyre veneside av hjertet, gjennom hovedlungearterinen som fører til lungene, gjennom lungene, gjennom kapillærene, inn i lugevenen og til slutt inn i det venstre forkammer og venstre ventrikulære hulrom i hjertet.

Med mikrokapslene ifølge oppfinnelsen kan det utføres observasjoner, og det kan stilles diagnoser med hensyn til hvor lang tid som kreves for at blodet skal passere gjennom lungene, blodstrømningsmønsteret, størrelsen av venstre forkammer, tilstanden til den mitrale ventil (som skiller venstre forkammer og venstre ventrikkel), kammerdimensjoner i det venstre ventrikulære hulrom og avvik i veggbevegelse. Ved utstøting av kontrastmidlet fra den venstre ventrikkel kan en dessuten analysere tilstanden hos aortaventilen så vel som den utstøtte fraksjon eller prosentvolum utstøtt fra den venstre ventrikkel. Endelig vil kontrastmønstrene i vevet indikere hvilke områder som eventuelt ikke blir tilstrekkelig perfusert.

Sett i sammenheng vil et slik mønster av bilder hjelpe til ved diagnostisering av uvanlige blodstrømkarakteristikker inne i hjertet, valvulær tilstand, kammerstørrelse og vegg-bevegelse, og vil gi en potensiell indikator på myokardial perfusjon.

Mikrokapslene kan tillate venstre hjerteavbildning fra intravenøse injeksjoner. Albumin-mikrokapslene kan når de er injisert i en perifer vene være i stand til å passere gjennom lungene. Dette resulterer i en ekkokardiografisk skyggelegging av det venstre ventrikkel-hulrom (LV) samt av myokardialt vev.

Ved siden av scanneren beskrevet i korte trekk foran, finnes det andre ultralydscannere, se f.eks. US patentskrifter 4.134.554 og 4.315.435. I grunnen er disse patentene relatert til

ulike teknikker inkludert dynamisk tverrsnitts-ekkokardiografi (DCE) for framstilling av sekvensielle todimensjonale bilder av tverrsnittsskiver av dyr eller mennesker ved hjelp av ultralydenergi ved en hastighet tilstrekkelig til å muliggjøre dynamisk visualisering av bevegende organ. Apparat som anvendes innen DCE kalles generelt DCE-scannere og overfører og mottar korte lydpulser i form av smale stråler eller linjer. De reflekterte signalenes styrke er en funksjon av tid, som omdannes til en posisjon ved bruk av en nominell lydhastighet, og vises på et katoderør eller andre egnete visningsorgan på en måte som er ganske analog med radar- eller sonar-skjermer. Mens DCE kan anvendes til å framstille bilder av mange organsystemer inkludert leveren, galleblæren, bukspyttkjertelen og nyrene, blir metoden ofte brukt til å visualisere vev og sentrale blodkar i hjertet.

Mikrokapslene kan brukes til avbildning av mange ulike områder, selv når injisert fra en perifer veneposisjon. Disse områdene omfatter eksempelvis (1) venesystemet til hjertet, (2) det myokardinale vev og perfusjonskarakteristikk under en tredemølletest eller tilsvarende, og (3) myokardinalt vev etter en oral innføring eller intravenøs administrering av medikamenter utformet for å øke blodstrømmen til vevet. I tillegg kan mikrokapslene være nyttige til å avdekke endringer i den myokardinale vevsperfusjon grunnet inngrep eller tilstandsendring slik som (1) venetransplantasjon ved arteriesvikt, (2) angioplasti ved arteriesvikt (ballongekspansjon av en innsnevret arterie), (3) bruk av trombolytiske midler (slik som streptokinase) for å løse opp tilstoppinger i hertearterier, eller (4) perfusjonsdfekter eller endringer grunnet et nylig hjerteanfall.

Ved framstilling av et koronarangiogram (eller et digitalt subtraksjonsangiogram) kan en injeksjon av mikrokapslene framskaffe data med hensyn til vevsperfusjonskarakteristikker som vil forsterke og komplettere de data som oppnås fra angiogram-prosedyren, som kun identifiserer anatomien i blodkarene.

Ved bruk av mikrokapslene ifølge oppfinnelsen kan andre ikke-kardiale organsystemer inkludert leveren, milten og nyrene, som i dag avbildes med ultralydteknikk, være egnet til å forbredre slike bilder og/eller framskaffe nye bilder som viser perfusjon og strømningskarakteristikker som ikke har vært mottakelig for avbildning ved bruk av kjente ultralydavbildningsteknikker.

Foretrukne aspekter ved oppfinnelsen er beskrevet i det etterfølgende med henvisning til eksempler og til figur 1, som er ei delvis snittet perspektivskisse av forsiden og en side av et egnet spraytørkeapprat for det første trinnet i framgangsmåten ifølge oppfinnelsen.

Eksempel 1

Spraytørkeutstyr

En egnet spraytørker (fig.1) er tilgjengelig fra AS Niro Atomizer, Søborg, Danmark under handelsnavnet "Mobile Minor". Spraytørkeren omfatter et reservoar 1 for proteinløsningen og en overliggende luftdispergator 2 som sikrer effektiv kontroll av luftstrømningsmønsteret. Hvirvlende luft ledes rundt den roterende forstøveren eller dyseforstøveren 3 (f.eks. type M-02/B Minor), drevet av en luftturbin med et lufttrykk på minst 4.0 bar og maksimalt 6.0 bar. Ved 6.0 bar oppnås en forstøverhjulhastighet på omlag 33.000 opm. Av- og på-slåing av den komprimerte lufta til forstøveren utføres ved hjelp av en ventil plassert i instrumentpanelet 9. Det maksimale forbruk av komprimert luft til forstøveren er 17 Nm^3/h ved et trykk på 6.0 bar. Alle deler som kommer i kontakt med væskefoden og pulveret er laget av rustfritt stål AISI 316, bortsett fra pumpeføderøret og forstøverhjulet, som er laget av rustfritt stål AISI 329, laget for å motstå stor sentrifugalkraft.

Maskinen har trinn 5 for adgang til kammertoppen og en bryter 6 for en luftventil for aktivering av en pneumatisk løfteanordning ved løfting av kammerlokket.

Tørkekammeret har en innside laget av rustfritt stål AISI 316, godt isolert med Rockwool (varemerke) og dekket på utsiden med en lett stålbelegning. Taket i tørkekammeret er på innsiden laget av rustfritt stål AISI 316 og på utsiden av rustfritt stål AISI 304.

En luftspreder 2 laget av rustfritt stål AISI 304 anvendes til å fordele lufta i tørkekammeret for å oppnå den best mulige tørkeeffekt. En luftkanal 4 laget av rustfritt stål AISI 316 gir sideveis transport av utgående luft og pulver til syklonen 7, som er laget av rustfritt stål AISI 316 og er konstruert for å skille pulver og luft.

En avstengningsventil av typen spjeldventil, også laget av rustfritt stål AISI 316 og med en pakning av silikongummi, brukes til å fjerne pulver under syklonen til et pulveroppsamlingsglass 8 som er plassert like under syklonen ved hjelp av et fjærorgan.

Ei sentrifugalavgassvifte 10 laget av silumin, med en trefaset 'squirrel-cage' motor på 0.25 kW og et V-beltedrev med belteavskjerming trekker luft og pulver gjennom tørkekammeret og syklonen. Et spjeld regulerer luftstrømmen.

En luftvarmer 12 varmer tørkelufta ved hjelp av elektrisitet (totalforbruk 7.5 kWh/h, ubegrenset varierbar) og kan gi innløpslufttemperaturer på maksimalt 350°C, selv om dette generelt er for høyt til framstilling av mikrokapslene ifølge oppfinnelsen.

Fordampningskapasitet

Tørkeluft	*Lufttemperatur innløp*	*Lufttemperatur utløp*	*Fordampn.kapasitet*
85 kg/h	150°C	80°C	1.3 kg/h
85 kg/h	170°C	85°C	1.7 kg/h
80 kg/h	200°C	90°C	2.5 kg/h
80 kg/h	240°C	90°C	3.4 kg/h
75 kg/h	350°C	90°C	7.0 kg/h

Utstyr for dyseforstøvning med to væsker kan monteres, laget av rustfritt stål AISI 316, bestående av et innføringsrør med dyseholder og dyse for plassering i taket på tørkekammeret. Utstyret omfatter en olje/vann-separator, reduksjonsventil og trykkmåler for komprimert luft til væskedysa. Forbruk av trykkluft: 8-15 kg/h ved et trykk på 0.5-2.0 bar.

Ei egnet fødepumpe for transport av veggdannende fødeblanding til forstøveranordningen er ei peristaltisk pumpe. Pumpa er forsynt med en motor (1 x 220 V, 50 Hz, 0.18 kW) og en kontinuerlig varierbar utveksling for manuell justering. Et tilførselsrør laget av silikonslange fører fra en fødetank (lokal tilførsel) gjennom fødepumpa til forstøveranordningen.

Et absolutt luftfilter bestående av et forfilter, filterhus i rustfritt stål og et absolutt luftfilter brukes til å behandle den inngående tørkeluft for å gjøre den fullstendig ren.

Prosess

En 10.0% (vekt/volum) løsning av sterilt og pyrogenfritt rHA i pyrogenfritt vann (egnet til injeksjon) med 25.0% (volum/volum) etanol ble pumpet til dysa i en dyseforstøver for to væsker montert i den kommersielle spraytørkeenheten beskrevet foran. Den peristaltiske pumpehastigheten ble holdt ved en hastighet på omlag 4.0 g/min slik at utløpstemperaturen ble holdt ved 95 °C ved en innløpslufttemperatur på 220 °C.

Trykkluft ble tilført til forstøverdysa ved 2.0-10.0 bar. I dette området blir det oppnådd mikrokapsler med en midlere størrelse på 2.0-3.0μm.

En økning i midlere partikkelstørrelse (ved redusert forstøvningstrykk) fører typisk til en økning i mengde mikrokapsler med størrelse over 10 μm (se tabell 1).

Tabell 1
Effekter av forstøvertrykk på frekvens av mikrokapsler med diameter over 10 µm

Forstøvertrykk (x 10^5 Pa)	*% Frekvens over 10 µm*
6.0	0.8
5.0	3.0
3.5	6.6
2.5	8.6
2.0	13.1

I dette spesifikke eksemplet ble det brukt et trykk på $5.0 \cdot 10^5$ Pa til å lage mikrokapslene.

I det andre trinnet i prosessen ble 5g mikrokapsler varmet i et begerglass ved bruk av en Gallenkamp vifteovn. En temperatur på 175 °C i 1 time var tilstrekkelig til å gi mikrokapsler med 100% fiksering bestemt ved HPLC. Effekten av denne varmefikseringen var å øke den ekkogene halveringstid *in vivo* fra noen få sekunder til i overkant av 30 minutter. Ved å endre temperaturen og inkuberingslengden er det mulig å variere graden av fiksering mellom 5% og 100%.

Etter varmefiksering eller -herding, ble mikrokapslene deagglomerert og dispergert i vann på en av to måter. Framgangsmåte 1 involverte først blanding av de varmefikserte sfærene med en tilsvarende vekt av finmalt laktose (midlere diameter 5 µm). Blandingen ble deretter ført gjennom en Fritsch sentrifugalmølle med en 0.5 mm sikte og en tolvtannet rotor. De oppmalte sfærene ble samlet og ført gjennom mølla nok en gang for å sikre fullstendig blanding. Det oppmalte pulveret ble deretter resuspendert i vann med innhold av 1 mn/ml Pluronic F68 (varenavn). Det ble typisk tilsatt 10g mikrokapsler og laktose til 100 ml vann og Pluronic F68. Framgangsmåte 2 for deagglomerering omfatter tilsats av 5g varmefikserte mikrokapsler til 100 ml vann med innhold av 100 mg Pluronic F68. Mikrokapslene ble dispergert ved bruk av en Silverson homogenisator (modell L4R med en 2.54 cm rørformet homogeniseringssone og en sikte med store skjærkrefter) og homogenisert i 60 sekunder.

De resuspenderte sfærene ble delt inn i intakte (gassholdige) og brutte sfærer ved bruk av en flotasjonsteknikk. De gassholdige sfærene fløt oppå overflata i en periode på 1 time og ble dekantert fra den synkende fraksjon som ikke inneholdt den påkrevde gassen.

Separasjonsprosessen kan akselleres ved sentrifugering. En 30 sekunder lang sentrifugering ved 5.000 G er tilstrekkelig til å skille de to fraksjonene.

Etter separering ble de intakte mikrokapslene frysetørket i nærvær av laktose og Pluronic F68. Optimale betingelser for frysetørking involverte resuspendering av 30 mg mikrokapsler i 5 ml vann inneholdende 50 mg laktose og 5 mg Pluronic F68. De frysetørkete mikrokapslene kan redispergeres i en væske (f.eks. vann, saltvann) for å gi en monodispers fordeling.

Eksempel 2

Det ble framstilt mikrokapsler som i eksempel 1 men under betingelser angitt nedenfor.

En 100 ± 10 mg/ml løsning av sterilt og pyrogenfritt serum-avledet humant albumin i pyrogenfritt vann (egnet for injeksjon) med 25% w/w etanol ble brukt som råvareblanding for spraytørking.

Ved bruk av ei peristaltisk pumpe ble albuminfødeblandingen pumpet med en hastighet på 4 ± 1.5 g/min slik at det ble oppnådd en utløpstemperatur på 80 ± 10°C ved en innløpstemperatur på 220 ± 0.5°C.

Ytterligere spraytørkebetingelser var som følger: luftstrøm 50 ± 2%, forstøvertrykk 8.0 ± 0.5 bar overtrykk, tørkeluftstrøm 9 ± 2 mm vannsøyle.

De framstilte mikrokapslene ble varmefiksert eller -herdet ved en temperatur på 176 ± 2°C i 55 ± 5 min i 5 ± 1 g like store porsjoner i 250 ml beger av rustfritt stål.

Etter varmeherding ble mikrokapslene deagglomerert. Glukose ble tilsatt til de oppsamlete mikrokapslene i et forhold på 2:1, blandet og malt med en Glen Creston luftjetmølle.

De deagglomererte mikrokapslene ble fylt i glassampuller, og ampullene ble etterfylt med nitrogen, forseglet og tildekket med lokk. Produktet ble til slutt sterilisert ved bestråling med en dose i området 25-35 kGy.

Eksempel 3: Prøvetaking av fri monomerisk ablumin i mikrokapsler

Etanol i et volum på 1 ml ble tilsatt til 100 mg mikrokapsler i en 20 ml glassflaske og ultralydbehandlet i 30 sekunder. Til denne suspensjonen ble det tilsatt 19 ml vann.

Blandingen ble sentrifugert i en laboratoriemikrofuge (Gilson) i 20 sekunder og den klare fraksjonen ble analysert. Analysen ble utført ved å laste 50 ml av fraksjonen automatisk på

en Shimadzu LC6A HPLC og kromatografering på en TSK gelkolonne ved en strømningsrate på 1 ml/min ved bruk av natriumfosfatbuffer (pH 7.0).

Toppene som representerte HA-monomer ble registrert og brukt til å bestemme konsentrasjonen av monomer ved bruk av en standardkurve mellom 1 og 10 mg/ml monomerisk HA.

Prosentandelen av fri monomerisk HA ble beregnet ved å måle monomerkonsentrasjonen i de herdete mikrokapslene og representere dette tallet som en prosentandel av monomerkonsentrasjonen i de uherdete mikrokapslene.

Oppvarming av de spraytørkete mikrokapslene i en ovn (som beskrevet i eksempel 1) resulterer i en reduksjon av mengde monomer som kan detekteres. Denne reduksjonen av detekterbar monomerisk HA er forårsaket av denaturering og kryssbinding av monomerisk HA til uløselige polymerer som ikke kan analyseres med den ovennevnte HPLC-metoden.

Ved bruk av HPLC-metoden for å vurdere HA-nivå er det klart at etter 15 minutters inkubering finnes det intet fritt monomerisk HA tilstede i HA-mikrokapslene. Det er imidlertid fremdeles mulig å kryssbinde HA-mikrokapsler ytterligere ved varming i lengre perioder.

Denne forlengete varmingen fører til et økt nivå av mikrokapselkryssbinding som i gjen produserer mikrokapsler med økende styrke som er tilsvarende mere bestandig mot trykk.

Ved å utføre nøye kontroll av temperatur og inkuberingstid er det mulig å produsere mikrokapsler med et kontrollert kryssbindingsområde (og slik trykkfølsomhet).

Eksempel 4: Mikrokapsel-klassifisering

En fordel med framgangsmåten ifølge oppfinnelsen er at den muliggjør regulering av midlere størrelse samt størrelsesfordeling av mikrokapslene. En kan imidlertid velge ytterligere ønskete størrelser etter ønske, f.eks. ved flotasjon. I en homogen dispersjon av mikrokapsler vil større partikler stige til overflata raskere enn mindre partikler grunnet lavere densitet (mere innkapslet luft) av de større partiklene. Ved slik å tillate dispersjonen å stå i ro vil partikkelstørrelsesfordelingen endres på alle nivå i løsningen med hensyn til tiden.

Mikrokapsler ble dispergert i 2.000 ml vandig løsning med innhold av 6% w/v natriumklorid og 0.1% w/v Pluronic F68 (varenavn) i ei glassflaske gitt ei væskekolonne på omlag

165 mm. Et oppsamlingsrør ble plassert 50 mm under den øvre væskeoverflata for å muliggjøre fjerning av prøver i tidsbestemte intervaller.

Ved å endre henstandstid og natriumkloridkonsentrasjon var det mulig å framstille et utvalg av partikkelstørrelsesfordelinger og klassifisere mikrokapsler ned til 2 μm.

Andre våtteknikker for klassifisering omfatter hydrodynamisk kromatografi og feltflytfraksjonering. 'Tørrteknikker' ved bruk av teknikker med oppslemming og kryssflytseparasjon er kommersielt tilgjengelig i form av Microsplit (British Rem.), Zig-zag (Alpine) og Turbo (Nissuid) klassifiseringsapparat.

Eksempel 5: Karakterisering av mikrokapsler av humant serum-albumin

De hule mikrokapslene framstilt ved framgangsmåten ifølge oppfinnelsen har vist seg å være slik at mengden av veggdannende materiale som er brukt i framstillingen er vesentlig lavere enn den som brukes i tidligere kjente framstillingsmetoder på grunn av mindre midlere størrelse og forbedringer i skall-karakteristikk. På tross av dette er imidlertid den ekkogene egenskap ved mikrokapslene overlegen overfor de som har blitt framstilt tidligere. Denne nye karakteristikk måles og uttrykkes som decibel (dB) ekkogenitet per mikrogram/ml albumin. Ekkogenitet kan defineres som materialets evne til å reflektere eller 'spre tilbake' ultralydbølger. Intensiteten av refleksjonen kvantifiseres ved bildeanalyse i lys av decibel. Dess høyere intensitet av signalet, dess mer ekkogen er prøven.

Alt vann som ble brukt i prøven var pyrogenfritt og ble hensatt (drawn) i to dager før bruk og tillatt avgassing ved eksponering overfor luft.

Til et 400 ml polypropylen test-begerglass (Fisons Scientific Equipment, UK) ble det tilsatt 350 ml vann og eventuelle luftbobler fikk flyte til overflata før bruk.

En Hewlett Packard Sonos 1000 ultralydmaskin ble brukt, og kontrollorganene ble satt som følger: TGC (total økning) #1, #2, #3, #4, #5, #6, #7, all = 128, Compress = 128 dB, og Transmit = 60 dB. Det ble brukt en 3.5 MHz transducer ved en dybdeplassering på 8 cm.

Transduceren ble ført ned i vannet til en dybde på 1.5 cm og det magnetiske vedheng satt ved 75 rotasjoner/min. En bakgrunnsregistrering av refleksjonsintensitet ble tatt innledningsvis. En bildeanalysator (Seescan, Cambridge, UK) ble brukt til å registrere ultralydsveip i 1.2 sekunder og deretter dele registreringen inn i 10 individuelle tidsrammer. Hver ramme ble analysert for tilbakespredningsintensitet og de statistiske resultater ble beregnet.

Et homogent volum av suspenderte mikrokapsler ble forsiktig tilsatt mens en unngikk tilførsel av luftbobler. Det tilsatte volum var slik at mikrokapselkonsentrasjonen inne i ultralyd-testcella etter administrering var $1 \cdot 10^6$/ml. Mikrokapslene fikk dispergeres jevnt i vannet før et sanntids ultralydsveip ble tatt opp ved bruk av bildeanalysatoren og den målte tilbakespredningsintensitet.

Ultralydinstrumentet var kalibrert med referanse til en rustfri stålreflektor og en serie av økende ekkoreflektivt vevssimulerende (mimicking) silikongummiklosser levert av ATS Laboratories Inc., Bidgeport, CT 06608 USA. Ei kalibreringskurve ble trukket opp og påfølgende målinger av Vide Display Units, bestemt nedenfor, ble konvertert tilbake til dB fra den framstilte kalibreringskurva. Prøven ble gjentatt tre ganger og den gjennomsnittlige målte intensitet ble beregnet.

Proteininnholdet i mikrokapslene av humant serumalbumin ble bestemt ved bruk av en modifisert Kjeldals-metode. Prøven bestemmer nitrogeninnholdet i en prøve av mikrokapsler som deretter beregnes med hensyn til den totale proteinkonsentrasjon; fra dette resultatet kan en beregne protein i et bestemt antall mikrokapsler og i særdeleshet proteininnholdet i prøven tilført ekkogenitetsprøven.

Mikrokapslene ble degradert ved bruk av en Tecator Digestion System 12 der eventuelt karbohydrat tilstede i prøven var oksidert med hydrogenperoksid. Alt protein og slik nitrogen tilstede omsettes under degradering til ammoniumsulfat. Dette blir igjen omsatt til ammoniakk ved dampdestillasjon under basiske betingelser. Den frigjorte ammoniakk kondenseres, absorberes i borsyre og den absorberte mengde bestemmes ved titrering med saltsyre. Denne prosedyren ble automatisert ved bruk av en Kjeltec Auto 1030 analysator. Ved bruk av egnete standarder kan en beregne mengde protein tilstede i en prøve.

Fra den totale proteinanalysen ble mengde protein tilsatt til ekkogenitets-testcella bestemt. Antall mikrokapsler administrert ble beregnet som vekt av protein tilsatt og derfor ble ekkogenitet per mikrogram/ml mikrokapsler bestemt.

Tabell 2
Ekkogenitet mot vekt av mikrokapsler

Sats nr.	*Ekkogenitet (VDU)*	*Konsentrasjon av mikrokapsler tilsatt (µg/ml)*	*Total VDU µg/ml mikrokapsler*
AIP101/941	26	13.23	1.97
AIP101/942	26	12.29	2.11

Tabell 2
Ekkogenitet mot vekt av mikrokapsler

AIP101/943	25	13.80	1.92
AIP101/944	26	12.47	2.09
Midlere resultat	-	-	2.023±0.09

Sats nr.	*Ekkogenitet (dB)*	*Vekt av mikro-kapsler tilsatt (µg/ml)*	*dB/µg/ml mikrokapsler*
AIP101/941	-7.4	13.23	-0.56
AIP101/942	-7.4	12.29	-0.6
AIP101/943	-7.3	13.80	-0.53
AIP101/944	-7.4	12.47	-0.59
Midlere resultat	-	-	-0.57±0.04

Eksempel 6: Optimalisering av spraytørkebetingelser for å maksimere antall intakte gass-holdige partikler

Det er foran beskrevet framstilling av jevne/glatte, sfæriske og hule mikrokapsler for bruk i ekkokontrastavbildning. Det er ønskelig å minimere antall partikler større enn 6 µm og maksimere antall gassholdige hule partikler. Det ble utført en rekke forsøk under betingelsene beskrevet i eksempel 1 for å undersøke innvirkningen av væskens tilførselshastighet på utbyttet av intakte sfæriske partikler. En fant at ved å øke væsketilførselshastigheten ble antall intakte mikropartikler dannet i den innledende spraytørking redusert (tabell 4). Den midlere partikkelstørrelse og total trykkstabilitet, dvs. skalltykkelse, ble ikke endret mens den totale ekkogenitet endres, ettersom væskestrømningshastigheten økte fra 4 til 16 ml/min. En fant at lavere fordampningshastighet (ved høyere væskestrømningshastighet) fører til at det dannes færre intakte gassholdige partikler.

Tabell 4

Strømningsrate (ml/min)	4	8	12	16
Midlere størrelse (µm)	3.08	3.04	3.13	3.07
Ekkogenitet (videodensitets-enheter)	22	21	14	10
Ekkogenitet etter trykk (videodensitets-enheter)	20	18	10	8

Patentkrav

1. Framgangsmåte for framstilling av mikrokapsler ved å (i) framskaffe en løsning av et materiale i et vandig løsningsmiddel og (ii) spraye løsningen i en gass slik at det vandige løsningsmidlet fordamper, for derved å framstille hule mikrosfærer,
karakterisert ved at den vandige løsning som anvendes inneholder en væske med større flyktighet enn vann.

2. Framgangsmåte ifølge krav 1,
karakterisert ved at den flyktige væsken som anvendes har et kokepunkt i området 20°C og 100°C ved atmosfæretrykk.

3. Framgangsmåte ifølge krav 1,
karakterisert ved at den flyktige væske som anvendes er etanol eller metanol.

4. Framgangsmåte ifølge et av kravene 1 til 3,
karakterisert ved at det anvendes en vandig løsning omfattende 0.1-80.0 volumprosent flyktig væske, særlig 5.0-30.0 volumprosent.

5. Framgangsmåte ifølge et av kravene 1 til 4,
karakterisert ved at materialet som anvendes er et protein.

6. Framgangsmåte ifølge krav 5,
karakterisert ved at proteinet som anvendes er albumin, kollagen eller gelatin.

7. Framgangsmåte ifølge et av kravene 1 til 6,
karakterisert ved at konsentrasjonen av materialet i løsningen innstilles til 1.0-25.0 prosent vekt/volum, særlig 5.0-15.0 prosent.

8. Framgangsmåte ifølge et av kravene 1 til 7,
karakterisert ved at løsningen tilsettes et røntgenkontrastmidel eller et magnetisk resonansbildedannende kontrastmiddel.

9. Framgangsmåte ifølge et av kravene 1 til 8,
karakterisert ved at mikrokapslene behandles ytterligere før bruk, ved varmebehandling for å uløseliggjøre mikrokapslene ytterligere eller bestråling for å sterilisere mikrokapslene.

10. Ultralydkontrastmiddel omfattende hule mikrosfærer som er framstilt ifølge krav 1, **karakterisert** ved at mikrokapslene, når suspendert i gassfritt vann ved 20°C for å gi en homogen mikrokapselkonsentrasjon på 13.0 µg/ml, oppviser en reflektivitet overfor 3.5 MHz ultralyd på minst -1.0 dB.

11. Farmasøytisk blanding omfattende sterile tørre mikrokapsler framstilt ifølge krav 1, i en forseglet ampulle.

12. Farmasøytisk blanding omfattende sterile mikrokapsler framstilt ifølge krav 1, i et sterilt intravenøst injiserbart medium.

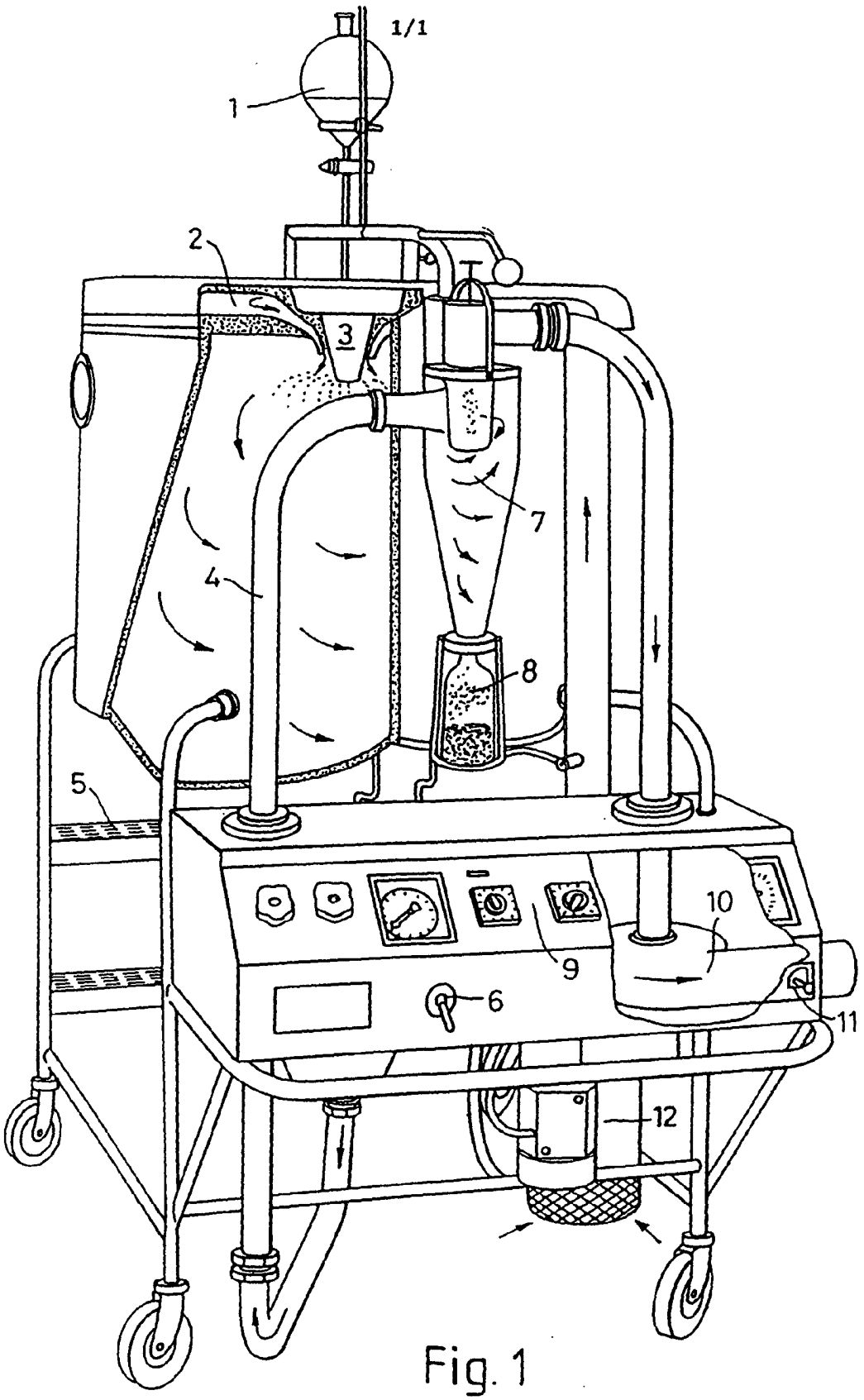


Fig. 1