(12) **PATENT**

(19) NO (11) **303965** (13) B1

NORGE

(51) Int Cl^6 A 61 K 49/00

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19922203	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	13.09.1991, PCT/EP91/01706
(22) Inng. dag	04.06.1992	(85) Videreføringsdag	04.06.1992
(24) Løpedag	13.09.1991	(30) Prioritet	05.10.1990, EP, 90810768
(41) Alm. tilgj.	04.06.1992		
(45) Meddelt dato	05.10.1998		

(73) Patenthaver Bracco International BV, De Boelelaan 7, 2nd Floor, Officia 1, NL-1083 HJ Amsterdam, NL

(72) Oppfinner Claude Giddey, Genève, CH
Georges Dove, Carouge, CH

(74) Fullmektig Bryns Patentkontor AS, 0106 Oslo

(54) Benevnelse **Fremgangsmåte og vandig sammensetning for fremstilling av stabile suspensjoner med hule gassfylte mikrosfærer som er velegnet for ultralydekkografi**

(56) Anførte publikasjoner EP A1 324938

(57) Sammendrag

Viskøs oppløsning med et filmogent protein blir pisket til et skum og skummet er gjenstand for skjær for å redusere størrelsen av skumboblene til et område (ca. 0,5-10 μm) som er velegnet til ekkografi. Proteinene inkluderer animalske og vegetabilske proteiner eller partielle hydrolysater derav med skummende egenskaper. Suspensjonene med mikrosfjærer kan bli stabilisert ved varm eller ved tverr-bindere.

Foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte og en vandig sammensetning for fremstilling av stabile dispersjoner eller oppløsninger med luft eller gassfylte mikrosfærer i vandige væsker som er velegnet til å bli injisert i levende vesener, f.eks. til ultralydekkografi og andre medisinske anvendelser.

Oppfinnelsen angår også sammensetninger som kan være gjenstand for den foregående fremgangsmåten så vel som de ønskede stabile mikrosfære oppløsningene eller suspensjonene som er resultat av å gjennomføre fremgangsmåten.

Det er velkjent at mikrolegemer eller mikroglobuler med luft eller en gass, f.eks. mikrobobler eller mikroballonger, suspendert i en væske er eksepsjonelt effektive ultralyd-reflektorer til ekkografi. I denne beskrivelsen betegner begrepet "mikroboble" spesifikke luft eller gassglobuler i suspensjon i en væske som generelt er resultat av innføring av luft eller en gass i avdelt form. Væsken inneholder fortrinnsvis overflateaktive midler eller tensider for å kontrollere overflateegenskapene og stabiliteten til boblene. Begrepet "mikrokapsel" eller "mikroballong" betegner fortrinnsvis luft- eller gasslegemer med en materialgrense eller omslag, dvs. en polymermembranvegg. Både mikrobobler og mikroballonger er nyttige som ultralydkontrastmidler. For eksempel vil injisering i blodstrømmen hos levende organismer av suspensjoner med gassmikrobobler eller mikroballonger (i området fra 0,5 til 10 μm) i en flytende bærer, i stor grad forsterke ultralydekkografibilleddannelsen, og hjelper således til i visualisering av de indre organene. Avbildning av kar og indre organer kan i stor grad være til hjelp i medisinsk diagnose, f.eks. ved påvisning av kardiovaskulære og andre sykdommer.

Dannelse av suspensjoner med mikrobobler i en injiserbar flytende bærer som er velegnet for ekkografi kan bli fremstilt ved frigjøring av en gass oppløst under trykk i

denne væsken, eller ved en kjemisk reaksjon som genererer gassformige produkter, eller ved å blande med den flytende bæreren eller uoppløselige faste stoffer som inneholder luft eller gass som er inneholdt eller adsorbert deri.

I US-A-4.446.442 (Schering) blir det f.eks. beskrevet en serie med forskjellige teknikker for å fremstille suspensjoner med gassmikrobobler i en sterilisert injiserbar flytende bærer ved å anvende (a) en oppløsning av tensid (overflateaktivt middel) i en flytende bærer (vandig) og (b) en oppløsning av en viskositetsforbedrer som stabilisator. For generering av boblene blir det beskrevet en teknikk ved å presse ved høy hastighet en blanding av (a), (b) og luft gjennom en smal åpning; eller (a) i (b) kort før anvendelse sammen med en fysiologisk aksepterbar gass; eller tilsetning av en syre til (a) og et karbonat til (b), begge komponentene blir blandet sammen rett før anvendelse og syre reagerer med karbonatet for å generere CO2 bobler; eller tilsetning av en over-trykkpålagt gass til en blanding av (a) og (b) under laging, nevnte gass blir frigjort i mikrobobler over tid når blandingen blir anvendt til injeksjon.

EP-A-131 540 (Schering) beskriver fremstilling av mikroboble-suspensjoner der en stabilisert injiserbar bæreväske, f.eks. en fysiologisk vandig oppløsning av salt, eller en oppløsning av et sukker slik som maltose, dektrose, laktose eller galaktose, blir blandet med faste mikropartikler (i 0,1 til 1μm område) av samme sukker som inneholdt luft. For å utvikle suspensjonen med bobler i den flytende bæreren, blir både væske og faste stoffkomponenter ristet sammen under sterile betingelser i noen få sekunder, og med en gang den er laget må suspensjonen bli anvendt umiddelbart. Den må bli injisert i løpet av 5-10 minutter til ekkografiske målinger; men fordi de er kortvarig, blir boblekonsentrasjonen for lav til å kunne praktiseres etter den perioden. Således er et kritisk problem ved anvendelse av mikrobølgeoppløsninger til

injeksjon mangel på stabilitet over tid. Foreliggende oppfinnelse foreslår å unngå denne ulempen.

Et annet problem med mikrobobler til ekkografi etter injeksjon er størrelse. Det er vanlig at mikrobobler med nyttig størrelse som tillater overføring gjennom små blodkar er i området fra ca. 0,5 til 10 μm; med større bobler er det risiko for klumpdannelse og etterfølgende emboli. For eksempel blir i boblesuspensjonene beskrevet i US-A-4.446.442 (Schering) der vandige oppløsninger med overflateaktive midler slik som lecitin, estere og etere av fettsyrer og fettalkoholer med polyoksyetylen og polyoksyetylerte polyoler som sorbitol, glykoler og glyserol, kolesterol eller polyoksy-etylen-polyoksypropylenpolymerer, kraftig ristet med oppløsningene med viskositetshevende og stabiliserende forbindelser slik som mono- og polysakkarider (glukose, laktose, sukrose, dekstran, sorbitol), polyoler f.eks. glyserol, polyglykoler; og polypeptider som proteiner, gelatin, oksypolygelatin og plasmaprotein, der bare ca. 50% av mikroboblene er under 40-50 μm som gjør slike suspensjoner uegnede i mange ekkografiske anvendelser. Foreliggende oppfinnelse muliggjør å omgå dette problemet ved mekanisk redusering av størrelse på boblene.

I et forslag på å overvinne noen av de foregående manglene, særlig forsvinningsproblemet, har mikroballonger, dvs. mikrosfærer med en materiell vegg, blitt utviklet. Selv om mikroboblene som tidligere nevnt bare har et immaterielt eller forsvinnende omslag, dvs. de er bare omgitt av en vegg med væske hvis overflatespenning blir modifisert ved tilstedeværelse av et overflateaktivt middel, har mikroballongene eller mikrokapslene et håndgripelig omslag laget av et substansmateriale, f.eks. en polymerisk membran med bestemt mekanisk styrke. Med andre ord er de mikrosfærer av et materiale der gass eller luft er mer eller mindre tett innkapslet.

For eksempel beskriver US-A-4.276.885 (Tickner et al.) anvendelse av overflatemembranmikrokapsler som inneholder en gass for å forbedre ultralydbilder, membranen inkluderer en lang rekke ikke-toksiske og ikke-antigeniske organiske molekyler. I en beskrevet utførelsesform har disse mikroboblene en gelatinmembran som motstår sammenvoksing og deres foretrukkede størrelse er 5-10 μm. Membranen til disse mikroboblene sies å være tilstrekkelig stabile for å lage ekkografiske målinger; imidlertid blir det også sagt at etter en tidsperiode vil gassen som er inneholdt oppløses i blodstrømmen og boblene vil gradvis forsvinne. Dette skyldes sannsynligvis langsom oppløsning av gelatin. Således er det aktuelle problemet ikke fullstendig løst ved denne teknikken og før anvendelse, blir mikrokapslene holdt i gelatinoppløsninger der de er lagringsstabile. Gelatin trengs å bli oppvarmet og smeltet for å bli flytende på det tidspunktet suspensjonen blir anvendt for å gjøre injeksjoner og dette er uhensiktsmessig.

Mikrosfærer med forbedret lagringsstabilitet selv om de er uten gelatin er beskrevet i US-A-4.718.433 (Feinstein). Disse mikrosfærene er laget ved sonikering (5 til 30 KHz) av proteinoppløsninger som 5% serumalbumin og har diametere på 2-20 μm område, hovedsakelig 2-4 μm. Mikrosfærene er stabilisert ved denaturering av membrandannede protein etter sonikering, f.eks. ved anvendelse av varme eller ved kjemiske anordninger, f.eks. ved reaksjon med formaldehyd eller glutaraldehyd. Konsentrasjonen av stabile mikrosfærer som ble oppnådd i denne teknikken sies å være ca. 8 x 10^6/ml i området 2-4 μm, 10^6/ml i 4-5 μm området og mindre enn 5 x 10^5 i 5-6 μm området. Stabilitetstiden til disse mikroatmosfærene sies å være 48 timer eller lengre og de muliggjør bekvem avbildning av venstre hjerte etter intravenøs injeksjon. Sonikerte albuminmikrobobler når de er injisert i en periferivene har f.eks. evne til transpulmonær passering. Dette resulterer i ekkokardiografisk opasifisering av venstre ventrikkelhulrom så vel som myokardioalvev.

Ytterligere forbedrede mikroballonger til injeksjon ved ultralydekkografi har blitt rapportert i EP-A-324.938 (Widder). I dette dokumentet blir det beskrevet høye konsentrasjoner (mer enn 10^8) med luft-fylte protein-bundne mikrosfærer på mindre enn 10 µm som har levetid på flere måneder eller mer. Vandige suspensjoner av disse mikroballongene blir fremstilt ved ultralydhuldannelse av oppløsninger med varmedenaturerbare proteiner, f.eks. humant serumalbumin, der operasjonen også fører til en grad av skumming av det membran-dannede protein og dens etterfølgende hardgjøring ved oppvarming. Andre proteiner slik som hemoglobin og kollagen sies å være passende i den refererte prosessen, men dette stemmer ikke med vår erfaring.

Den høye lagringsstabiliteten av suspensjonene med mikroballonger er beskrevet i EP-A-324.938 muliggjør at de blir forhandlet slik de er, dvs. med flytende bærefase. Dette er et sterkt kommersielt aktivum siden fremstilling før anvendelse ikke er lenger er nødvendig. Den ekstreme styrken og stabiliteten til membranmaterialet har imidlertid noen ulemper: f.eks. på grunn av deres rigiditet, kan membranene ikke stå i mot plutselige trykkvariasjoner som mikrosfærene kan være utsatt for, f.eks. ved transport gjennom blodstrømmen, disse trykkvariasjonene skyldes hjerteaktiviteter. Under praktisk ultralydundersøkelser vil således en del av mikrosfærene bli ødelagt og det gjør reproduserbarheten av bildene vanskelig. Videre er det kjent at mikrosfærer med fleksible vegger er mer ekkogeniske enn tilsvarende mikrosfærer med rigide vegger.

Når det videre gjelder injeksjoner vil omfattende stabilitet av materialet som danner veggene til mikrosfærene senke bionedbrytbarheten av organismene som undersøkes og kan resultere i et metaboliseringsproblem. Således er det mest hensiktsmessig å utvikle trykkvedvarende mikroballonger som er bundet av en myk og elastisk membran som temporært kan bli

deformert under trykkvariasjoner og som innebærer øket ekkogenisitet.

Fremgangsmåten ved fremstilling av mikroballongsuspensjoner som er beskrevet i EP-A-324.938 innbefatter totrinns sonikering av humant serumalbumin (HSA). I det første trinnet blir sonikering av noen få ml fortynnet oppløsning protein gjennomført i et smalt rør med sonikatorhodet senket deri; i det andre trinnet blir sonikering gjennomført ved at sonikatorhodet blir hevet over oppløsningsnivået hvorved det dannes skum. Deretter blir den sonikerte oppløsningen satt til side over natten til dekantering og mikroballonger som samles i det øvre laget oppsamles (flyt-separasjon).

Denne fremgangsmåten er ganske komplisert, langvarig og videre tilpasset til å behandle proteinoppløsninger med små økninger (side 4, linje 9 i EP-A-324.938). Således er den tydeligvis ikke velegnet for å oppnå større mengder mikroballonger som er nødvendig i industriell produksjon.

Fremgangsmåte og sammensetning av foreliggende oppfinnelse med skumming av en proteinoppløsning og mekanisk reduksjon av skumboblene til ønsket størrelse, dvs. ved anvendelse av skjæring, forekommer sekvensielt eller i det vesentlige samtidig, vil overvinne de foregående ulempene (se patentkravene). Det var meget overraskende og uventet at under visse betingelser som er definert senere, kan størrelsen på boblene i en vandig suspensjon bli redusert til et ønsket verdiområde uten betydelige brudd på boblene og tap av bobletall.

I korthet består fremgangsmåten av å omdanne til et skum en vandig oppløsning av minst et filmogent protein, valgfritt i nærvær av et skummingsmiddel, dvs. skaffe tilveie en dispersjon av luft eller gassbobler i denne oppløsning, og deretter eller samtidig redusere størrelsen på nevnte boble (vanligvis i et første område på 100 µm eller mer) til en

ønsket verdi, vanligvis i 0,5-10 µm området, fortrinnsvis 4-10 µm, dette blir oppnådd ved å utsette skummet for høy skjærkraft, ved å presse det gjennom små åpninger eller passasjer under mekanisk eller gasstrykk, der nevnte passasjer valgfritt inneholder plateanordninger for å øke skjæreffekten.

Mer spesifikt angår oppfinnelsen en fremgangsmåte for fremstilling av stabile vandige suspensjoner med luft eller gassfylte mikrosfærer eller mikroballonger som er velegnet til ultralydanvendelser i levende organismer, nevnte mikrosfærer har en membran av minst ett filmogent protein, kjennetegnet ved at man omdanner en viskøs vandig oppløsning av nevnte protein til et skum med luft eller gassfylte bobler ved å piske med luft eller en farmasøytisk aksepterbar gass og samtidig eller etterfølgende å utsette den skummende oppløsningen for høy skjærkraft ved å presse den gjennom smale åpninger eller kanaler som valgfritt inneholder avbøyende anordninger i et tidsrom som er tilstrekkelig til å redusere størrelsen på boblene i skummet til verdier i området fra 0,5 - 10 µm velegnet for injeksjon, og at suspensjonen eventuelt blir fortynnet, oppvarmet og/eller frysetørket.

Fremgangsmåten kan bli gjennomført ved hjelp av en homogenisator-emulgeringsapparatur eller ved å sende suspensjonen gjennom et medium, mineral eller organisk frembrakt med et nettverk av plater eller fordreide kanaler, f.eks. kan materialet være et meget grovt porøst materiale. Porøse mineralmedier innbefatter filtreringshjelp som sjikt av mineralpartikler av varierende størrelse eller keramiske filtre. Organiske medier inkluderer filtreringsskjermer som er velkjent innenfor fagområdet. Det må bemerkes at under bobbelstørrelsesreduksjon ved passering gjennom platekanaler, bør skjæreffekten bli påført i økende styrke, dvs. behandlingen bør bli anvendt suksessivt bare til små porsjoner av skummet; påføring av skjærkrefter til større skumpor-

sjoner, dvs. å utsette nevnte porsjoner for for mye trykk, kan ganske enkelt før til temporær boblestørrelsereduksjon ved sammenpressing og endelig opprettelse av opprinnelig boblestørrelse ved trykkfrigjøring. Som det fremkommer kan skumming og boblestørrelsesreduksjon bli gjennomført samtidig ved å anvende en velegnet homogenisator-emulgerer som sekvensielt gjennomfører både skummings- og størrelsesreduksjon i en operasjon.

Proteinoppløsningen som skal være gjenstand for skumming omfatter ca. 0,1-10 vekt-%, fortrinnsvis 0,1-5%, mest å foretrekke 0,2-4,9% av et filmogent protein, dvs. et protein som når det er i oppløsning kan bidra til dannelse av en film rundt boblene med skummet, en slik film er tilstrekkelig stabil mot å kollapse under mekanisk virkning av homogenisatoren under boblestørrelsesreduksjon. Proteiner som tilfredsstiller de foregående kravene er mange og innbefatter humant serumalbumin (HSA), bovint og ovint serumalbumin (BSA og OSA), eggalbumin, hemoglobin, fibrinogen, globuliner, kollagen, gelatin, skummende proteiner slik som hydrolyserte vegetabilske proteiner, hydrolysert fraksjon av gluten (Hyfoama), hydrolysert kasein og lignende. Når proteinet ikke har noe eller bare små interne skummende egenskaper, kan et skumdannende middel eventuelt bli tilsatt, f.eks. et fysiologisk aksepterbart overflateaktivt middel. Det eksisterer en lang rekke velegnede overflateaktive midler som f.eks. "Tweens", "Spans" og lignende, men fremgangsmåten er ikke begrenset til disse.

Oppløsningen inneholder også 40 til 80 vekt-% av minst en vannoppløselig polyolviskositetsforbedrer, og mengden av denne er tilstrekkelig til å bidra til en viskositet i området fra 100-600 cP. Viskositetsforbedrerne innbefatter fortrinnsvis polyoler med minst 4 hydroksygrupper pr. molekyl og med tilstrekkelig vannoppløselighet til å oppnå de forannevnte konsentrasjonsverdiene. Med lavere konsentrasjoner blir det oppnådde skummet generelt for tynt, mens med

høyere konsentrasjoner er viskositeten generelt for høye for effektiv homogenisering og boblestørrelsesreduksjon. Foretrukkede viskositetsforbedrere inkluderer dekstran, polydekstrose, glukose, fruktose, maltose, maissirup, sukkersirup (blandinger av sukkermonomerer og oligomerer), partielle hydrolysater av karbohydrater (f.eks. stivelse), syntetiske polymerer av sukkeret som glukose og fruktose, reduserte sukkere som sorbitol, mannitol og lignende, polyglyserol med minst 4 glyserolenheter og andre tilsvarende polyoler med tilstrekkelig oppløselighet i vann. Bemerk at sukrose ikke kan bli anvendt alene på grunn av utilstrekkelig viskositet: det kan imidlertid bli anvendt i kombinasjon med andre mer oppløselige sukkere som glukose eller fruktose. Gitt at viskositetsparameteren til oppløsningen som skal bli skumdannet ikke er tilstrekkelig, har det for å bedre lagringsstabiliteten til boblene blitt funnet at en foretrukket kombinasjon av effektiv viskositet og forøker konsentrasjon resulterer ved anvendelse av blandinger med karbohydrater med lav Mw (~180) og gjennomsnittlig molekylvekt (~300 til 2000). En lang rekke stivelseshydrolysater faller innenfor denne kategorien. Blant polysakkaridene foretrekker man i foreliggende oppfinnelse og blant polysakkaridene foretrekkes det i oppfinnelsen de som er kommersielt tilgjengelig blant annet: polydektrose N fra Pfizer i USA eller Storbritannia; stivelseshydrolysater forhandlet under navnet Mylose CN, Mylose HM-43-38-250 fra Amylum, Belgia, eller Flolys B-6080S fra Roquette, Lestrem, Frankrike; høyfruktosemaissiruper forhandlet under navnene SOS-LU eller SIR-O-SWIT RE fra Amylum.

Homogenisatorapparaturen anvendt i foreliggende fremgangsmåte kan ha et hvilket som helst kommersielt tilgjengelig hode forutsatt tilstrekkelige skjærekrefter for å redusere størrelsen på boblene til det ønskede området på ca. 0,5-10 µm. Når skumming og boblestørrelsesreduksjon blir gjennomført samtidig, dvs. i en operasjon, frembringer et foretrukket emulgeringshode samtidig høy kuttehastighet, luft eller

gassaspirering og flytende sirkulasjon gjennom aperturen muliggjør størrelse som kontrollerer boblenes endelige størrelse. Mange emulgeringshoder tilgjengelig innenfor matvareindustrien (f.eks. POLYTRON) er velegnede. Et rørformig emulgeringsmiddelhode med aksial kutter og perifere longitudinale spalter med ca. 1,5 mm bredde har gitt utmerkede resultater.

I en typisk operasjon i foreliggende oppfinnelse blir en 0,2-1% HSA-oppløsning som inneholder 65 vekt-% polydekstrose (PFIZER), viskositet ca. 400 cP ved 20°C, osmolalitet ca. 3 osmol, skummet og homogenisert med et POLYTRON 20 TS emulgeringshode i 0,2-5 minutter ved 10-15000 rpm. Dette resulterte i en skum- eller bobledispersjon med ca. 10^8 - 10^9 mikrobobler (0,5-5 μm) pr. ml som var meget stabile i flere uker (ingen betydelig tellingsendring). Denne dispersjonen ble for viskøs til å bli injisert direkte i ekkografiske målinger, og etter valgfritt å ha latt den stå ved romtemperatur i en tidsperiode (f.eks. 10-20 timer) ble den fortynnet 1:10 til 1:15 med 0,01-0,1% glutaraldehydoppløsning. Etter fortynning var konsentrasjonen fremdeles i området fra 10^7-10^8 men viskositeten var bare noen få cP og oppløsningen var velegnet til injeksjon og ekkografiske målinger. Den fortynnede oppløsningen var så stabil i minst flere uker.

Alternativt kan glutaraldehyd (eller et hvilket som helst annet farmasøytisk aksepterbart tverr-bindingsmiddel) også bli anvendt i utgangssammensetning før skumdannelse. Andre tverr-bindende midler inkluderer sulfider som cystein, acetylcystein, markaptoetanol, etandisulfid; karbodiimider, polyisocyanater; polyacider og anhydrider som maleinanhydrider; og karbohydratpolyestere som estere av sukrose eller glukose med lavere alifatiske syrer eller fettsyrer. Stabilisasjon kan også bli oppnådd ved å anvende en 1-10% BSA- eller HSA-oppløsning til fortynning. Hvis ønskelig kan naturligvis stabilisering også bli gjennomført ved forsiktig

regulering av oppvarming i noen få sekunder til noen få minutter i et temperaturområde på ca. 60-120°C, fortrinnsvis i et område fra ca. 65-80°C. Den eksakte verdien avhenger av graden av proteinhardgjøring som er ønskelig.

I skumoperasjonen presser emulgeringsrotoren oppløsningen som skal bli skummet (eller skummet hvis bobler må bli redusert) gjennom perifere spalter av det rørformige hodedekket og samtidig suges luft inn (eller en gass) fra omgivelsene ved dannelse av en sentral flytende vorteks. Dette skaffer tilveie en intens væske/luftblandende virkning og en sterk skjæreffekt som reduserer boblestørrelsen i skummet. Naturligvis kan luft bli erstattet med en hvilken som helst fysiologisk aksepterbar gass, f.eks. N_2, Ar og andre edle gasser, N_2O, hydrokarbondamp, CH_4 og lignende.

Hvis oppløsningen først blir skummet og størrelsen på boblene i skummet etterfølgende blir redusert som angitt, kan skumoperasjonen bli gjennomført ved å anvende en hvilken som helst konvensjonell blander eller piskeutstyr. For eksempel omfatter en apparaturutførelsesform en pyreksreaktor med en bunnuttømming utstyrt med en kjølekappe for temperatur-regulering, en bladrister for rotasjon av sammensetningen før og etter skumdannelse, et kutte-knusehode for å fremskaffe skjær- og effektskumming, homogenisering og boblestørrelses-reduksjon. Sterilisering av ingrediensene kan bli gjennomført direkte i reaktoren. Vanligvis innbefatter operasjonen med den foregående reaktoren fortrinnsvis følgende trinn:

1) Anbringelse av sukkeroppløsningen (f.eks. oppløsningen av polydekstrose eller mais-sirup) i reaktoren.

2) Starting av bladmikseren.

3) Valgfri sterilisering av oppløsningen ved varme.

4) Innføring av albuminoppløsning (sterilisert på forhånd).

5) Starting av skum- og boblestørrelsesreduserende hode. Forsiktig regulering av temperaturen under proteindenatureringstemperaturen ved hjelp av kjølekappe.

6) Tilsetning av en meget liten mengde tverr-binder.

7) Avkjøling med langsom omrøring.

8) Tillate henstand i en tidsperiode ved omgivelsestemperatur.

9) Uttømming av suspensjonen gjennom bunnåpningen.

Under skumdannelse er operasjonstemperaturen til å begynne med ved omgivelsestemperatur, og i lys av den varmen som blir utviklet av skjærkreftene i homogenisering, blir den fortrinnsvis regulert, særlig ved boblereduksjonstrinnet, slik at den ikke overskrider verdiene som kan forårsake proteindenaturering og omfattende klargjøring av mikrosfæreveggene. Vanligvis er det foretrukket å beholde temperaturen under 50°C, fortrinnsvis under 35-40°C. Hvis temperaturen stiger til nivåer der denaturering forekommer, vil utbytte bli sterkt påvirket. Homogeniseringstiden som er involvert kan være fra ca. en brøkdel av et minutt til flere minutter, dvs. 5-10 minutter og dette er avhengig av mengden med materiale som blir anvendt. Det må bemerkes at selv om for høye temperaturer på grunn av skjærenergi kan være skadelig under skum- eller boblestørrelsesreduksjon, kan den avsluttende suspensjonen med mikrobobler bli oppvarmet hvis ønskelig til temperaturer over 50°C uten skadelig effekt. Oppvarming av den avsluttede boblesuspensjonen, enten før eller etter fortynning, vil påvirke progressiv hardgjøring av de filmogene proteinene som lager bobleveggene. Denne endringen bidrar til bobleegenskaper og deres stabilitet over tid under lagring. Oppvarming i noen få sekunder til noen få

minutter, f.eks. ved 60-120°C vil forårsake at proteinet blir hardere ved denaturering.

Det har videre blitt funnet at den fortynnede, klar-til-bruk injeksjonsoppløsningen kan bli eksikatorbehandlet til et tørt fast stoff ved konvensjonelle teknikker med frysetørking. Dette faste stoffet kan bli lagret i en uendelig tidsperiode under tørre betingelser uten endring av den opprinnelige injiserbare suspensjonen og kan bli regenerert integralt (uten tap av bobler) ved enkel tilsetning av en tilsvarende vannmengde eller en fysiologisk aksepterbar væske som er utformet til injeksjoner. Når det gjelder vann som blir anvendt for å skaffe tilveie de injiserbare mikrosfæresuspensjonene, må det bemerkes at fullstendig avgassede typer (som destillert vann) må unngås for tap av boblestabilitet. De foretrukkede vanntypene for å gjennomføre skumfortynning må være sterile men luftbehandlet; ordinært vann fra kran eller naturlig mineraldrikkevann er meget velegnet. Det synes at en mindre andel av oppløste mineraler (som normalt er i vann som er tilgjengelig i kommunale vannverk) hjelper i å stabilisere boblene i suspensjonene under lagring.

De følgende eksemplene illustrerer oppfinnelsen i detalj. I eksemplene er viskositetsverdiene målt ved 25°C med en HAAKE spinningsviskometer, hode ME-30 (1-1000 cP avhengig av spinnhastiget); boblekonsentrasjonene ble målt med et hematocytometer som omfatter en mikroskopspalt med gitter, tellearealet er 1 x 1 mm, 100 µm tykkelse (0,1 µl). Oppløsningen som skal bli talt var fortynnet på forhånd slik at man tillot ca. 50-100 bobler i tellearealet. Alternativt ble en konvensjonell Coulter-teller anvendt.

Boblestørrelse og størrelsesfordeling ble målt med en MALVERN Mastersizer apparatur; dette er basert på å rette en kalibrert stråle med monokromatisk lys (laserstråle) til en celle som holder suspensjonen som skal bli undersøkt og måling av parametrene med diffraksjonsmønstre.

Eksempel 1

Bovint serumalbumin ble oppnådd som den vanlige kommersielle 5% oppløsningen og den ble fryse-tørket for å gi et fritt-strømmende blekt gult pulver.

Fast BSA ble oppløst i vann og dette ga en 20 vekt-% oppløsning (forrådsoppløsning).

En sammensetning med 65 vekt-% viskosifiseringsmiddel ble laget ved å blande sammen 300 g av en 70 vekt-% vandig polydekstroseoppløsning (PFIZER), 18 g vann, 6 g av den foregående forrådsoppløsningen og 0,3 g glutaraldehyd. Viskositeten ved 25°C var 460 cP. Et polytronemulsjonshode med 1,5 mm spalter ble senket i sammensetningen og skumming pluss emulgering ble gjennomført i ca. 1/2-1 minutt ved romtemperatur (20-25°C) uten avkjøling. Emulgeringsenergien hevet temperaturen til ca. 30-35°C. Dette resulterte i en mikroboblesuspensjon som inneholder ca. 10^9 bobler/ml (Coulter Counter), der de fleste boblene er i området 1,5-2 µm (Malvern). Viskositeten var i det vesentlige den samme som den i utgangsoppløsningen, derfor ble fortynning med vann (1:13) eller saltvann gjennomført for å gi en lett injiserbar væske med ca. 7,7 x 10^4 bobler/mm^3 (viskositet ca. 5-10 cP).

Ekkogeniske målinger ble gjennomført med puls-ekkosystem som besto av en pleksiglassprøveholder (diameter 30 mm) med et 20 µm tykt Mylar-akustisk vindu, en transduserholder nedsenket i et vannbad med konstant temperatur, en puls-mottaker (Accutron M3010JS) med en ekstern forforsterker med en fast forsterkning på 40 dB og en intern forsterker med forsterkning justerbar fra -40 til +40 dB og utskiftbare 13 mm ufokuserte transdusere. En 10 MHz lav-passfilter ble innsatt i den mottagende delen for å forbedre signal/støyforholdet. A/D-kortet i IBM PC var en Sonotek STR 832. Målingene ble gjennomført ved 7,5 MHz.

Ekkogeniske verdier i området 0,02 ble oppnådd med forannevnte fortynningen. Etter ytterligere fortynning i et forhold på ca. 10^{-2} til 10^{-3}, ble ekkogeniske verdier i området fra 0,04-0,06 observert.

Identiske resultater ble oppnådd hvis i det foregående eksemplet bovint serumalbumin (BSA) ble erstattet med en identisk mengde humant serumalbumin (HSA).

Eksempel 2

Tre hundre gram modifisert maissirup (SIR-O-SWIT LU som i det vesentlige består av glukose, fruktose, maltose og mindre mengder andre sukker) fra AMYLUM Company, Belgia, med 70 vekt-% sukker (tetthet = ca. 1,45) ble blandet med 6 g vandig 20% HSA og 18 g vann. 25°C viskositeten var ca. 420 cP. Oppløsningen ble skummet og emulgert under en atmosfære av nitrogen i 3 minutter med et POLYTRON emulgeringshode, temperaturen ble holdt under 40°C for å forhindre hardgjøring og vann-uoppløseliggjøring av protein ved denaturering.

Etter homogenisering ble suspensjonen fortynnet til ca. 1/10 med vann som inneholder 0,07% formaldehyd og talt for boblekonsentrasjon (funnet ca. 5 x 107/ml av fortynnet suspensjon). Boblestørrelsesfordelingen var 80% i 0,5-3 µm området (viskositet noen få cP). Både konsentrert og fortynnede boblesuspensjoner var stabile i minst 4 uker uten noen signifikant bobletallendring.

Eksempel 3

Fremgangsmåten i tidligere eksempler ble gjentatt ved anvendelse av 20 vekt-% vandig HSA som proteinet og 42 vekt-% Dextrose som viskositetsforbedringsingrediens (viskositet 518 cP ved 25°C). Skumming og homogenisering ble gjennomført i 1 min. ved temperatur under 35°C. Mikroboblesuspensjonen (ca. 109/ml) var stabil i minst 15 dager. Etter fortynning (1/10) med 5% HSA-oppløsning, sank dens viskositet til ca. 15-20 cP og var velegnet til injeksjon og ekkografiske undersøkelser.

Den var også stabil i flere timer i fortynnet form. Stabiliteten over tid ble ytterligere øket etter oppvarming i ca. 2 min. ved 70-75°C.

Eksempel 4

Fremgangsmåten i eksempel 1 ble gjentatt men ved å erstatte BSA med andre proteiner. De andre parametrene var som i eksempel 1. Tabellen under rapporterer resultatene med hensyn på mikroboblekonsentrasjoner i de ufortynnede suspensjonene. Etter fortynning med enten saltvann (0,9% vandig NaCl) eller andre farmasøytisk aksepterbare vandige fortynningsmidler og stabilisatorer, ble det oppnådd injiserbare suspensjoner med mikrobobler som er velegnet for ekkogeniske undersøkelser.

TABELL

	Proteiner		
	Hemoglobin*	Hyfoama 77*	Bovint plasma***
Konsentrasjon x 10^7	67	12	4
Stabilitet	> 24 timer	> 1 uke	----

* Fra FLUKA AG, Buchs, Sveits

** Partielt hydrolysat av gluten fra QUEST INT., Zwijndrechd, Holland

*** Fra Herman LAUE AG, CH-6055 Alpnach, Sveits.

Eksempel 5

Til en 1 liters reaktor (tidligere beskrevet) ble det tilsatt etter hverandre 30 ml vann og 36 g 5% vandig humant serumalbumin (HSA). Risteren ble startet (25 rpm) og temperaturen ble regulert til 20°C. Deretter ble Polytron-hodet (3 mm spalte) startet ved 11000 rpm under fortsatt langsom risting og reaksjonen fikk anledning til å foregå i 5 minutter mens temperaturen ble kontrollert til ikke å overskride 40°C. Deretter ble 1,29 ml 50% vandig glutar-aldehyd tilsatt og homogeniseringen ble fortsatt noen få minutter mens temperaturen ble holdt under 45°C. Kuttehodet ble stoppet og blandingen ble avkjølt til romtemperatur i ca. 10 minutter. Boblesuspensjonen fikk anledning til å hvile i reaktoren i ca. 12 timer og etter dette ble den tappet gjennom bunnen (skummet på reaktortoppen ble helt bort) og lagret i glassbeholdere. Boblekonsentrasjonen var i området 10^8 - 10^9/ml, og mer enn 90% av boblene var i størrelses-området 1 - 10 µm.

En 1 ml prøve med konsentrert boblesuspensjon ble fortynnet med 12 ml vann fra kran og raskt frosset ved -20 til -40°C i en kald innelukking; deretter var den gjenstand for redusert trykk (10^{-3} - 10^{-4}) mens man tillot den langsomt å komme tilbake til romtemperatur (kondensator plassert mellom vakuumflaske og pumpen ble holdt ved ca. -40°C). Etter fullstendig inndamping var det igjen en tynn og skjør faststoffmasse som kunne lagres uendelig under tørre betingelser (hygroskopisitet) uten merkbare endringer. Etter en lang langringsperiode (flere uker), ble det faste stoffet tatt med 12 ml vann som regenererte en boblesuspensjon med det opprinnelige bobletallet (ca. 10^7/ml).

Eksempel 6

En serie fremstillinger (merket 103 til 127) ble gjennomført ifølge den generelle prosedyren som er beskrevet i eksempel 5, men gradvis modifisering av noen av operasjonspara-metrene. Operasjonsbetingelsene og resultatene er oppsummert

i tabellen som er frembrakt i tillegget. I tabellen refererer kolonneoverskriftene i rekkefølge til følgende parametre: prøvetall; type sukkeroppløsning til viskositetsoppbygging; vekt-% av oppløst sukker (talt som tørr); pH i blandingen som er utsatt for behandling; vekt-% albumin som blir anvendt der; vekt-% tverr-binder. De neste fire kolonnene trenger ikke ytterligere kommentarer da de gjenværende kolonnene (som starter med 11.) refererer til følgende parametre: bredde til spaltene i Polytron kuttehode; temperatur (og valgfritt tid) som fremstillingen fikk anledning til å hvile før uttømming; konsentrasjon av bobler i den konsentrerte suspensjonen slik den ble bestemt med hematocytometer; lysabsorpsjon av en prøvefortynnet suspensjon (fortynning justert til 10 vekt-% faststoff i vann); "volum" gjennomsnittlig størrelse på mikrobler; "antall" gjennomsnittlig størrelse på nevnte bobler (begge målt med Mastersizer); og til slutt "dispersivitets"parameter, et tall med følgende betydning, dess mindre tall, dess smalere størrelsesfordeling.

Patentkrav

1.

Fremgangsmåte for fremstilling av stabile vandige suspensjoner med luft eller gassfylte mikrosfærer eller mikroballonger som er velegnet til ultralydanvendelser i levende organismer, nevnte mikrosfærer har en membran av minst ett filmogent protein, karakterisert ved at man omdanner en viskøs vandig oppløsning av nevnte protein til et skum med luft eller gassfylte bobler ved å piske med luft eller en farmasøytisk aksepterbar gass og samtidig eller etterfølgende å utsette den skummende oppløsningen for høy skjærkraft ved å presse den gjennom smale åpninger eller kanaler som valgfritt inneholder avbøyende anordninger i et tidsrom som er tilstrekkelig til å redusere størrelsen på boblene i skummet til verdier i området fra 0,5 - 10 µm velegnet for injeksjon, og at suspensjonen eventuelt blir fortynnet, oppvarmet og/eller frysetørket.

2.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, karakterisert ved at skummet er gjenstand for høy skjærkraft i en homogenisator og emulgeringsapparatur som omfatter et rørformig hode med parallelt aksialt orienterte spalter ved periferien og en aksialt roterende kutter i virkningssentrum som forårsaker at luft fra omgivelsene blir blandet med væsken og luft-væskeblandingen blir presset radialt gjennom spaltene, og således utsette skummet for en høy skjæreffekt.

3.

Fremgangsmåte ifølge krav 2, karakterisert ved at temperaturen blir holdt under 50°C under skumming og boblestørrelsesreduksjon for å unngå proteindenaturering ved varme utviklet av homogenisator-emulgeringsapparaturen.

4.
Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den resulterende suspensjonen har en konsentrasjon på mikrobobler i området fra 10^8 - 10^9/ml.

5.
Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den resulterende suspensjonen ytterligere blir fortynnet med vann eller en fysiologisk aksepterbar væske for å minske viskositeten slik at den gjøres direkte injiserbar i blodstrømmen til levende organismer.

6.
Fremgangsmåte ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at den fortynnede oppløsningen blir fryse-tørret til et faststoff som kan bli holdt uforandret i en uendelig periode ved tørrhet og som vil regenerere suspensjonen med mikroballonger ved sammenblanding med en korresponderende vannmengde eller en fysiologisk aksepterbar væske som er velegnet til injeksjoner.

7.
Fremgangsmåte ifølge krav 5, k a r a k t e r i s e r t v e d at den fortynnede væsken omfatter en stabilisator for å øke lagringsstabiliteten til den fortynnede suspensjonen, f.eks. et organisk aldehyd.

8.
Fremgangsmåte ifølge krav 5, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter oppvarming av den fortynnede oppløsningen til temperaturer mellom 60 og 120°C for å gjennomføre herding av membranproteinet ved denaturering.

9.
Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at skummet utsettes for høy skjærkraft ved å presse det gjennom et medium som frembringer sliteeffekter på

boblene, dvs. et mineral- eller organisk materiale med en lang rekke avbøyde kanaler.

10.

Fremgangsmåte ifølge krav 4, k a r a k t e r i s e r t v e d at den resulterende suspensjonen blir videre oppvarmet ved 60-120°C for å modifisere egenskapene til det boblebindende proteinet ved progressiv denaturering.

11.

Vandig sammensetning som skal bli omdannet ved fremgangsmåten ifølge krav 1 til en suspensjon med mikrobobler som er velegnet til ultralyd ekkografi, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter i oppløsning 0,1-5 vekt-% av et filmogent protein og 40-80 vekt-% av en vann-oppløselig polyolviskositetsforøker for å heve omgivelsestemperatur-viskositeten til 100-600 cP, og valgfrie overflateaktive medier som skumforøkere og tverr-bindingsmidler for å øke stabiliteten på skummet.

12.

Sammensetning ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at polyolviskositetsforøkeren har minst fire OH-grupper pr. molekyl.

13.

Sammensetning ifølge krav 12, k a r a k t e r i s e r t v e d at viskositetsforøkeren blir utvalgt fra polyalkoholer, mono-, poly- og oligosakkarider og blandinger av disse.

14.

Sammensetning ifølge krav 13, k a r a k t e r i s e r t v e d at viskositetsforøkeren blir utvalgt fra glukose, fruktose, mannose, dekstrose, dekstran, polydekstrose, sukkersirup, maissirup, polyglyserol med minst fire glyserol-enheter og blandinger av disse.

15.
Sammensetning ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at det blir tilsatt et stabiliseringsmiddel slik som formaldehyd eller glutaraldehyd.