



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **314127**

(13) B1

(51) Int Cl⁷

A 61 K 49/00

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19970665	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1996.06.14, PCT/IB96/00577
(22) Inng. dag	1997.02.13	(85) Videreføringsdag	1997.02.13
(24) Løpedag	1996.06.14	(30) Prioritet	1995.06.15, EP, 95810403
(41) Alm. tilgj.	1997.04.03		
(45) Meddelt dato	2003.02.03		
(71) Patenthaver	Bracco Research SA, 7, route de Drize, CH-1227 Carouge, CH		
(72) Oppfinner	Hervé Tournier, F-74520 Valleiry, FR Bernard Lamy, CH-1203 Geneve, CH Roland Hyacinthe, F-74140 Douvaine, FR		
(74) Fullmektig	Zacco Norway AS, 0106 Oslo		

(54) Benevnelse **Injiserbare NMR-billeddannende sammensetninger, fremgangsmåter for fremstilling og anvendelse av disse**

(56) Anførte publikasjoner WO 9221017
Schwendener "Liposomes As Carriers For Paramagnetic...", J. Liposome Research, 4(2), 837-855 (1994)
EP 160552
Schwendener et al. "Small Unilamellar Liposomes As Magnetic Reconance Contrast Agents...", Int. J. Pharmaceutics 49, 249-259 (1989)

(57) Sammendrag

NMR billeddannende kontrast sammensetninger omfattende magnetisk responsive arter koblet til fysiologiske akseptable amfipatiske organiske substratmaterialer i form av blandede miceller suspendert eller dispergert i en fysiologisk akseptabel vandig væskebærer er beskrevet. Sammensetningene er spesielt nyttige for diagnostiske undersøkelser av blodblandingen. Det er også beskrevet preparering av blandede miceller, samt injiserbare sammensetninger inneholdende blandede miceller som kontrastmidler for MRI formål. Når injisert vil de blandede micellene til sammensetningene oppføre seg som billeddannende kontrastfremmere, for eksempel så vil de forbedre kvaliteten og oppløsningen til elektroniske bearbejdede bilder oppnådd i løpet av MRI undersøkelser av sirkulasjons- og eller sirkulasjonsmål organer. Sammensetningene er formulert for å beskytte partiklene til kontrastmidlene fra tidlig fjerning fra retikulo-endotelisk (RES) systemet til lever og milt slik at de vil forbli i sirkulasjon i en tid som er tilstrekkelig for riktig billeddannelse av blodårene og blir transportert til utvalgte organer. MRI billeddannelse av sirkulasjon og av målorganer kan være sterkt behjelpelig med å diagnostisere mulige lidelser i mennesker og dyr.

Foreliggende oppfinnelse vedrører NMR-billeddannende kontrastsammensetninger omfattende et paramagnetisk metallion koblet til et chelateringsmiddel som har en lipofil del og en eller flere amfipatiske organiske forbindelser. Oppfinnelsen vedrører også fremstilling av sammensetninger, samt injiserbare MRI-kontrastmidler for blod, deres anvendelse og et sett som omfatter tørr kontrastsammensetning og en fysiologisk akseptabel vandig bærer.

De relativt lav molekylvekt magnetisk responsive vann-oppløselige metallkompleksene så som Gd-DTPA, Gd-DOTA osv. er ikke egnede for anvendelse som kontrastmidler ved bildeddannelse av blodmengden ("blood-pool imaging") på grunn av deres delvise lekkasje gjennom åreveggene (ekstravasasjon inn i ekstravaskulært område) og deres meget hurtige eliminering gjennom nyrene. Den hurtige elimineringen gjør at disse forbindelsene ikke er egnede for bildeddannelse av det vaskulære systemet på grunn av at de ikke kan gi akseptable kontraster (reduksjon av T_1 -relaksasjonstiden til protoner) i tilstrekkelig tid.

Forskjellige forsøk for å produsere forbindelser egnede som MRI-kontrastmidler for undersøkelser av blod er blitt utført. Søken etter kontrastmidler med lange oppholdstider i blodsirkulasjonen, høy relaksivitet og fullstendig eliminering av de administrerte forbindelser har frembrakt forslag hvor paramagnetiske forbindelser er innkapslet i liposomvesikler eller immobilisert i liposommembranen, kopolymerisert med polyetylglykol eller podet på en polymerkjede så som albumin, dekstran eller polylysin. Eksempler på slike sammensetninger er Gd-DTPA-albumin, Gd-DTPA-dekstran eller Gd-DTPA-polylysin kompleksmolekyler (se for eksempel: M.D. Ogan et al., Invest. Radiol. 22 (1987) 665; S.C. Wang et al., Radiology 175 (1990) 483; G. Schumann-Giampieri et al., Invest. Radiol. 26 (1991) 969; og A.V.S. Vexler et al., Invest. Radiol. 29 suppl. 2 (1994) S62; B. T.S. Dessler et al., Invest. Radiol. 29 suppl. 2 (1994) S65; C.D. Meyer et al., Invest. Radiol. 29 suppl. 2 (1994) S90; D.D. Shen et al., Invest. Radiol. 29 suppl. 2 (1994) S217). Ovennevnte sammensetninger viser lengre oppholdstider i blod enn vannløselige metallkomplekser. Deres oppholdstider i sirkulasjon er derimot fortsatt ikke tilstrekkelig og noen av disse forbindelsene har vist uakseptable toksisitetsnivåer ved bildeddannelse av blod ("blood pool imaging"). Lengre oppholdstider og lavere immunogenisitet er blitt rapportert av A.A. Bogdanov et al., Radiology 187 (1993) 701 for Gd-DTPA-MPEG-polylysin komplekser som består av et metoksy-poly(etylglykol)-belagt makromolekylært skjelett (polylysin) som bærer kovalentlig koblet Gd-DTPA.

Blant de mange forsøkene på å øke relaksivitetene til paramagnetiske forbindelser i blodet kan forslaget beskrevet i WO-A-91/14178 (Research Corporation) være av interesse. Dette dokumentet beskriver paramagnetiske kontrastøkende midler som er lipofile av natur og som er basert på polyaminopolykarboksylsyrederivater spesielt EDTA-(etylendiamintetraeddiksyre-) og DTPA-(dietylendiamintetraeddiksyre)derivater som har en eller to fettsyredeler og et karboksymetylacetamid som erstatter minst en eddiksyregruppe og fortrinnsvis to eddiksyregrupper. Foretrukne paramagnetiske metallioner er vanligvis paramagnetiske metallioner inkludert gadolinium. Konjugater av paramagnetiske kontrastmidler med andre fysiologiske midler så som proteiner, peptider, antistoffer eller liposomer er også blitt beskrevet. Lipofile paramagnetiske midler kan bli inkorporert i liposommembranen for å assistere målsøking og forbedre relaksiviteten.

Halveringstiden til kontrastmidler inneholdende paramagnetiske stoffer bundet til makromolekyler er derimot ofte for kort til å være hensiktsmessig for billeddannelse av blod. For å løse denne utfordringen er anvendelse av suspensjoner av liposomale mikrovesikler inneholdende innkapslede paramagnetiske chelater som bærere av NMR-kontrastmidlene blitt foreslått. Anvendelse av liposomer som bærere er blitt foreslått for relativ biokompatibilitet og letthet av fremstilling av liposomer og deres suspensjoner. Innkapsling av kjente paramagnetiske kontrastmidler i liposomer er blitt beskrevet i et antall forskjellige publikasjoner (for eksempel E. C. Unger et al. JMIR3 (1993), 195-198, EP-A-0 160 552, osv).

Levetiden til liposominnkapslede kontrastmidler injisert i sirkulasjonen er kort på grunn av den hurtige fysiologiske fjerningen på grunn av opsonisering etterfulgt av fagocytose. Opsoniseringsprosessen innbefatter belegging av "inntrengende" partikler med proteiner, betegnet opsoniner, som kan bli oppdaget av makrofager etterfulgt av deres fjerning (fagocytose) og metabolisering av belagte (opsoniserte) partikler til Kupffer-cellene i lever og milt.

Liposomer som bærere av vannoppløselige paramagnetiske chelater utgjør følgelig ikke en ideell løsning på paramagnetiske kontrastmidler for blodmengder. Som tidligere nevnt blir de fleste liposomene utsatt for hurtig fjerning fra sirkulasjonen av lever og milt, og til tross for at denne egenskapene kan være fordelaktig for billeddannelse av de sistnevnte organene er det ikke ønskelig når man ønsker å holde konsentrasjonene av kontrastforbindelsene i blodet på et relativt høyt nivå i en lengre tid. Midler har vært foreslått for å forlenge oppholdstiden til liposomvesiklene i blodet, dvs. å inkorporere

beskyttende forbindelser i vesikkeldannende lipider. I denne metoden er "stealth"-faktorer, blant andre kovalent modifiserte lipider, dvs. lipider (fosfatidyletanolamin (PE)) som det er podet dertil ytre utvidende polyetylenglykol (PEG) segmenter blitt foreslått. Inkorporering som "stealth"-faktorer til vesikkeldannende lipider av produkter
 5 så som palmitoylglukuronsyre (PG1cUA) er foreslått for å øke halveringstiden av liposomene i blodet.

Det er velkjent at levetiden til liposomene i blodet kan bli betydelig forlenget ved å gjøre liposomvesiklene meget små, for eksempel 50 nm eller mindre. Forslaget er basert
 10 på det faktum at små partikler er mindre størrelsesgjennkjennbare av opsoninene og dersom vesiklene er tilstrekkelig små vil deres residensid i blodet øke. Problemet med meget små vesikler er at med reduksjon i størrelse blir deres innkapslingskapasitet meget liten og dette er ikke kompatibelt med mengdene av kontrastmedium som er nødvendig for billedannelse av blod med paramagnetiske forbindelser. En annen
 15 ulempe med liposomene er at tilstedeværelse av lipidmembranen beskytter betydelig virkningen av kontrastmiddelet på vannprotonene innenfor undersøkelsesområdet. Til tross for at denne negative effekten kan bli redusert ved inkorporering av kontrastmiddelet innenfor membranlipidene, blant annet ved podning av en lipofil gruppe til chelateringsmiddelet til kontrastmiddelet (se R.A. Schwendener et al. Internat.
 20 J. Pharm. 49 (1989), 249-59), er resultatene fortsatt utilstrekkelige frem til nå, i det forholdet mellom magnetisk aktiv forbindelse og substrat fortsatt er meget lavt og oppholdstiden i blodet relativt kort.

På grunn av at oppholdstiden til kjente paramagnetiske MRI-
 25 kontrastmiddelsammensetninger fortsatt er utilstrekkelig og dette gjør at disse midlene er relativt ineffektive når organperfusjon og blodvolummålinger/billedannelse er nødvendig. Til tross for at longitudinal relaksivitet r_1 eller $(1/T_1)$ til kjente midler er akseptabel kan ytterligere økning av denne faktoren gi bedre kontrast og oppløsninger, dvs. bedre billedannelse og/eller vil tilveiebringe mer effektive midler som krever
 30 administrering av lavere mengder billedannende forbindelser for samme kvalitet og billedannende oppløsning. Redusering av mengden kontrastmiddel som blir administrert vil føre til lavere toksisitetsnivå. Ved å tilveiebringe en paramagnetisk blodkontrastsammensetning/middel som har en betydelig virkning på relaksasjonstiden T_1 til vannprotonene, tilstrekkelige "stealth"-egenskaper for blodet dvs. en levetid
 35 tilstrekkelig for å tilveiebringe fullstendig billedannelse med bare en dose av injisert sammensetning, sammen med en meget lav eller ingen immunogenisitet og et optimalt molforhold mellom MRI-responsiv forbindelse og farmasøytisk akseptabelt organisk

substrat er fortsatt meget ønskelig for å minimalisere mulige bivirkninger etter injeksjon.

Oppfinnelsen vedrører paramagnetiske, MRI-responsive kontrastsammensetninger som
 5 omfatter i en egnet vandig bærervæske, et paramagnetisk metallion, et
 chelateringsmiddel som har en lipofil del og et fysiologisk akseptabelt ikke-ionisk
 overflateaktivt middel eller en blanding av ikke-ioniske overflateaktive midler.

I særdeleshet angår oppfinnelsen en injiserbar NMR-billeddannende sammensetning
 10 omfattende som komponenter av en dispersjon i en fysiologisk akseptabel vandig
 bærerfase et paramagnetisk metallion og et chelateringsmiddel som har en lipofil del,
 kjennetegnet ved at sammensetningen omfatter et fysiologisk akseptabelt ikke-ionisk
 overflateaktivt middel eller en blanding av ikke-ioniske overflateaktive midler der det
 ikke-ioniske overflateaktive middel er en blokk-kopolymer med polyoksyetylen- og
 15 polyoksypropylensegmenter, en polyetylen glykolalkyleter, en
 polyoksyetylenfettsyreester, et n-alkylglukopyranosid eller et n-alkylmaltotriosid og
 eventuelt en eller flere amfipatiske forbindelser, der komponentene av dispersjonen er i
 micelleform.

20 Eventuelt kan sammensetningen innbefatte en eller flere amfipatiske forbindelser for
 eksempel fosfolipider. Chelateringsmiddelet omfatter et polyaminopolykarboksylat
 skjelett inneholdende minst en lipofil substituent, for eksempel en ester av en
 fettalkohol. Komplekser av paramagnetiske metallioner med chelateringsmidlene blir
 referert til som billeddannende midler. Sammensetningen ifølge oppfinnelsen er
 25 assosiasjoner av billeddannende midler, ikke-ioniske overflateaktive midler og
 eventuelt fosfolipider, til stabilt blandede miceller suspendert i en egnet bærervæske. De
 blandede micellene fremkommer ved konjugering eller assosiasjon av det
 billeddannende middelet med ikke-ionisk overflateaktivt middel og eventuelt en
 amfipatisk forbindelse. Betegnelsen assosiasjon eller konjugering betyr at
 30 komponentene til micellene kan være i form av addukter eller sammenblandinger av to
 eller flere forbindelser som har gjensidig affinitet eller så kan assosiasjonen være
 forårsaket av en eller flere bindinger for eksempel H-bindinger mellom bestanddelene,
 hvorved et chelateringsmolekyl med samtidig lipofile og hydrofile egenskaper vil bli
 tilbudt i en gitt ønskelig likevekt (hensiktsmessig hydrofil/lipofil balanse). Den
 35 billeddannende sammensetningen kan følgelig omfatte en blanding av et substrat som
 har egnede amfifile egenskaper og en forbindelse inkludert en paramagnetisk form og en

funksjon som har affinitet for substratet; eller så kan den billeddannende sammensetningen omfatte et mer eller mindre løst addukt av foregående bestanddeler.

Tilstedeværelse av ikke-ionisk overflateaktivt middel eller blandinger av ikke-ioniske overflateaktive midler i sammensetningen er vesentlig på grunn av at det ikke-ioniske overflateaktive middelet forårsaker at hovedbestanddelene dvs. paramagnetisk metallion og chelateringsmiddelet som har en lipofil funksjon fosfolipid og det overflateaktive middelet til å danne blandede miceller. Ved å gjøre hovedbestanddelene av sammensetningen micellær blir egenskapene til bestanddelene forandret og uventede effektive billeddannende egenskaper blir oppnådd. Størrelsen på micellene er funnet å variere mellom 10 og 800 nm, men det ser ut som om de mest effektive resultatene blir oppnådd når størrelsen fortrinnsvis er mellom 30 og 500 nm. Dispergert i en egnet vandig bærervæske danner de blandede micellene meget stabile kolloidale dispersjoner som motstår agglomerasjon eller aggregasjon i en lang periode.

Oppfinnelsen angår også en tørr, pulverformulering kjennetegnet ved at den omfatter som komponenter et paramagnetisk metallion, et chelateringsmiddel med en lipofil del, et fysiologisk akseptabelt ikke-ionisk overflateaktivt middel eller en blanding av ikke-ioniske overflateaktive midler og eventuelt en eller flere amfipatiske forbindelser som ved dispergering i en fysiologisk akseptabel flytende bærer, vil danne en micelledispersjon nyttig som et NMR-billedannende kontrastmiddel for blodmengden.

Oppfinnelsen vedrører også en fremgangsmåte for å fremstille paramagnetiske kontrastsammensetninger omfattende ikke-ioniske overflateaktive midler, deres anvendelse som kontrastmidler for blodet, og en fremgangsmåte for fremstilling av kontrastmidler som tørre pulvere oppnådd ved lyofilisering av sammensetningen. Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen omfatter trinnene:

- a) selektering og suspendering av et kompleks av et paramagnetisk metallion, et chelateringsmiddel omfattende en lipofil del, en eller flere ikke-ioniske overflateaktive midler, og eventuelt en eller flere amfipatiske forbindelser og i en vandig fase for å danne en blanding, og
- b) energetisering av blandingen ved sonikering eller mikrofluidisering for å bringe ingrediensene i intim kontakt og produsere homogen dispersjon av komponentene i micelleform.

Oppfinnelsen angår videre anvendelse av den pulverformige formulering ifølge oppfinnelsen og et to-komponentsett, kjennetegnet ved at det omfatter som førstekomponent en tørrformulering ifølge oppfinnelsen lagret under en inert atmosfære og, som andre komponent, en fysiologisk akseptabel bærervæske som når blandet
 5 sammen med den første komponenten tilveiebringer, som en suspensjon av de to komponentene, en injiserbar NMR-kontrastsammensetning ifølge oppfinnelsen.

Kort beskrivelse av tegningene

Fig. 1 er en skjematisk presentasjon av en blandet micelle av sammensetningen
 10 omfattende et paramagnetisk metallion 1, et chelateringsmiddel som har en lipofil del 2, et fosfolipid 3 og et fysiologisk akseptabelt ikke-ionisk overflateaktivt middel 4.

Fig. 2 er en graf som viser sammenlignende data til T_1 -relaksiviteten i vann oppnådd for Gd-DTPA, forskjellige Gd-baserte makromolekylære midler og micellære Gd-DTPA-
 15 SE/DPPA-SE/DPPA/F108, Gd-DTPA-(SE)₂/DPPA/BRJ@78 og Gd-DTPA-(SE)₂/BRJ@78 sammensetninger ifølge oppfinnelsen.

Fig. 3 er en skjematisk presentasjon av den strukturelle formelen til amfipatisk derivat av DTPA [DTPA-(SE)₂] dannet via reaksjonen av DTPA-anhydrid med stearylalkohol.
 20

Fig. 4 er et diagram av farmakokinetikken i blod hos rotte av en micellær Gd-DTPA-SE/fosfolipid/F108 sammensetning ifølge oppfinnelsen.

Fig. 5 er et diagram av farmakokinetikken i blod hos rotter til en micellær Gd-DTPA-
 25 (SE)₂/fosfolipid/F108 sammensetning ifølge oppfinnelsen.

Fig. 6 er et diagram av blodfarmakokinetikken i blod hos rotter til micellære radiomerkede sammensetninger med forskjellige fosfolipider produsert ifølge oppfinnelsen.
 30

Fig. 7 er et diagram av farmakokinetikken i blod hos rotter til micellære ¹⁵³Gd-DTPA-(SE)₂/DPPC/BRJ@78 og ¹⁵³Gd-DTPA-(SE)₂/BRJ@78 sammensetninger ifølge oppfinnelsen.

35 Hovedaspektet ifølge oppfinnelsen som angitt i kravene er basert på det uventede funnet som omfatter at eksepsjonelt effektive paramagnetiske NMR-kontrastsammensetninger blir oppnådd når den billeddannende sammensetningen i tillegg til et paramagnetisk

metallion kompleksbundet med et polyaminopolykarboksylat chelateringsmiddel som har en lipofil del omfatter et fysiologisk akseptabelt ikke-ionisk overflateaktivt middel eller en blanding av ikke-ioniske overflateaktive midler og fortrinnsvis en eller flere amfipatiske forbindelser så som fosfolipider. Det paramagnetiske metallionet er

5 kompleksbundet med polyaminopolykarboksylat og komplekset blir ofte referert til som bileddannende middel. I tillegg er det slik at bare det paramagnetiske ionet har ønskede magnetiske egenskaper og er derfor nesten fullstendig ansvarlig for den bileddannende virkningen, dvs. forandring i relaksivitet til hydrogenatomene til vann.

Kompleksbinding av metallion og følgelig tilstedeværelse av chelateringsmiddel er
10 nødvendig bare for å motvirke toksisiteten til paramagnetiske metallioner og eliminere deres uønskede effekter. Blant chelateringsmidler har derivater av polyaminopolykarboksylsyre vist seg å være spesielt nyttige for kompleksbinding av paramagnetiske ioner ment for NMR-billeggelse av humant legeme eller dyrelegemer.

15

I sammensetningene ifølge oppfinnelsen er polyaminopolykarboksylat chelateringsmiddelet utstyrt med en hydrofob gruppe (blant annet en forestret fettalkoholkjede) som lett blir koblet eller sammenfiltres (sannsynligvis ved Van der Waals krefter) med den hydrofobe delen av det ikke-ioniske overflateaktive middelet og
20 eventuelt med fettsyreresidene til fosfolipidet. Det ikke-ioniske overflateaktive middelet tilveiebringer sannsynligvis ytterligere hydrofile/lipofile balanseparametere for å muliggjøre at 4-komponentsystemet eksisterer som blandede miceller dispergert i en bærervæske.

25 Som skjematisk presentert i fig. 1 omfatter nevnte blandede miceller et paramagnetisk metallion (1) tilbakeholdt av et chelateringsmiddel som har en lipofil del (2), en amfipatisk forbindelse for eksempel et fosfolipid (3) og et ikke-ionisk overflateaktivt middel (4). Denne konfigurasjonen av et paramagnetisk metallion bundet til en amfipatisk struktur dvs. et polyaminopolykarboksylatsegment omfattende ioniske
30 hydrofile funksjoner, en ikke-ionisk hydrofil funksjon (polyetylenoksid segment) og ikke-ioniske hydrofobe alifatiske kjeder har vist betydelig høy kontrasteffektivitet ved NMR-billeggelse av blod. Som det fremgår fra den eksperimentelle delen er denne kontrasteffekten minst 30% bedre enn den til sammenlignende sammensetninger kjent innenfor teknikkens stand hvor fosfolipidet er laminært (vesikulær form) i stedet
35 for micellært. Den nøyaktige grunnen til hvorfor denne konfigurasjonsforskjellen er så effektiv er fortsatt ukjent, men det er blitt oppdaget at blandede miceller kan ha

partikkelstørrelser mellom 10 og 800 nm og best resultater blir oppnådd med miceller i størrelse som varierer mellom 30 og 500 nm.

En mulig forklaring på de eksepsjonelle egenskapene til blandede miceller ifølge oppfinnelsen og deres egnethet som MRI-kontrastmidler for blod kan skyldes det faktumet at de har samtidig affinitet for vann og for oljer, dvs. de har egnet lipofil/hydrofil balanse. De involverte hydrofile funksjonene er ioniske og ikke-ioniske. Den tilsvarende hydrofile/lipofile-balansen (HLB) kan variere betydelig og kan være mellom 1 og 50, men er fortrinnsvis fra 5 til 15. På grunn av disse ekvilibrerte overflatemiddelegenskaper spekuleres det i at, de blandede micellene når de er dispergert i en egnet vandig bærervæske, danner meget stabile kolloidale dispersjoner, dvs. micellene motstår agglomerering eller aggregering til større aggregater i en lang periode. Diagrammet presentert i fig. 2 viser relaksivitetsverdiene T_1 oppnådd for kontrastforbindelser ifølge oppfinnelsen og relaksivitetsverdier rapportert for Gd-DTPA og forskjellige Gd-baserte makromolekylære midler. Som det fremgår fra dette sammenligningsdiagrammet tilveiebringer kontrastmidler omfattende paramagnetisk kontrastsammensetning i form av blandede miceller relaksiviteter som er 30-250% høyere enn de til tidligere kjente sammensetninger. Høyere relaksiviteter koblet til lengre residenstider i sirkulasjon oppnådd med de paramagnetiske kontrastmidlene ifølge oppfinnelsen tilveiebringer en viktig fordel sammenlignet med kjente NMR-kontrastmiddelsammensetninger.

De blandede micellene ifølge oppfinnelsen kan bli produsert ved anvendelse av ikke-ioniske, ioniske og blandinger av ioniske og ikke-ioniske overflateaktive midler, men på grunn av deres fysiologiske stabilitet er ikke-ioniske overflateaktive midler foretrukket. Ikke-ioniske overflateaktive midler er fortrinnsvis blokk-kopolymerer med polyoksyetylen og polyoksypropylensegmenter, polyetylen glykolalkyletere så som for eksempel polyetylen glykol-oktadecyleter eller polyoksyetylenfettsyreestere, eller polyoksyetylensorbitan fettsyreestere, eller n-alkylglykopyranosid og n-alkylmaltotriosid. Ikke-ioniske overflateaktive midler i sammensetningene ifølge oppfinnelsen blir hensiktsmessig valgt fra kommersielt tilgjengelige produkter så som Pluronic®, Poloxamer®, Poloxamin®, Synperonic®, BRIJ®, Myrj®, Tween® (polysorbater) og deres blandinger. Vektforholdet til det overflateaktive middelet i forhold til mengden av paramagnetisk billeddannende middel er fra 1:50 til 50:1, fortrinnsvis 1:10 til 10:1, og mer foretrukket er 1:1.

For å gjøre det bildebyggende polykarboksyliske chelateringsmolekylet kompatibelt med fosfolipider og ikke-ioniske overflateaktive midler er chelateringsmolekylet utstyrt med en hydrofob gruppe, blant annet i form av karboksylatester med hydrofobe alifatiske eller aromatiske alkoholer. Som slike alkoholer kan man nevne mettede og umettede C₁ til C₂₄ alkoholer som metanol, etanol, propanol, butanol (n-, iso-, tert-), pentanol, heksanol (og isomerer), heptanol, oktanol (og isomerer), nonanol, dekanol og fettalkoholer; som aromatiske alkoholer kan man nevne substituerte og usubstituerte benzyl- og høyere fenylalkylalkoholer. Chelateringsmolekylet kan også bli utstyrt med en hydrofob gruppe i form av et karboksylatamid med hydrofobe alifatiske eller

10 aromatiske aminer. Slike aminer kan være mettede og umettede C₁ til C₂₄ aminer som metylamin, etylamin, propylamin, butylamin (n-, iso-, tert-), pentylamin, heksylamin (og isomerer), oktylamin (og isomerer), nonylamin, decylamin, aminodamantan og fettaminer; som aromatiske aminer kan man nevne substituerte og usubstituerte benzyl- og høyere fenylalkylaminer. Alternativt kan polykarboksylisk chelateringsmiddel bli

15 utstyrt med lipofile hydrofobe grupper koblet til alkylensegmentene til det molekulære skjelettet, eller til α -karbonet til karboksylatfunksjonene eller til en hydroksylgruppe når tilstede i chelateringsmiddelet. Et eksempel på sistnevnte er produktet av reaksjonen mellom Gd-HP-DO3A med et fettsyreklorid.

20 Eksperimenter har vist at den lipofile delen til polyaminopolykarboksylat chelateringsmiddelet kan variere i størrelse fra metyl (C₁) til en langkjedet alkyl eller alkylengruppe med så mange som 24 karbonatomer (C₂₄) og kan også innbefatte substituerte eller usubstituerte benzyl- eller høyere fenylalkylgrupper. Dersom polykarboksylchelatat har en lipofil funksjon som sannsynligvis tilveiebringer en

25 forankring for fosfolipid og/eller overflateaktive molekyler blir de blandede micellene dannet. De blandede micellene som blir oppnådd virker nokså stabile selv med en kort alkylgruppe, men av praktiske grunner er alkylgrupper med C₁₂-C₁₈ foretrukket. Det er blitt oppdaget at når det ikke-ioniske overflateaktive middelet er eikosaetylglykol-oktadecyleter kjent under varemerke BRIJ®78 er tilstedeværelse av fosfolipid til tross

30 for at det er fordelaktig i lys av høyere relaksivitet ikke helt nødvendig, i det micellene til det overflateaktive middelet og det paramagnetiske komplekset viser akseptabel relaksivitet og tilfredsstillende stabilitet i sirkulasjon.

Amfipatiske forbindelser egnede ifølge foreliggende sammensetning er fosfolipider som

35 kan bli valgt fra fosfatidinsyre (PA), fosfatidylcholin (PC), fosfatidyletanolamin (PE), fosfatidylserin (PS), fosfatidylglyserol (PG), fosfatidylinositol (PI), kardiolipin (CL) og sphingomyelin (SM). Amfipatisk forbindelse kan også bestå av en mono-fosfatester av

en substituert eller delvis substituert glyserol, der minst en funksjonell gruppe av nevnte glyserol er forestret med mettet eller umettet alifatisk fettsyre, eller forestret av mettet eller umettet alkohol, i det de andre to syrefunksjonene til fosforsyren enten er frie eller saltbehandlet med alkali- eller jordalkalimetaller. Det er foretrukket at fosfaterene
 5 innbefatter monofosfater av fettsyreglycerider valgt fra dimyristoylfosfatidinsyre, dipalmitoylfosfatidinsyre eller distearoylfosfatidinsyre.

Fosfolipidene kan også innbefatte diacyl- og dialkylglycerofosfolipider hvor de alifatiske kjedene har minst 12 karbonatomer, samt en eller flere forbindelser valgt fra
 10 ioniske og nøytrale fosfolipider, monoalkyl- eller alkenylestere av fosforsyre og/eller kolesterol, ergosterol, phytosterol, sitosterol, lanosterol og tokoferol. I sammensetningene inneholdende fosfolipider ser det ut som om vektforholdet mellom fosfolipider og polykarboksylsyrechelatet ikke er kritisk og kan variere i et vidt område for eksempel fra 1:50 til 50:1. Det praktiske området vil være mellom 10:1 og 1:10,
 15 fortrinnsvis mellom 1:5 og 5:1 og mer foretrukket mellom 1:3 og 3:1 og dette skyldes at anvendelse av et stort overskudd av chelat kan resultere i unødvendig sløsing med chelaterings-/billeddannende middel, mens et overskudd av fosfolipid utover en viss konsentrasjon ikke gir noen ekstra fordel. I sammensetninger hvor fosfolipider blir anvendt kan vektforholdet mellom fosfolipid og overflateaktivt middel variere som
 20 ovenfor, mens områdene fra 1:10 til 10:1 og fortrinnsvis mellom 1:2 og 2:1 er betraktet som områder hvor optimale sammensetninger av NMR-blodmiddelet finnes.

Chelatdelen til den magnetiske responsive komponenten til micellene heri kan bli valgt fra EDTA (etylendiamintetraeddiksyre), DTPA (dietylntriaminpentaeddiksyre),
 25 BOPTA (4-karboksy-5,8,11-tris(karboksy-metyl)-fenyl-2-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-oinsyre), DOTA (1,4,7,10-tetraazasyklododekan-1,4,7,10-tetraeddiksyre), DO3A (1,4,7,10-tetraazasyklododekan-1,4,7-trieddiksyre eller 1,4,7-triskarboksymetyl-1,4,7,10-tetraazasyklododekan) og/eller deres derivater, og det paramagnetiske metallet kan bli valgt blant den kjente gruppen av paramagnetiske metaller, dvs. fra Gd(III),
 30 Mn(II), Cr(III), Cu(II), Fe(III), Pr(III), Nd(III), Sm(III), Tb(III), Yt(III), Dy(III), Ho(III) og Er(III).

Det er også blitt bestemt at en meget nyttig form av sammensetningen ifølge oppfinnelsen kan bli produsert ved lyofilisering av sammensetningen hvorved en tørr,
 35 pulverformig formulering blir oppnådd. Denne formen av paramagnetisk sammensetning er spesielt hensiktsmessig for langtidslagring. Lagring i pulverform blir gjort enklere ved det faktumet at rekonstituering av sammensetningen omfattende

blandede miceller blir oppnådd ved dispersjon av det lyofiliserte pulveret i en fysiologisk akseptabel flytende bærer som vil danne en suspensjon nyttig som NMR-billeddannende kontrastmiddel for blod. Lyofilisering er en enkel fryse-tørke prosess som ikke trenger spesielle sikkerhetsforanstaltninger eller mål.

5

Fremgangsmåten for fremstilling av sammensetning ifølge oppfinnelsen omfatter selektering som komponenter et paramagnetisk kontrastmiddel med et hensiktsmessig polykarboksylsyre chelaterende middel utstyrt med en egnet lipofil gruppe blandet sammen med en eller flere fosfolipider og ikke-ioniske overflateaktive midler og
10 dispergering av komponentene i micelleform i en fysiologisk akseptabel vandig flytende bærer så som vann eller saltvann, alene eller buffret, ifølge vanlig praksis. Avhengig av valg av komponentene kan dispersjonen bli oppnådd ved forsiktig blanding eller ved mer energetiske midler så som homogenisering, mikrofluidisering eller sonikering.

- 15 I en fordelaktig metode for å utføre ovennevnte preparering ved anvendelse av blant annet, som nødvendige komponenter, mono- eller distearylesteren til gadolinium-DTPA, dipalmitoylfosfatidinsyre (DPPA) som fosfolipid og og Synperonic® F-108 som et ikke-ionisk overflateaktivt middel, blir en vektdel av kontrastkomponenten blandet sammen med to deler av både lipid og overflateaktivt middel, og 100 til 200 deler vann.
20 Blandingen blir homogenisert ved sonikering ved en temperatur på 50-80°C i noen få minutter helt til de dispergerte blandingsene danner blendede miceller for det meste i området 20-250 nm. Generelt er micellestørrelsesfordelingen Gausisk.

- Alternativt kan to komponenter av foreliggende partikkelformige addukt, f.eks. den
25 paramagnetisk billeddannende komponent og fosfolipidene, først bli dispergert i den vandige bærervæsken og den tredje komponenten kan bli tilsatt dispersjonen etterpå, hvorved tilsetningen av nevnte tredje komponent vil forårsake at dispersjonen blir i micellær form.

- 30 I en fordelaktig metode for utførelse av dette alternativet kan en vektdel av den paramagnetiske komponenten og to deler av fosfolipid bli oppløst i et egnet organisk oppløsningsmiddel så som kloroform, metylenklorid, metanol eller blandinger derav og oppløsningen blir avdampet til tørrhet under redusert trykk. Deretter blir det gjenværende faste stoffet fint dispergert i omtrent 100 til 200 deler vann (eller annen
35 fysiologisk akseptabel flytende bærer), blant annet ved sonikering, mikrofluidisering eller på annen måte, og omtrent to deler F-108 overflateaktivt middel (eller av en

tilsvarende forbindelse) bli tilsatt og homogeniseringen blir gjenopptatt helt til micellene blir dannet som beskrevet).

Når den er tilberedt kan dispersjonen deretter bli sterilisert av varme som vanlig og
 5 anvendt som den er, eller den kan bli ytterligere dehydrert for lagring, blant annet ved lyofilisering. Dehydrert materiale i form av et pulver hvorfra MRI-kontrastmiddelet kan bli produsert ved sammenblanding av pulvere med en del av bærervæsken og risting.

For praktisk anvendelse av sammensetningen ifølge oppfinnelsen innen medisinsk
 10 område kan de tørkede komponentene og bærervæsken bli forhandlet separat i et sett hvorved kontrastmiddelet blir rekonstituert ved sammenblanding av komponentene i settet før injeksjon i sirkulasjonen til pasientene.

Den første komponenten til settet, dvs. tørrpulveret kan videre bli lagret under en tørr
 15 inert atmosfære og den andre komponenten, en fysiologisk akseptabel bærervæske, kan videre inneholde isotone additiver og andre fysiologiske akseptable ingredienser så som forskjellige mineralsalter, vitaminer osv.

Som allerede nevnt er det rekonstituerte middelet spesielt egnet for anvendelse ved
 20 NMR-billedanning av blod i organer i menneskelegemet eller dyr. Disse sammensetningene kan lette MR-angiografi og hjelpe til med å vurdere myokardial og cerebral iskemi, lungeemboli, vaskularisering av tumorer og tumorperfusjon.

Følgende eksempler vil illustrere oppfinnelsen ytterligere.

25

Eksempel 1

DTPA mono- og distearylestrene med formlene vist i figur 3 og tilsvarende gadoliniumchelater (Gd-DTPA-SE) og (Gd-DTPA-(SE)₂) ble dannet som beskrevet i G.W. Kalbalka et al., Magnetic Resonance in Medicine 8 (1988), 89-95. DTPA
 30 anhydridet nødvendig i syntesen ble dannet ifølge Eckelman et al., J. Pharm. Sci. 64 (1975), 704-706. Renheten til de billedannende midlene ble undersøkt ved måling av gadoliniuminnholdet ifølge vanlige metoder (dekompleksbinding i 2N saltsyre og titrering med EDTA oppløsningen; indikator, Xylenol-orange) og ga resultater vesentlig nær teoretisk verdi.

35

600 mg lecitin (SPC-3, Natterman) (0,788 mmol), 60 mg kolesterol (0,158 mmol) og 332 mg Gd-DTPA-(SE)₂ (0,315 mmol) ble løst opp i 100 ml av en 1/1 blanding MeOH

og CHCl_3 . Oppløsningen ble avdampet til tørrhet under redusert trykk (Rotavapor, $72^\circ\text{C}/15$ Torr. 1,5 time) og deretter ble 20 ml destillert vann tilsatt under agitasjon. Blandingen ble ytterligere homogenisert ved sonikering i omtrent 30 min. ved 70°C (Branson Sonifier, ytelse 40), hvorved en homogen melkeaktiv suspensjon av liposomvesikler (merket "L") ble oppnådd.

Til 10 ml av ovennevnte suspensjon ble det tilsatt 300 mg Synperonic® F-108 og sonikering ble gjenopptatt i noen få minutter og en stabil optisk klarere suspensjon av submikroniske partikler (merket "M") i micellær form ble oppnådd.

TABELL 1

	r_1	r_2
"L"	10,6	8,6
"M"	20,6	13,2

Protonspinn relaksiviteter til foregående suspensjoner ble målt ved anvendelse av en Minispec PC-120 (Bruker) apparatur, drevet under 0,47 Tesla (20 MHz). EDM 510A (EDM = Experiment Definition Module) ble anvendt for å måle "spin-lattice" relaksasjonstid T_1 ifølge "inversjonsisolering" metoden. EDM 610A ble anvendt for å måle spin-spin relaksasjonstiden T_2 ifølge Carr-Purcell-Meiboom-Gill(GPMG) teknikken. Relaksiviteter (r_1 og r_2) gitt i tabell 1 er uttrykt som r i $[\text{mMs}]^{-1} = 1/T$ for en 1 mM konsentrasjon.

De foregående resultatene demonstrerer klart omdanningen av den billeddannende forbindelsen fra vesikulær til micelleform øker betydelig relaksiviteten og følgelig billeddannende effektivitet.

Eksempel 2

I den første preparative metode (metode 1) ble to prøver dannet ved sammenblanding av 100 mg billeddannende middel, 200 mg DPPA (dipalmitoylfosfatidinsyre Na salt) og 200 mg Synperonic®F-108 og 20 ml H_2O , og deretter ble blandingen sonikert i 30 minutter ved 70°C , (Branson sonikerer ytelse 40). I en første prøve ("M1") ble det anvendt som billeddannende middel monostearylester Gd-DTPA-SE og i den andre prøven ("M2") ble det anvendt distearylester Gd-DTPA-(SE)₂.

Gjennomsnittlig størrelse til miceller og micellestørrelsesfordelingen ble bestemt ifølge en Dynamic Light Scattering (DSL) metode også kjent under navnet Photon Correlation Spectroscopy (PSC) ved anvendelse av en Nicomp 370 HDL-NPSS apparatur.

- Partikkelstørrelsesfordelingen (Gausisk) ble målt (Nicomp) og funnet å ha en topp ved 150-170 nm SD $\pm$ 60-90 nm for begge prøvene.

- To andre prøver ble dannet fra samme ingredienser, men teknikken (metode 2) ble modifisert som følger. Den billeddannende arten og lipidene ble først løst opp i 25 ml 2/1 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ blanding, oppløsningen ble avdampet til tørrhet som i eksempel 1, 20 ml H_2O ble tilsatt og dispersjonen ble oppnådd ved sonikering i 20 min., ytelse 20. Deretter ble F-108 tilsatt og sonikeringen gjenopptatt i 10 min. Prøven med monoesteren ble merket "M3" og den med diester "M4". Partikkelstørrelsesfordelingen ble målt og funnet å ha en topp ved 70-80 nm SD $\pm$ 30-40 nm for begge prøvene.

- r_1 og r_2 resultatene er oppstilt i tabell 2:

TABELL 2

	r_1	r_2	størrelse i nm
"M1"	28,9	17,4	152 $\pm$ 63
"M2"	23,8	18,3	170 $\pm$ 90
"M3"	35,7	35,1	66 $\pm$ 36
"M4"	30,5	30,9	79 $\pm$ 38

20

Det blir antatt at de høyere r_1 og r_2 verdiene oppnådd med blandede miceller ifølge "metode 2" kan være et resultat av det faktumet at micellene var mindre og hadde snevrere størrelsesfordeling enn i "metode 1".

25 Eksempel 3

Eksperimentene i eksempel 2 ble gjentatt ved anvendelse av metode 2 og Gd-DTPA-SE, men naturen til fosfolipidene ble forandret, dvs. anvendelse av dipalmitoylfosfatidylglyserol (DPPG) og dipalmitoylfosfatidylcholin (DPPC). Tabell 3 angir resultatene oppnådd med hensyn på relaksivitetene r_1 og r_2 i $(\text{mM.s})^{-1}$.

30

TABELL 3

Fosfolipid	r ₁	r ₂	størrelse i nm
DPPG-Na	30,2	28,6	110 ± 50
DPPC	27,3	26,9	99 ± 47
DPPA-Na	35,7	35,1	66 ± 36

- 5 Eksperimentene ifølge eksempel 2 ble gjentatt ved anvendelse av metode 2 og Gd-DTPA-(SE)₂, men med forandring av naturen til ikke-ioniske overflateaktive midler, dvs. ved anvendelse av eicosaetylglykol-oktadecylester kjent under varemerket BRIJ®78 (Fluka). Resultatene oppnådd ved dette eksperimentet er gitt i tabell 4.

10

TABELL 4

Fosfolipid	r ₁	r ₂	størrelse i nm
DPPG-Na	29,4	28,8	77 ± 27
DPPC	21,6	21,5	36 ± 26
DPPA-Na	27,4	27,7	103 ± 31

15 Eksempel 4

En sammensetning ble dannet ved anvendelse av retningslinjene i eksempel 2, metode (2) i 0,3M glyserolbuffer (5 mM fosfat, pH 7,25). Denne inneholdt pr ml 5 mg Gd-DTPA-SE, 10 mg DPPA-Na og 10 mg Synperonic®F-108.

- 20 Først ble en kalibreringskurve konstruert ved fortynning av sammensetningen med rotteblod til et område med kjente Gd konsentrasjoner og måling av T₁ og T₂ for hver Gd konsentrasjon.

- 25 Sammensetningen ble deretter injisert intravenøst i eksperimentelle rotter (omtrent 200 g) i en dose på 0,0385 mmol Gd/kg (omtrent 2 ml suspensjon/dyr). To rotter (som utgjør en gruppe) ble anvendt i hvert eksperiment.

NMR relaksasjonsmålinger (T_1 og T_2) ble utført på 5 ml blodprøver og verdiene (uttrykt med hensyn på Gd konsentrasjoner (Gd) ved hjelp av kalibreringskurven) ble plottet mot tid for å angi grafen ifølge fig. 4. Den beste matematiske tilpasningskurven er gitt ved ligningen:

5

$$[Gd](\text{mmol/l}) = 0,5e^{-0,0157 t (\text{min})}$$

(viser en del farmakokinetikkmodell)

Hovedfarmakokinetikkparametere beregnet fra denne en-del modellen var:

10

elimineringshalveringstid = 44 min
areal under kurven $[AUC]_{0-\infty} = 31,8 \text{ mM} \cdot \text{min}$
Fordelingsvolum = 0,0771/kg (eller 77 ml/kg)
Klaring = 0,00121 l/kg min

15

Elimineringshalveringstiden (44 min) oppnådd for den micellære formen er mye lenger dvs. bedre enn den som blir oppnådd for Gd-DTPA (15 min som $t^{1/2}(\beta)$).

Eksempel 5

20

En injiserbar sammensetning ble dannet ifølge eksempel 2, metode (2) ved anvendelse av Gd-DTPA-(SE)₂ i stedet for Gd-DTPA-SE.

Deretter ble en in-vivo eksperimentell prosedyre utført i rotte som beskrevet i eksempel 4. Den injiserte dosen var 0,0345 mmol Gd/kg. Grafen i fig. 5 viser resultatene som er
25 blitt oppnådd.

Uttrykket som angir [Gd] som en funksjon av tid var:

30

$$[Gd](\text{mmol/l}) = 0,3 e^{-0,0138 t (\text{min})}$$

Hovedfarmakokinetiske parametere var:

35

elimineringshalveringstid = 50 min
areal under kurven $[AUC]_{0-\infty} = 21,7 \text{ mM} \cdot \text{min}$
Distribusjonsvolum = 0,115 l/kg (eller 115 ml/kg)
klaring = 0,00159 l/kg. min

Det var omtrent ingen forskjell mellom resultatene oppnådd med Gd-DTPA-SE og de som ble oppnådd med Gd-DTPA-(SE)₂.

Som i eksempel 4 er elimineringshalveringstiden (50 min) oppnådd for micellene ifølge oppfinnelsen mye lengre, dvs. bedre enn de som ble oppnådd for Gd-DTPA (15 min som $t^{1/2}(\beta)$).

Eksempel 6

Injiserbare sammensetninger ble dannet ifølge eksempel 2, metode (2) ved anvendelse av ¹⁵³Gd radioaktiv isotop. Følgende prepareringer ble dannet:

¹⁵³Gd-DTPA-(SE)₂/DPPA Na/Synperonic F-108

¹⁵³Gd-DTPA-(SE)₂/DPPG Na/Synperonic F-108

¹⁵³Gd-DTPA-(SE)₂/DPPC/Synperonic F-108

Forholdet mellom komponentene 5:10:10 (mg/ml) ble opprettholdt like i de tre prepareringene.

r₁ og r₂ verdiene samt den gjennomsnittlige størrelsesfordelingen var nær opptil verdiene oppnådd i eksempel 3 for de samme forbindelsene.

Prepareringene ble injisert inn i eksperimentelle rotter (omtrent 200 g) i doser på 0,0234 mmol Gd/kg (omtrent 1 ml suspensjon/dyr) og blodprøver ble tatt 10, 30, 60, 90 og 120 min. etter injeksjon. Eksperimentet ble utført på grupper av 3 rotter (en gruppe pr preparering). Radioaktiviteten til prøvene ble målt ved anvendelse av en γ-teller (Packard Minaxi γ). Forandring i konsentrasjonen av Gd i mmol/l i blodet som en funksjon av tid for hver preparering er vist i fig. 6.

Eksempel 7

Injiserbare ¹⁵³Gd-DTPA-(SE)₂/BRJ@78 og ¹⁵³Gd-DTPA-(SE)₂/DPPC/BRJ@78 sammensetninger ble dannet ifølge eksempel 2, metode (1) og metode (2) ved anvendelse av ¹⁵³Gd radioaktiv isotop. Vektforholdet til komponentene i prepareringene var henholdsvis 5:10 og 5:10:10.

Prepareringene ble injisert inn i eksperimentelle rotter i doser på 0,0234 mmol Gd/kg (omtrent 1 ml suspensjon/dyr) og blodprøver ble tatt 10, 30, 60, 90 og 120 minutter etter injeksjon. Radioaktiviteten til prøvene ble målt ved anvendelse av en γ-teller (Packard Minaxi γ). Utfra plottet av forandring i radioaktivitet i prøvene vist i fig. 7 fremgår det

at når preparatene ble dannet med BRIJ®78 er tilstedeværelse av fosfolipid til tross for at det er fordelaktig i lys av høyere relaksivitet og oppholdstid, ikke vesentlig på grunn av at micellene til det overflateaktive middelet og det paramagnetiske komplekset viser tilfredsstillende høy relaksivitet og stabilitet i sirkulasjon.

5

Relaksiviteter $u \text{ (mM.s)}^{-1}$ oppnådd fra de to prepareringene var:

TABELL 5

10

	r_1	r_2
DPPC/BRIJ®78	21,6	21,5
BRIJ®78	18,9	17,6

Det var interessant å merke seg at når det gjelder $^{153}\text{Gd-DTPA}-(\text{SE})_2/\text{BRIJ}^\circ$ hadde 78 preparater størrelsen som miceller og omfatter omtrent $538 \pm 190 \text{ nm}$ dvs. mye høyere enn for preparatene i de foregående eksemplene.

15

Når ovennevnte eksperimenter ble gjentatt med Synperonic® F108 i stedet for Brij® ble det oppdaget at sammensetningene som ble oppnådd var mer stabile dersom fosfolipider var tilstede.

20

Eksempel 8

Injiserbare sammensetninger ble dannet ifølge eksempel 2 (metode 2) ved anvendelse av følgende lipofile chelater:

25

Gd-DTPA-SA	=Gd-DTPA-stearylamid
Gd-DTPA-(SA) ₂	=Gd-DTPA-distearylamid
Gd-DTPA-ME	=Gd-DTPA-myristylester
Gd-DTPA-(ME) ₂	=Gd-DTPA-dimyristylester
Gd-DTPA-OE	=Gd-DTPA-oktylester
Gd-DTPA-(Ad) ₂	=Gd-DTPA-didamantylamid
Gd-DOTA-SE	=Gd-DOTA-stearylester
Gd-DOTA-PE	=Gd-DOTA-palmitylester
Gd-HP-DO3A-SE	=Gd-HP-DO3A-stearoylester

30

r_1 og r_2 verdiene samt gjennomsnittlig størrelsesfordeling som ble målt var innenfor området til verdier oppnådd for Gd-DTPA-SE og Gd-DTPA-(SE)₂ forbindelsene.

5 **Fig. 2 Kilder**

For relaksiviteter til Gd-DTPA, dekstran-(Gd-DTPA), albumin-(Gd-DTPA) & polylysin-(Gd-DTPA) se R.C. BRASH Magnetic Resonance in Medicine 22 (1991) 282-287 og for relaksiviteter for MPEG-polylysin-(Gd-DTPA) se A.A. Bogdanov et al. Radiology 187 (1993) 701-706.

10

15

20 **Patentkrav**

1.

Injiserbar NMR-billeddannende sammensetning omfattende som komponenter av en
25 dispersjon i en fysiologisk akseptabel vandig bærerfase et paramagnetisk metallion og et
chelateringsmiddel som har en lipofil del, k a r a k t e r i s e r t v e d a t
sammensetningen omfatter et fysiologisk akseptabelt ikke-ionisk overflateaktivt middel
eller en blanding av ikke-ioniske overflateaktive midler der det ikke-ioniske
overflateaktive middel er en blokk-kopolymer med polyoksyetylen- og
30 polyoksypropylensegmenter, en polyetylen glykolalkyleter, en
polyoksyetylenfettsyreester, et n-alkylglukopyranosid eller et n-alkylmaltotriosid og
eventuelt en eller flere amfipatiske forbindelser, der komponentene av dispersjonen er i
micelleform.

35 2.

Sammensetning ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t micellene er blandede
miceller med partikkelstørrelse mellom 10 og 800 nm.

3.

Sammensetning ifølge krav 2, karakterisert ved at micellene er blandede miceller med partikkelstørrelse fortrinnsvis mellom 30 og 500 nm.

4.

Sammensetning ifølge krav 3, karakterisert ved at det overflateaktive middelet er Pluronic®, Poloxamer®, Poloxamin®, Synperonic®, BRIJ®, Myrj®, Tween® eller blandinger derav.

5.

Sammensetning ifølge krav 1, karakterisert ved at det overflateaktive middelet er BRIJ®.

6.

Sammensetning ifølge krav 1, karakterisert ved at den amfipatiske forbindelsen er et dialkylglycerofosfolipid hvor alkyl har minst 12 karbonatomer.

7.

Sammensetning ifølge krav 6, karakterisert ved at fosfolipidet blir valgt fra fosfatidinsyre, fosfatidylcholin, fosfatidyletanolamin, fosfatidylserin, fosfatidylglyserol, fosfatidylinositol, kardiolipin og sphingomyelin.

8.

Sammensetning ifølge krav 7, karakterisert ved at fosfolipidet består av en mono-fosfatester av en substituert eller delvis substituert glyserol, minst en funksjonell gruppe av nevnte glyserol er forestret med mettet eller umettet alifatisk fettsyre, eller forestret med mettet eller umettet alkohol, i det de andre to syre funksjonene til fosforsyren er enten frie eller saltbehandlet med alkali- eller jord-alkalimetaller.

9.

Sammensetning ifølge krav 8, karakterisert ved at fosfolipidet er en monofosfat av et fettsyreglycerid valgt fra dimyristoylfosfatidinsyre, dipalmitoylfosfatidinsyre eller diastearoylfosfatidinsyre.

10.

Sammensetning ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den amfipatiske forbindelsen omfatter to eller flere forbindelser valgt fra ioniske og nøytrale fosfolipider, monoalkyl- eller alkenylestere av fosforsyre og/eller kolesterol, ergosterol, phytosterol, sitosterol, lanosterol og tocoferol.

11.

Sammensetning ifølge hvilke som helst av de foregående kravene, k a r a k t e r i s e r t v e d at den lipofile delen til det billeddannende middelet er en C₁ - C₂₄ alkyl- eller alkylengruppe eller substituert eller usubstituert benzyl- eller fenylalkylgruppe.

12.

Sammensetning ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at den lipofile delen til det billeddannende middelet er en karboksylatester av mettet og umettet C₁-C₂₄ alifatisk eller aromatisk alkohol eller er et karboksylatamid av mettede og umettede C₁-C₂₄ alifatiske eller aromatiske aminer.

13.

Sammensetning ifølge krav 12, k a r a k t e r i s e r t v e d at alkoholen er metanol, etanol, propanol, butanol (n-, iso-, tert-), pentanol, heksanol og isomerer, heptanol, oktanol, nonanol, dekanol og isomerer, fettalkoholer, substituerte og usubstituerte benzyl- og høyere fenylalkylalkoholer.

14.

Sammensetning ifølge krav 12, k a r a k t e r i s e r t v e d at aminet er metylamin, etylamin, propylamin, butylamin, (n-, iso-, tert-), pentylamin, heksylamin (og isomerer), heptylamin, oktylamin (og isomerer), nonylamin, decylamin, amidoadamantan, fettaminer og substituerte og usubstituerte benzyl- og høyere fenylalkylaminer.

15.

Sammensetning ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at den lipofile delen til det billeddannende middelet er utstyrt med lipofile hydrofobe grupper koblet til alkylensegmentene til det molekulære skjelettet, til α -karbonet av karboksylatfunksjonene eller til en hydroksylgruppe når tilstede i chelateringsmiddelet.

16.

Sammensetning ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at chelatet blir valgt fra EDTA (etylendiamintetraeddiksyre), DTPA (dietylentriaminpentaeddiksyre), BOPTA (4-karboksy-5,8,11-tris(karboksy-metyl)-fenyl-2-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-oinsyre), DOTA (1,4,7,10-tetraazasyklododecan-1,4,7,10-tetraeddiksyre), DO3A (1,4,7,10-tetraazasyklododekan-1,4,7-trieddiksyre eller 1,4,7-triskarboksymetyl-1,4,7,10-tetraazasyklododekan) og/eller derivater derav.

17.

10 Sammensetning ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det paramagnetiske metallionet velges fra Gd(III), Mn(II), Cr(III), Cu(II), Fe(III), Pr(III), Nd(III), Sm(III), Tb(III), Yt(III) Dy(III), Ho(III) og Er(III).

18.

15 Sammensetning ifølge kravene 1-17, k a r a k t e r i s e r t v e d at vektforholdet mellom lipofilt bileddannende middel og overflateaktivt middel i sammensetningen er mellom 1:10 og 10:1, fortrinnsvis mellom 1:3 og 3:1.

19.

20 Sammensetning ifølge kravene 18, k a r a k t e r i s e r t v e d at vektforholdet mellom lipofilt bileddannende middel og overflateaktivt middel i sammensetningen fortrinnsvis er mellom 1:3 og 3:1.

20.

25 Sammensetning ifølge krav 7-17, k a r a k t e r i s e r t v e d at vektforholdet mellom fosfolipid og overflateaktivt middel er fra 1:10 til 10:1 og fortrinnsvis mellom 1:2 og 2:1.

21.

30 Tørr, pulverformulering, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter som komponenter et paramagnetisk metallion, et chelateringsmiddel med en lipofil del, et fysiologisk akseptabelt ikke-ionisk overflateaktivt middel eller en blanding av ikke-ioniske overflateaktive midler og eventuelt en eller flere amfipatiske forbindelser som ved dispergering i en fysiologisk akseptabel flytende bærer, vil danne en micelledispersjon
35 nyttig som et NMR-billedannende kontrastmiddel for blodmengden.

22.

Injiserbar vandig suspensjon, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter sammensetningene ifølge kravene 1-20 suspendert i en fysiologisk akseptabel flytende bærer nyttig som et NMR kontrastmiddel for blodmengden.

5

23.

Fremgangsmåte for fremstilling av sammensetningen ifølge kravene 1-20, k a r - a k t e r i s e r t v e d følgende trinn:

- 10 a) selektering og suspendering av et kompleks av et paramagnetisk metallion, et chelateringsmiddel omfattende en lipofil del, en eller flere ikke-ioniske overflateaktive midler, og eventuelt en eller flere amfipatiske forbindelser og i en vandig fase for å danne en blanding, og
- 15 b) energetisering av blandingen ved sonikering eller mikrofluidisering for å bringe ingrediensene i intim kontakt og produsere homogen dispersjon av komponentene i micelleform.

24.

- 20 Fremgangsmåte ifølge krav 23, k a r a k t e r i s e r t v e d at etter sonikering eller mikrofluidisering blir blandingen sterilisert og/eller lyofilisert.

25.

- 25 Fremgangsmåte ifølge krav 23 eller 24, k a r a k t e r i s e r t v e d at det overflateaktive middelet tilsettes til blandingen av forbindelsen etter at nevnte energetisering og eventuelt gjentakelse av sonikering eller mikrofluidisering.

26.

- 30 Fremgangsmåte ifølge krav 23, k a r a k t e r i s e r t v e d at den amfipatiske forbindelsen er et fosfolipid bestående av monofosfat av et fettsyreglycerid valgt fra dimyristoylfosfatidinsyre, dipalmitoylfosfatidinsyre eller distearoylfosfatidinsyre.

27.

- 35 Sammensetning ifølge kravene 1-20, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er for anvendelse i NMR billedannelse av blodet i organer i menneske eller dyrelegemet.

28.

Anvendelse av den pulverformige formulering ifølge krav 21 for fremstilling av et MRI-kontrastmiddel.

5

29.

To- komponentsett, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter som førstekomponent en tørrformulering ifølge krav 21 lagret under en inert atmosfære og, som andre komponent, en fysiologisk akseptabel bærervæske som når blandet
10 sammen med den første komponenten tilveiebringer, som en suspensjon av de to komponentene, en injiserbar NMR kontrastsammensetning ifølge kravene 1-20.

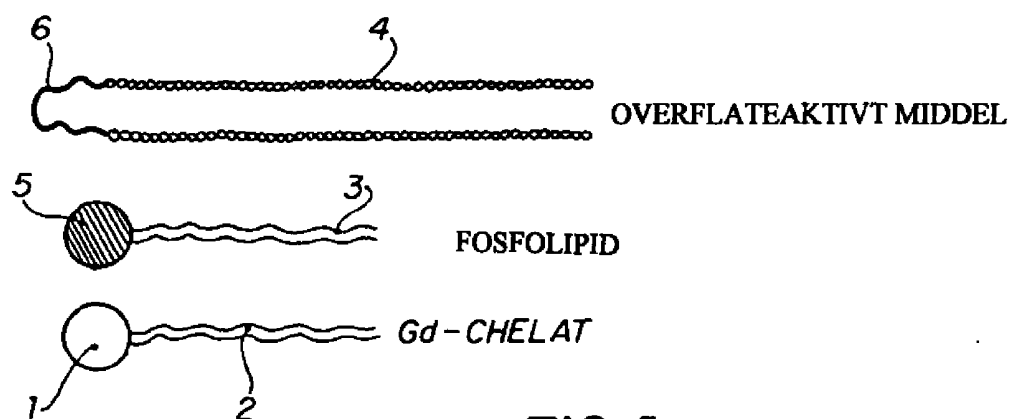
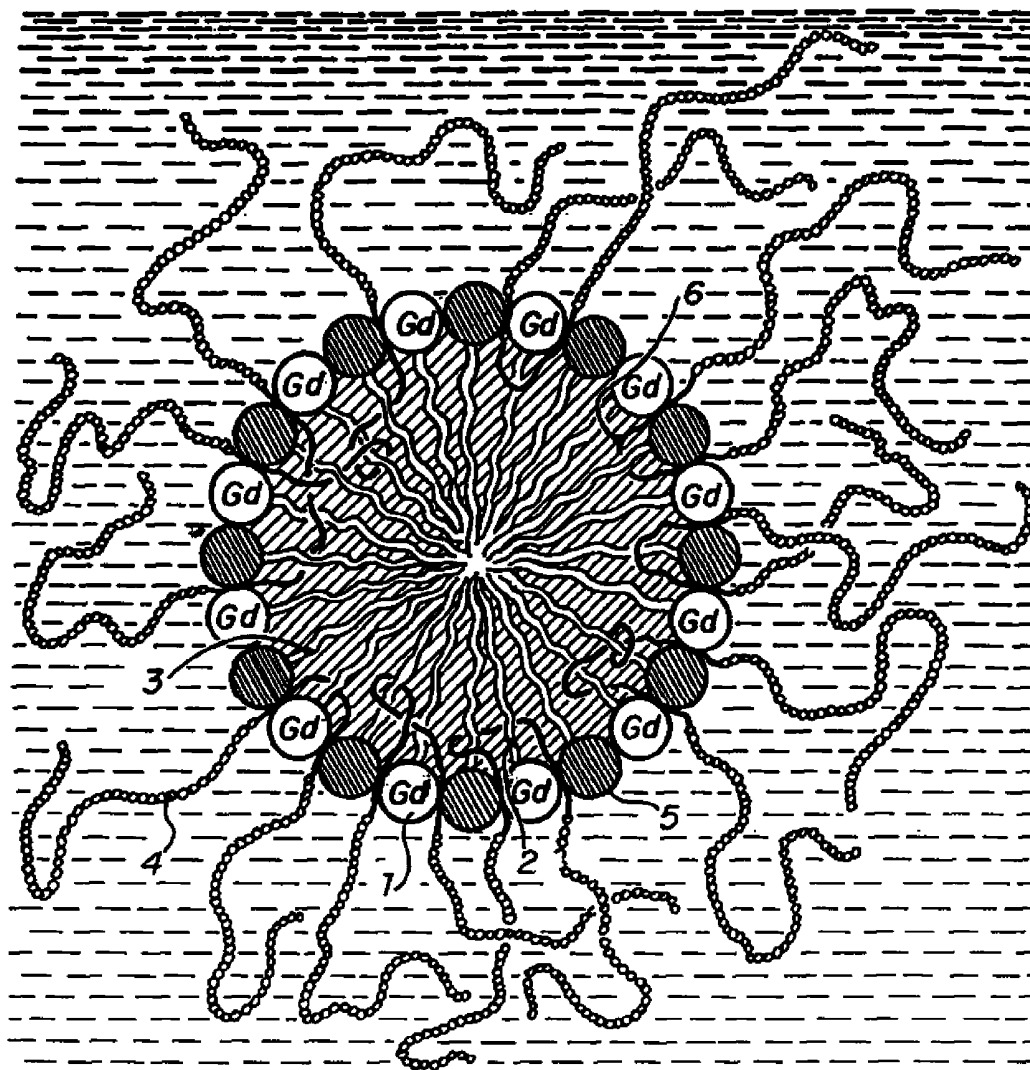


FIG. 1

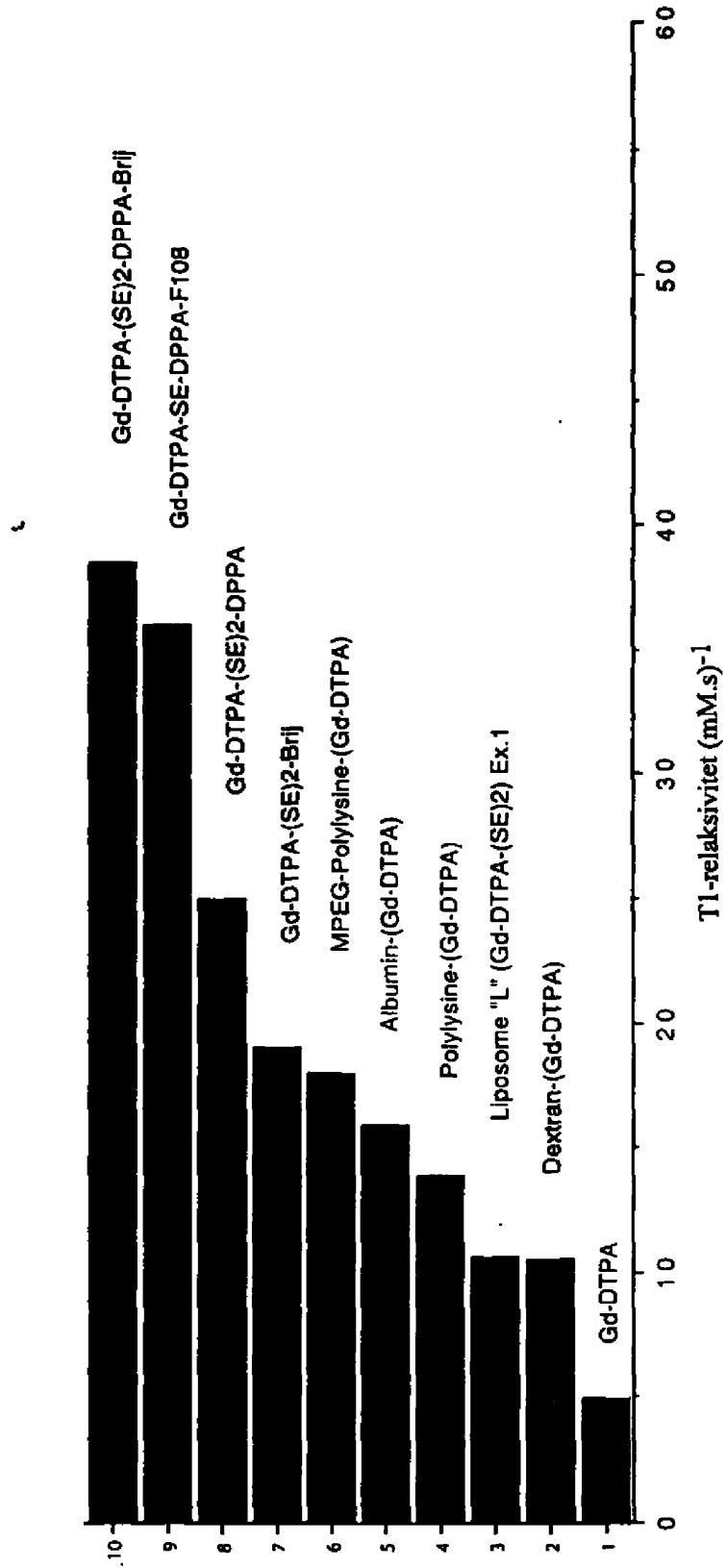


Fig. 2

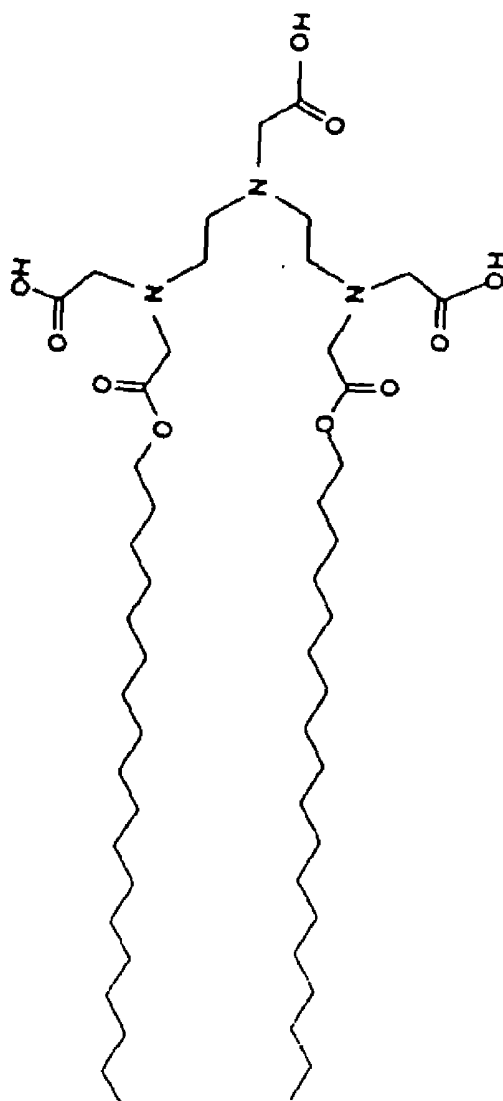


FIG. 3

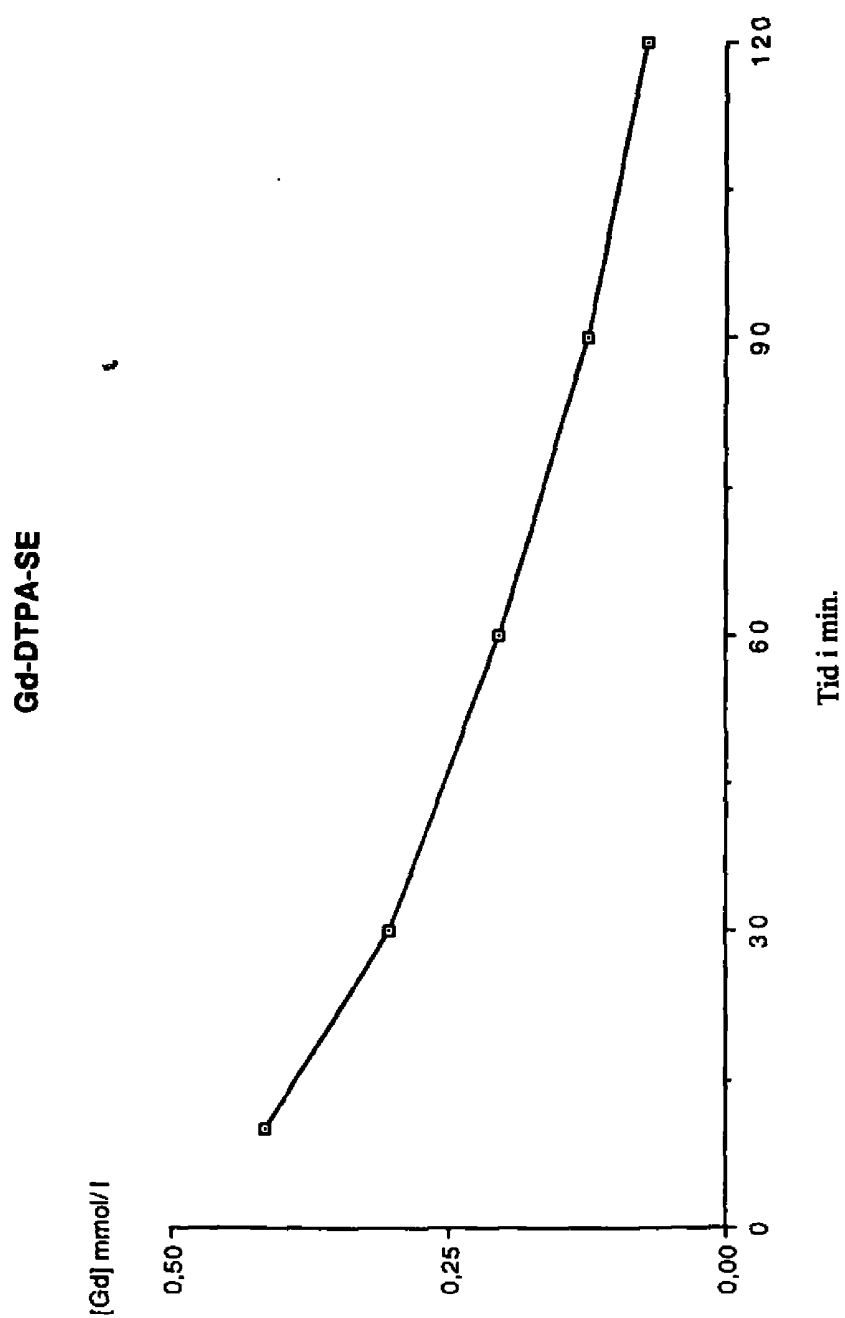


FIG. 4

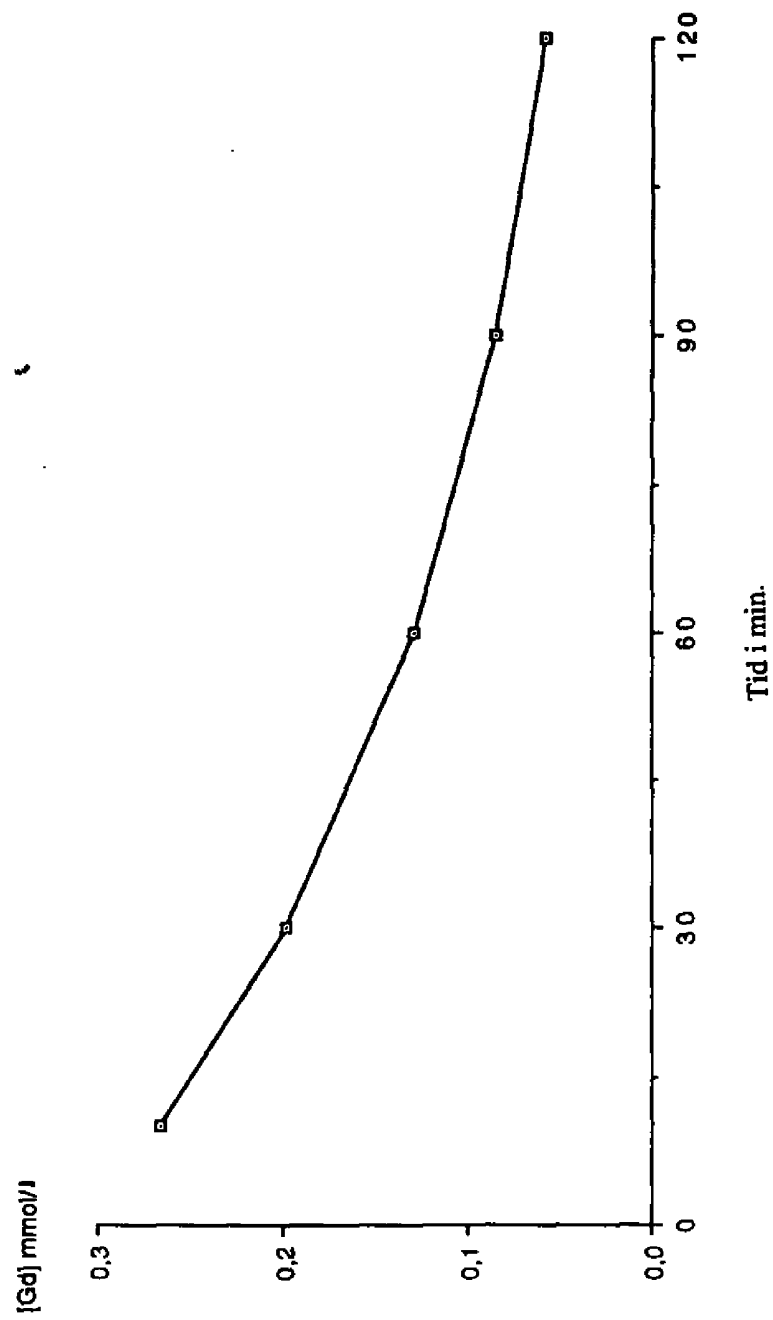


FIG. 5

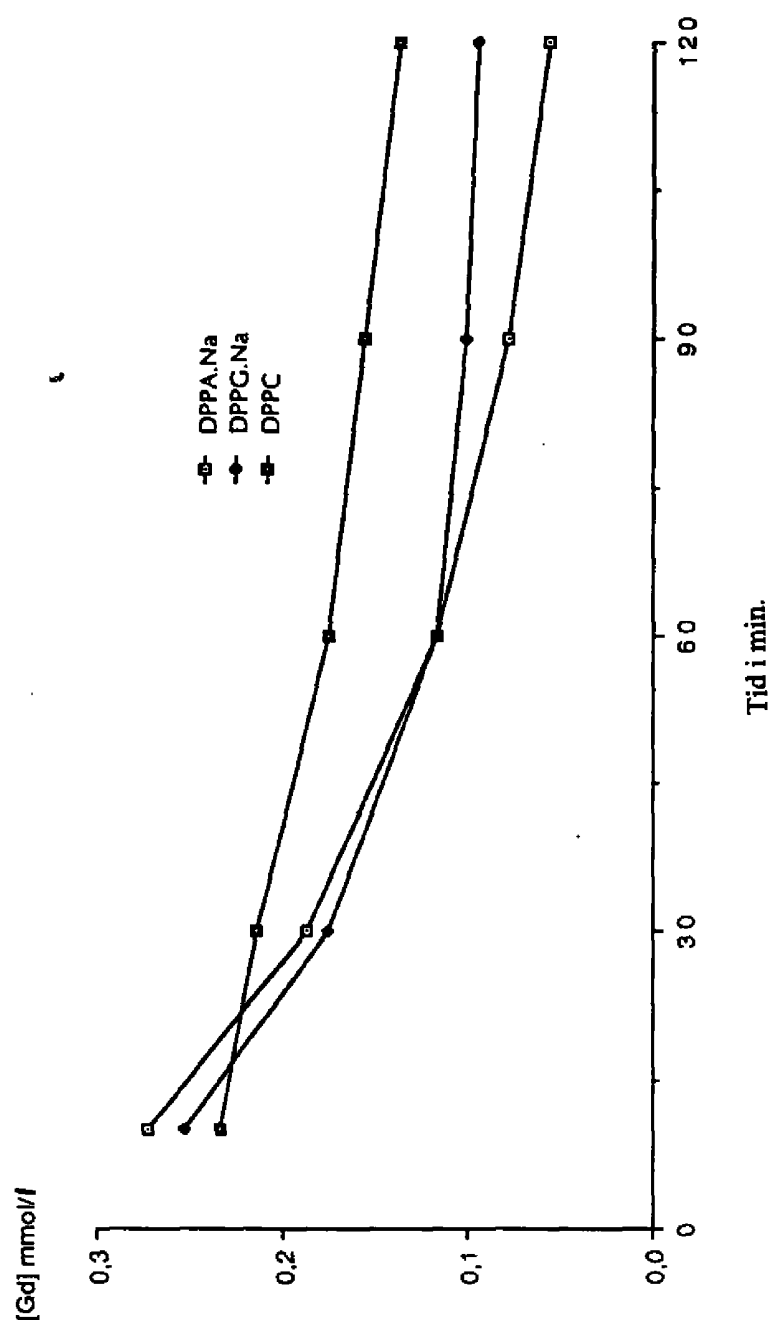


FIG. 6

7/7

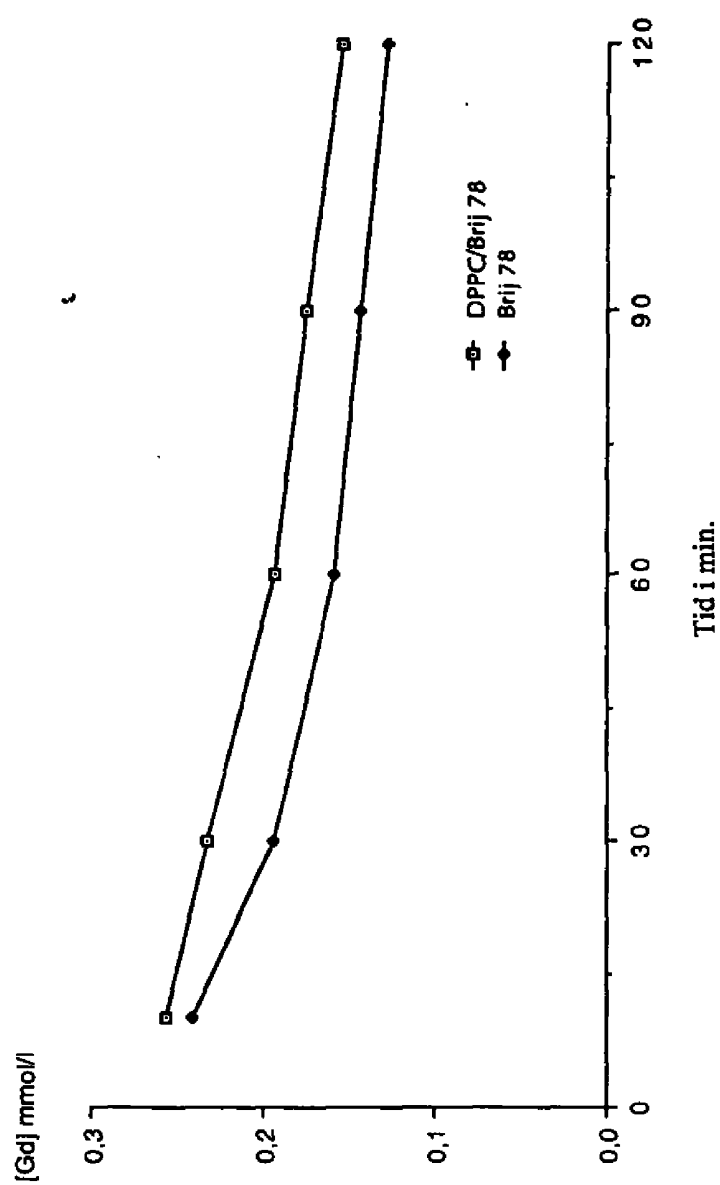


FIG. 7