

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-529697

(P2004-529697A)

(43) 公表日 平成16年9月30日(2004.9.30)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 B 8/04	A 6 1 B 8/04	4 C 0 1 7
A 6 1 B 5/022	A 6 1 K 49/00 C	4 C 0 8 5
A 6 1 K 49/00	A 6 1 B 5/02 3 3 2 Z	4 C 6 0 1

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 66 頁)

(21) 出願番号	特願2002-578814 (P2002-578814)	(71) 出願人	398063065 ブラッコ・リサーチ・ソシエテ・アノニム BRACCO RESEARCH S. A . スイス、ツェーハー 1 2 2 8 プランレー ーワート、ルート・ドゥ・ラ・ガレス 3 1 番
(86) (22) 出願日	平成14年4月5日 (2002.4.5)	(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(85) 翻訳文提出日	平成15年10月6日 (2003.10.6)	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬
(86) 国際出願番号	PCT/IB2002/001229	(74) 代理人	100087413 弁理士 古賀 哲次
(87) 国際公開番号	W02002/080774	(74) 代理人	100111903 弁理士 永坂 友康
(87) 国際公開日	平成14年10月17日 (2002.10.17)		
(31) 優先権主張番号	60/281,794		
(32) 優先日	平成13年4月6日 (2001.4.6)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR) , AU, CA, JP, US		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 流体で充填された空洞内の局所物理パラメータの改善された測定方法

## (57) 【要約】

本発明は、超音波およびカプセル化された又は安定化された気泡により、流体で充填された空洞（例えば、心臓窩洞、血管、産業容器等）内の局所物理パラメータの遠隔的決定に関する。流体で充填された空洞の環境の物理局所パラメータを遠隔的に決定するための測定方法、その超音波診断方法および装置が開示される。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

カプセル化された又は安定化された気泡および超音波の組み合わせた使用に基づき、流体で充填された空洞内の局所物理パラメータを遠隔的に決定するための非侵襲的測定方法であって、

a) 流体で充填された空洞に、安定化された又はカプセル化された気泡を投与するステップと、

b) 該流体で充填された空洞に、第 1 の超音波パルス波もしくはパルス波列をトランスデューサにより適用して、該安定化された又はカプセル化された気泡を破壊し、遊離気泡を発生させるステップと、

c) 該泡のサブおよび/またはウルトラハーモニック応答を励起するために特異的に選択される周波数の第 2 の超音波パルス波もしくはパルス波列をトランスデューサにより適用するステップと、

d) 平均応答時間を決定するステップと、

e) ステップ d) の該応答時間に基づき局所物理パラメータについての値を決定するステップとを含んで成り、

ステップ c) のサブおよび/またはウルトラハーモニック応答が、連続する超音波パルスにより時間の関数としてモニターされ、この関数が測定される該物理パラメータのインジケータであることを特徴とする方法。

10

**【請求項 2】**

第 1 の超音波パルス波もしくはパルス波列は、放出される遊離気泡のサイズがサブハーモニックサイズよりも大きくなるようにして調整されることを特徴とする、請求項 1 に記載の測定方法。

20

**【請求項 3】**

第 1 の超音波パルス波もしくはパルス波列の周波数および振幅が第 2 の超音波パルス波もしくはパルス波列とは独立して選択できることを特徴とする、請求項 1 または請求項 2 に記載の測定方法。

**【請求項 4】**

第 2 の超音波パルス波もしくはパルス波列の周波数および振幅が第 1 の超音波パルス波もしくはパルス波列とは独立して選択できることを特徴とする、請求項 1 に記載の測定方法。

30

**【請求項 5】**

第 1 の超音波パルス波もしくはパルス波列を適用するために使用されるトランスデューサは、第 2 の超音波パルス波もしくはパルス波列を適用するために使用されるトランスデューサと同一のもの又は別個のものとする事ができる、請求項 1 に記載の測定方法。

**【請求項 6】**

局所パラメータが圧力、温度およびガス濃度から成る群より選択される、請求項 1、請求項 2、請求項 3、請求項 4 または請求項 5 のいずれか一項に記載の測定方法。

**【請求項 7】**

カプセル化された又は安定化された気泡が、気液界面で結合した界面活性剤を含む非常に薄いエンベロープにより境界つけられたマイクロバブル、有機ポリマーまたは生分解性水不溶性であって室温で固体の脂質でできたエンベロープ材料により境界つけられたマイクロバルーン、およびポリマーまたは他の固体のマイクロ粒子であって該マイクロ粒子の気孔内に封じ込められた又はマイクロ粒子の気孔と会合したガスマイクロバブルを運搬するマイクロ粒子から成る群より選択される、請求項 1 に記載の測定方法。

40

**【請求項 8】**

カプセル化された又は安定化された気泡が、六フッ化硫黄、ペルフルオロカーボン、空気、窒素、二酸化炭素、ヘリウム、クリプトン、キセノン、アルゴン、メタン、超偏極ヘリウム、超偏極キセノンおよびこれらの混合物から成る群より選択されるガスまたはガス混合物を含む、請求項 7 に記載の測定方法。

50

## 【請求項 9】

カプセル化された又は安定化された気泡が、ペルフルオロメタン、ペルフルオロエタン、ペルフルオロプロパン、ペルフルオロブタン、ペルフルオロシクロブタン、ペルフルオロペンタン、ペルフルオロヘキサンおよびこれらの混合物から成る群より選択されるペルフルオロカーボンを含む、請求項 8 に記載の測定方法。

## 【請求項 10】

界面活性剤の少なくとも 1 種が膜形成リン脂質である、請求項 7 に記載の測定方法。

## 【請求項 11】

リン脂質膜形成界面活性剤が飽和リン脂質、合成不飽和リン脂質およびこれらの混合物から成る群より選択される、請求項 10 に記載の測定方法。

10

## 【請求項 12】

リン脂質膜形成界面活性剤が、飽和ホスファチジン酸、飽和ホスファチジルコリン、飽和ホスファチジルエタノールアミン、飽和ホスファチジルセリン、飽和ホスファチジルグリセロール、飽和ホスファチジルイノシトール、カルジオリピンおよびスフィンゴミエリンから成る群より選択される飽和リン脂質である、請求項 11 に記載の測定方法。

## 【請求項 13】

カプセル化された又は安定化された気泡が、ポリ乳酸またはポリグリコール酸およびそれらの共重合体、変性血清アルブミン、変性ヘモグロビン、ポリシアノアクリレート、ならびにポリグルタミン酸およびポリアスパラギン酸のエステルまたはモノ-、ジ-およびトリグリセリド類、脂肪酸、ステロール類、ワックス類およびこれらの混合物より選択される生分解性、水不溶性であって室温で固体の脂質から成る群より選択されるポリマーによって境界つけられたマイクロバルーンである、請求項 7 に記載の測定方法。

20

## 【請求項 14】

マイクロバルーンが、トリステアリン、トリパルミチンまたはそれらと他のグリセリドとの混合物から成る群より選択される飽和トリグリセリドによって境界つけられている、請求項 13 に記載の測定方法。

## 【請求項 15】

流体で充填された空洞の局所物理パラメータを「イン・シトゥ」で決定するための超音波診断方法であって、

a) カプセル化された又は安定化された気泡を含む流体物質を被験体に投与するステップと、

30

b) 第 1 の超音波パルス波もしくはパルス波列をトランスデューサにより適用して、遊離気泡を発生させるステップと、

c) 該泡のサブおよび/またはウルトラハーモニック応答を励起するために特異的に選択される周波数付近の第 2 の超音波パルス波もしくはパルス波列をトランスデューサにより適用するステップと、

d) 平均応答時間を決定するステップと、

e) ステップ d) の該応答時間に基づき局所物理パラメータについての値を決定するステップとを含んで成り、

ステップ c) の該サブおよび/またはウルトラハーモニック応答が、連続する超音波パルスにより時間の関数としてモニターされ、この関数が測定される該物理パラメータのインジケータであることを特徴とする方法。

40

## 【請求項 16】

前記被験体が脊椎動物であり、前記カプセル化された又は安定化された気泡を含む流体物質が前記脊椎動物の血管系内または体腔内に導入される、請求項 15 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、超音波およびカプセル化された又は安定化された気泡（例えばガスを含む安定化されたマイクロバブル、マイクロバルーンもしくはマイクロ粒子の懸濁液）により、流

50

体で充填された空洞内の局所物理パラメータを遠隔的に決定するための非侵襲的測定方法に関する。

【背景技術】

【0002】

心臓血管系の生理学的パラメータ、例えば血圧、温度およびガス濃度等は、臓器の健康状態および患者に関する不可欠な情報を提供するので重要である。現在、心室または血管に挿入される感圧カテーテルから成るカテーテル法により、又は単純化されたベルヌーイの式を用いるドップラー超音波心臓検査法(Burton C. Physiology and biophysics of the circulation. 2<sup>nd</sup> edition. Chicago, 1972)により、動的血圧測定が主として行われている。第一の方法は、侵襲的手順の不利な点、すなわち苦痛および感染の危険を生じさせることを伴う。第二の非侵襲的方法は、信頼性または再現性のある血圧値を与えない(Strauss AL, Roth FJ, Rieger H. "Noninvasive assessment of pressure gradients across iliac artery stenoses: duplex and catheter correlative study" (腸骨動脈狭窄を横切る圧力勾配の非侵襲的評価：デュプレックスおよびカテーテル腐食研究) J Ultras Med 1993; 12: 17-22)。

10

【0003】

別の技法が文献に記載されており、これらは個々の気泡と超音波の相互作用に主に基づくものである(Fairbank W, Scully M. "A new noninvasive technique for cardiac pressure measurement: resonant scattering of ultrasound from bubbles" (心圧測定のための新たな非侵襲的技術：泡からの超音波の共鳴散乱) IEEE Trans Biomed Eng 1977; 24: 107-110; Hok B. "A new approach to noninvasive manometry: interaction between ultrasound and bubbles" (非侵襲的検圧法に対する新たなアプローチ：超音波と泡との間の相互作用) Med Biol Eng Comput 1981; 19: 35-39; Ticker EG. "Precision microbubbles for right side intracardiac pressure and flow measurements" (右側心臓内圧力および流量測定のための精密マイクロバブル) Meltzer RS and Roeland JTCR, ed. Contrast ecocardiography; London: Martinus Nijhoff, 1982; 15: 313-324; Ishihara K et al. "New approach to noninvasive manometry based on pressure dependent resonant shift of elastic microcapsules in ultrasonic frequency characteristics" (超音波周波数特性における弾性マイクロカプセルの圧力依存性共鳴シフトに基づく非侵襲的検圧法に対する新たなアプローチ) Jap J App Phys 1988; 27: 123-127; DE 29 46 462 A1 (Siemens AG); EP 0 296 189 B (Schering AG); US 4,483,345 (Miwa))。

20

30

【0004】

ガスの高い圧縮性に起因して、気泡のサイズは局所的静水圧の関数として変化する。このサイズ変化は、共鳴周波数、散乱および減衰断面などのような気泡の音響特性に影響を与える。それ故に、液体で満たされた空洞内の局所圧力は、これらの音響特性から導出できる。

【0005】

液体で満たされた空洞内の圧力を非侵襲的に評価すべく気泡を利用しようとする近年の試み(De Jong et al. WO 98/32378 (Andaris Ltd); Shi et al. WO 99/47045)は、不正確性および鈍感性によって妨げられてきた。

40

【0006】

デ ヨング(De Jong)らのWO 98/32378 (Andaris Ltd)ならびにボウアカズ(Bouakaz)ら("Noninvasive measurement of the hydrostatic pressure in a fluid cavity based on the disappearance time of micrometer-sized free gas bubbles" (マイクロメートルサイズの遊離気泡の消失時間に基づく流体空洞内の静水圧の非侵襲的測定) Ultrasound in Medicine and Biology 1999; 25: 1407-1415)は、循環器系内へのガス含有マイクロカプセルとして称されるものの注入を含む局所圧力の非侵襲的測定方法を開示している。低周波数、高振幅の超音波バーストを伝達することによって、遊離気泡が、該ガス含有マイクロカプセルから局所圧力が測定される領域に放出される。この放出される遊離ガスの消失時間は局所圧力に依存し、これが局所圧力の非侵襲的決定に使用される。この出願では、

50

放出される気泡の全応答（基本(fundamental)および第二ハーモニック(second harmonic)）が消失時間を計算するために使用される。ボウアカズ(Bouakaz)の論文は、この方法が臨床的に関連する5～10mmHg程度の小さな圧力変化を検出するためには不正確であることを述べている(Bouakaz et al. "Noninvasive measurement of the hydrostatic pressure in a fluid cavity based on the disappearance time of micrometer-sized free gas bubbles" (マイクロメーターサイズの遊離気泡の消失時間に基づく流体空洞内の静水圧の非侵襲的測定) Ultrasound in Medicine and Biology 1999; 25: 1407-1415)。

【0007】

シー(Shi)らのWO 99/47045は、超微粒気泡により生じるサブハーモニック(subharmonic)と局所圧力との間で優れた相関が存在することを述べている。彼らはサブ(sub-)およびウルトラハーモニック(ultraharmonic)振幅を使用して局所圧力を非侵襲的に評価し得ることを示唆し、サブハーモニック振幅が基本および第二ハーモニック振幅よりも遥かに良好な圧力変動のインジケータ(表示)であることを主張する。しかしながら、サブおよびウルトラハーモニック振幅の差は5～10mmHgの範囲の圧力変化に対して非常に小さい(Shi et al. "Pressure dependence of subharmonic signals from contrast microbubbles" (コントラストマイクロバブルからのサブハーモニック信号の圧力依存) Ultrasound in Medicine and Biology 1999; 25: 275-283)。それ故に、この方法も小さな圧力変化を検出する場合の感度に欠ける。第二に、この方法は圧力が測定される位置での泡のサイズに強く依存している。WO 99/47045に開示されている方法では、泡の注入後にサイズ分布が肺濾過およびマイクロバブル取込に起因して変化することとなる。それ故に、関心の位置での泡の正確なサイズならびに結果としてサブおよびウルトラハーモニック応答のような音響特性は不明である。

10

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の目的は、流体で充填された空洞内の局所物理パラメータの正確かつ敏感な非侵襲的測定を行うための新たな方法を提供することである。この新たな方法を使用すれば、上述の文献に記載されている方法の主な限界である小さな圧力変化(5～10mmHg)を測定できる。さらに、WO 99/47045に開示されている方法とは異なり、本発明の方法では圧力が測定される位置での泡のサイズを良好に制御できるため、関心の部位での泡の音響特性が良好に特定されることになり、このことが本発明を更に正確にする。WO 98/32378に関しては、本発明は必要な取得時間が更に短くなり、このことが本発明を臨床において更に効率的かつ更に有用とする。

30

【0009】

この新たな方法は、感染の危険性を伴うことなく、患者の不快さを最少にして、臓器の健康状態を決定するための貴重なツールを提供できるものである。さらに、例えば直接測定が不可能であるか又は危険すぎる状況で物理パラメータを遠隔的に感知するための一般的技術として本発明を使用できることが当業者には容易に理解されよう。

【0010】

本発明の目的は、安定化された又はカプセル化された気泡を投与し、時間の関数としてこれらの安定化された又はカプセル化された気泡から放出された遊離気泡のサブおよび/またはウルトラハーモニック応答をモニターすることによって、流体で充填された空洞内の局所物理パラメータを決定するための技術を提供することである。

40

【0011】

本発明に有用な安定化された又はカプセル化された気泡は、例えばEP 554213およびUS 5,413,774に与えられた定義に従って、次の幾つかのカテゴリーに分けられる：安定化されたガスマイクロバブル、ガス充填マイクロカプセル/マイクロバルーン、およびガス含有マイクロ粒子。

【0012】

「マイクロバブル」という用語は、泡の安定性および表面特性を制御するためのテンシド

50

(tenside) もしくは界面活性剤をも好ましくは含有する液中で浮遊している気泡を特に指す。「マイクロカプセル」または「マイクロバルーン」という用語は、エンベロープ(外皮)または境界材料すなわちポリマー膜壁を備えた好ましくは空気またはガス充填体を指す。マイクロ粒子という用語は、ガス含有固体系、例えばガスがその中に封じ込められた又はそれと会合した(例えばその表面に吸着され及び/又はその中の空隙、空洞または気孔内に封じ込められた)マイクロ粒子をいう。

【0013】

遊離気泡、すなわち何らの手段でも安定化されていない気泡(テンシドもしくは界面活性剤によって安定化されておらず、また例えばポリマーによりカプセル化されておらず、また固体の中に閉じ込められ又は固体と会合されてもいない気泡)が、これらの安定化された又はカプセル化された気泡から、例えば1以上の超音波パルス波の適用により、該安定化マイクロバブル、マイクロバルーンまたはマイクロ粒子の破壊によって得られる。放出された遊離気泡は周囲の液体中に溶解する。結果として、泡が収縮し、泡サイズに対して非常に敏感なサブおよび/またはウルトラハーモニック応答が時間の関数として変化する。気泡が周囲の液体中で完全に消失するための時間は、ガス濃度、温度および圧力のような局所パラメータの関数である。それ故に、遊離気泡のサブおよび/またはウルトラハーモニック応答の変化を時間の関数としてモニターすることによって、これらのパラメータを非侵襲的に測定することができる。

10

【0014】

気泡のサブおよびウルトラハーモニック応答はそれらのサイズに対して非常に敏感である。したがって、遊離気泡のサブおよびウルトラハーモニック応答は泡サイズに影響を与えるパラメータに対して非常に敏感である。それ故に、時間の関数としてのサブハーモニック応答および/またはウルトラハーモニック応答により、周囲の液体中に溶解するガスに起因する泡サイズの変化を測定することによって、局所圧力または他のパラメータの評価を行うことができる。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

本発明の一つの態様は、カプセル化された又は安定化された気泡および超音波の組み合わせた使用に基づき、流体で充填された空洞の局所物理パラメータを遠隔的に決定するための非侵襲的測定方法であって、

30

- a) 流体で充填された空洞に、安定化された又はカプセル化された気泡を投与するステップと、
- b) 該流体で充填された空洞に、第1の超音波パルス波もしくはパルス波列をトランスデューサにより適用して、該安定化された又はカプセル化された気泡を破壊し、遊離気泡を発生させるステップと、
- c) 該泡のサブおよび/またはウルトラハーモニック応答を励起するために特異的に選択される周波数の第2の超音波パルス波もしくはパルス波列をトランスデューサにより適用するステップと、
- d) 平均応答時間を決定するステップと、
- e) ステップd)の該応答時間に基づき局所物理パラメータについての値を決定するステップとを含んで成る方法を提供する。

40

【0016】

本発明で示されるような流体で充填された空洞内の非侵襲的測定のための改善された感度は、前述のステップの1つを省略することによっても得られなくなるであろう。

【0017】

本発明の更に良好な理解のために、ここで考慮される局所物理パラメータは圧力、温度またはガス濃度である。

【0018】

驚くべきことに、ステップb)のサブおよび/またはウルトラハーモニック応答が、連続する超音波パルスにより時間の関数としてモニターされ、この関数が測定される該局所物

50

理パラメータのインジケータ（表示）であることに本発明の本質的特徴があることが見出された。本発明の方法は、サブおよび/またはウルトラハーモニック応答を時間の関数として測定することによって改善された正確性および効率を提供する。

【0019】

第1の超音波パルス波もしくはパルス波列は、放出される遊離気泡のサイズが（本明細書中で後に定義される）サブハーモニックサイズよりも大きくなるようにして（例えばその周波数および/または振幅を調整することによって）調整される。

【0020】

好ましくは、ガス放出を最適化するための第1の超音波パルス波もしくはパルス波列の周波数および振幅は、サブおよび/またはウルトラハーモニック応答をモニターするために使用される第2の超音波パルス波もしくはパルス波列とは独立して選択できる。

10

【0021】

好ましくは、サブおよび/またはウルトラハーモニック応答をモニターするために使用される第2の超音波パルス波もしくはパルス波列の周波数および振幅は、ガス放出を最適化するための第1の超音波パルス波もしくはパルス波列とは独立して選択できる。

【0022】

第1の超音波パルス波もしくはパルス波列を適用するために使用されるトランスデューサは、第2の超音波パルス波もしくはパルス波列を適用するために使用されるトランスデューサと同一のもの又は別個のものとすることができる。

【0023】

更なる態様に鑑みて、本発明は、流体で充填された空洞の局所物理パラメータを「イン・シトゥ」(in situ)で決定するための超音波診断方法であって、

20

a) カプセル化された又は安定化された気泡を含む流体物質を被験体に投与するステップと、

b) 第1の超音波パルス波もしくはパルス波列をトランスデューサにより適用して、遊離気泡を発生させるステップと、

c) 該泡のサブおよび/またはウルトラハーモニック応答を励起するために特異的に選択される周波数付近の第2の超音波パルス波もしくはパルス波列をトランスデューサにより適用するステップと、

d) 平均応答時間を決定するステップと、

30

e) ステップd)の該応答時間に基づき局所物理パラメータについての値を決定するステップとを含んで成り、

ステップc)の該サブおよび/またはウルトラハーモニック応答が、連続する超音波パルスにより時間の関数としてモニターされ、この関数が測定される該物理パラメータのインジケータ（表示）であることを特徴とする方法を提供する。

【0024】

この方法によれば、前記被験体は脊椎動物であり、前記カプセル化された又は安定化された気泡を含む流体物質が前記脊椎動物の血管系内または体腔内に導入される。

【0025】

更なる態様に鑑みて、本発明は、上記測定方法を実行するための装置を提供する。この装置は、必要な励起およびモニター用送信パルス列ならびに観測される応答を局所物理パラメータの関数として解釈するために必要な信号処理関数を発生させるための特異的なソフトウェアと一体となって超音波装置中に見出される要素を含んで成る。この装置は、例えば、タイミング回路、増幅器を備えた少なくとも1つのパルスまたは任意波形発生器、関心領域に超音波を発射できる少なくとも1つの送信トランスデューサ、反射された超音波を感知できる少なくとも1つの受信トランスデューサ、エコー信号の増幅および調整に専用の少なくとも1つの受信回路、マイクロバブルからのエコー応答のフィルター処理を実行するための専用のアナログもしくはデジタル回路、局所物理パラメータについての値を導出するためのルックアップテーブルとの比較および必要な計算を実行できる中央処理装置、必要なプログラム、ルックアップテーブルおよび計算値を記憶するためのメモリー

40

50

、および計算値を図もしくは文字の形式で表わすための表示手段を備えている。

【0026】

要約すれば、本発明の対象は、関心のある部位に遊離気泡を送達するためのビヒクル（媒体）として用いられるカプセル化された又は安定化された気泡および超音波による、流体で充填された空洞（例えば、心臓窩洞、血管、産業容器等）内の局所物理パラメータの遠隔的測定に関する。例えばテンシド(tenside)もしくは界面活性剤による安定化、壁もしくは殻による気泡のカプセル化、またはガスと固体との会合による、ガスの安定化またはカプセル化は、ガス内容物が周囲の液体中に迅速に溶解することを防止する。例えば局所圧力または他の局所パラメータ（例えば温度、ガス濃度等）が測定される、関心のある部位において、このカプセル化された又は安定化された構造が超音波により破裂し、次にガス内容物が放出される。この放出は、例えば適用される超音波の周波数および/または振幅を調整することによって、既知サイズの遊離気泡を放出するために調整される（Frinking et al. "Scattering properties of encapsulated gas bubbles at high ultrasound pressures" (高超音波圧力におけるカプセル化された気泡の散乱特性) Journ. Acoust. Soc. Am. 1999: 105; 1989-1996)。驚くべきことに、安定化された又はカプセル化された気泡と比較して、遊離気泡が、温度、ガス濃度または局所圧力のような環境条件の変化に対して影響を受けやすいことが見出された。

10

【0027】

遊離気泡の半径は、次式に従い、時間の関数として変化することが知られている。

20

【数1】

$$\frac{dR}{dt} = \frac{DL}{R} \left( \frac{\frac{C_i}{C_0} - 1 - \frac{2\sigma}{RP_0} - \frac{p_{ov}}{P_0}}{1 + \frac{4\sigma}{3RP_0}} \right) \quad (1)$$

式中

30

R = 泡の半径

t = 時間

D = 拡散定数

$C_i / C_0$  = 飽和濃度に対する溶解ガス濃度の比

= 表面張力

$P_0$  = 大気圧

L = オストワルド係数

$p_{ov}$  = 過剰圧力

【0028】

遊離気泡が周囲の液体中に完全に溶解する時間、すなわち消失時間は、ガスの種類に依存する。このことは式(1)中でガスの拡散定数およびオストワルド係数によって反映されている。例えば、 $2.2 \mu\text{m}$ 気泡についての消失時間は、 $\text{CO}_2$ の場合に $3.2 \text{ms}$ 、空気の場合に $120.8 \text{ms}$ 、 $\text{C}_4\text{F}_{10}$ の場合に $2936.6 \text{ms}$ である(図1)。

40

【0029】

ガス飽和液体中で、ミクロンサイズの遊離気泡の溶解は、表面張力および過剰圧力に起因して液中ガスと泡内ガスとの間のガス濃度の差によって生じる。図2には、例えば水中での $2.2 \mu\text{m}$ 気泡についての半径-時間曲線が $0 \text{mmHg}$ および $200 \text{mmHg}$ の過剰圧力の値でシミュレートされている。温度およびガス濃度は一定であると仮定される。消失時間はそれぞれ $120.9 \text{ms}$ および $94.1 \text{ms}$ である。

【0030】

50

遊離気泡を放出するための超音波パラメータは、放出される泡のサイズがサブハーモニックサイズよりも大きくなるようにして（例えばその周波数および/または振幅を調整することによって）調整される。気泡のサブハーモニックサイズは、共鳴周波数が送信周波数（ $f_0$ ）の半分に等しくなる泡の半径として定義される。既知サイズの遊離気泡の放出後に、周囲の液中に溶解するガス、すなわち時間の関数としての泡サイズが超音波によりモニターされる。

【0031】

泡サイズがサブハーモニックサイズと等しいときに、モニター用超音波に対する気泡の応答は送信周波数のサブハーモニック（ $1/2 f_0$ 、 $1/3 f_0$ 、 $3/4 f_0$ ...）の出現を示すことになる。さらに、該超音波に対する気泡の応答は送信周波数のウルトラハーモニック（ $3/2 f_0$ 、 $5/2 f_0$ ...）の出現を示すことになる。

10

【0032】

このことは、0 mmHg 過剰圧力（101.3 kPa）での周囲液体へのガス溶解の間の異なる時刻（time instant）における超音波に対する  $2.2 \mu\text{m}$  気泡の応答を示す図3に有利に示されている。この特定の例では、サブハーモニック成分が  $1/2 f_0$  であるように選択され、ウルトラハーモニック成分が  $3/2 f_0$  であるように選択される。図3Aは水中での  $2.2 \mu\text{m}$  空気泡の半径-時間曲線を示す。3つの点I、IIおよびIIIは、それぞれサブハーモニックサイズよりも大きな泡サイズ、サブハーモニックサイズでの泡サイズおよびサブハーモニックサイズよりも小さな泡サイズに相当する。対応する時間および周波数応答が、図3B、図3Cおよび図3Dに、それぞれI、IIおよびIIIについて示されている。

20

【0033】

驚くべきことに、気泡のサブハーモニック応答およびウルトラハーモニック応答は気泡のサイズに対して非常に敏感である。従って、気泡のサブハーモニック応答およびウルトラハーモニック応答は泡サイズに影響を与えるパラメータに対して非常に敏感である。周囲液体中に溶解するガスに起因する泡サイズの変化を時間の関数としてサブおよび/またはウルトラハーモニック応答により測定することで、局所圧力または他のパラメータの改善された評価を行うことができる。本発明で示されるような流体で充填された空洞内の非侵襲的測定のための改善された感度は、放出される気泡の消失時間とサブおよび/またはウルトラハーモニック応答との組合せによってのみ得られると言及しなければならない。

30

【0034】

サブハーモニックサイズよりも大きな半径をもった遊離気泡の放出後に、該気泡のサブおよびウルトラハーモニック応答の振幅は、それが最大値に達するまで増大し、次にそれが消失するまで減少する。平均サブまたはウルトラハーモニック応答時間は、該安定化された又はカプセル化された気泡からのガスの放出後にサブまたはウルトラハーモニックが出現する（例えばサブまたはウルトラハーモニック応答のエネルギーまたは相関係数によって重み付けされた）平均時間として定義される。式の形では、これは次式のものである。

【数2】

$$\bar{T} = \frac{\sum_{t=t_1}^{t_2} t \times E(t)}{\sum_{t=t_1}^{t_2} E(t)}, \quad (2)$$

40

【0035】

当業者に知られているように、式2で計算されるような平均応答時間から、校正表または

50

ルックアップテーブルに掲げられた所定の値と計算された平均応答時間を比較することによって、局所物理パラメータの絶対値を導出できる。

【0036】

送信周波数のサブおよび/またはウルトラハーモニック成分は、時間応答のデジタルバンドパスフィルター処理のような標準的信号処理技術によって得ることができる。時間の関数としての送信周波数のサブおよび/またはウルトラハーモニック成分のエネルギーは、各時点におけるフィルター処理済み応答の二乗値の総和をとることによって得られる。時間の関数としての送信周波数のサブおよび/またはウルトラハーモニック成分の相関は、各時点における2つの連続する時刻でのフィルター処理済み応答の間の相関をとることによって得られる。

10

【0037】

サブハーモニックおよびウルトラハーモニックを生成するような、そしてカプセル化されたガスで充填されたマイクロ粒子の破裂または破壊を最小化するようにして(例えばその周波数および/または振幅を調整することによって)モニター用超音波を調整するために特別な注意が払われる。

【0038】

本発明に有用なカプセル化された又は安定化された気泡の懸濁液(suspension)は、安定化されたマイクロバブル;マイクロバルーン(マイクロカプセルともいう);マイクロ粒子:の3つのカテゴリーに分けられる。遊離気泡は、周囲の液体へのそれらの迅速な溶解のために、これらのカテゴリーには含まれない:それらは気泡を関心領域に確実に送達するために十分なほど安定でない。従って、例えば、乳化剤、油、増粘剤もしくは糖類を使用すること、又は多様な系でガスもしくはその前駆体を取込み又はカプセル化することによる、超音波検査法および他の超音波研究に普通に用いられる気泡安定化方法に関心が示されてきた。

20

【0039】

本発明の場合に、カプセル化された又は安定化された気泡は、気液界面で結合した界面活性剤を含む非常に薄いエンベロープにより境界つけられたマイクロバブル、有機ポリマーまたは生分解性水不溶性であって室温で固体の脂質でできたエンベロープ材料により境界つけられたマイクロバルーン(マイクロカプセルまたはガスで充填されたりポソーム)、あるいはガスがその中に封じ込められた又はそれと会合した(例えばその表面に吸着され及び/又はその中の空隙、空洞または気孔内に封じ込められた)マイクロ粒子である。

30

【0040】

マイクロバブルの分類に属する第1のカテゴリーは、好ましくは気泡の表面特性および安定性を制御するためのテンシドまたは界面活性剤をも含有する液体中に懸濁する気泡を特に指す。

【0041】

好ましくは、マイクロバブル懸濁液は、界面活性剤またはテンシド(tenside)を含み、例えば、プルロニック(Pluronic(登録商標))のようなポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンブロックコポリマー界面活性剤またはUS 5,919,434に開示されているようなポリマー界面活性剤を含む。より好ましくは、ガスおよび水(または水性キャリア)の存在下で安定な膜を形成し得る両親媒性化合物が、本発明において有用な安定化されたマイクロバブル中の界面活性剤として使用される。そのような化合物としては、例えば膜形成脂質が含まれる。本発明に使用されるガス含有物質を調製するために使用可能な、合成の又は天然に産生する概ね両親媒性で生体適合性の脂質としては、例えば、脂肪酸;リゾ脂質;リン脂質、例えば:両飽和および不飽和脂質を含むホスファチジルコリン類(PC)、例えば:ジオレイルホスファチジルコリン;ジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC);ジペンタデカノイルホスファチジルコリン;ジラウロイルホスファチジルコリン(DLPC);ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC);ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC);およびジアラキドノイルホスファチジルコリン(DAPC)等のようなホスファチジルコリン類;ホスファチジルエタノールアミン類(PE)、

40

50

例えばジオレイルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE) およびジステアロイルホスファチジルエタノールアミン (DSPPE); ホスファチジルセリン (PS)、例えばジパルミトイルホスファチジルセリン (DPPS)、ジステアロイルホスファチジルセリン (DSPS); ホスファチジルグリセロール類 (PG)、例えばジパルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG)、ジステアロイルホスファチジルグリセロール (DSPG); ホスファチジリンシトール; スフィンゴ脂質、例えばスフィンゴミエリン; 糖脂質、例えばガングリコシド GM1 および GM2; グルコ脂質; スルファチド類; グリコスフィンゴ脂質; ホスファチジル酸、例えばジパルミトイルホスファチジル酸 (DPPA) およびジステアロイルホスファチジル酸 (DSPA); 脂肪酸、例えば: パルミチン酸; ステアリン酸; アラキドン酸; オレイン酸; キチン、ヒアルロン酸、ポリビニルピロリドンまたは「peg化脂質」(pegylated lipids)とも称されるポリエチレングリコール (PEG)等のポリマーを支持する脂質、好ましいポリマー支持脂質としては、DPPE-PEG (DPPE-PEG) (これはPEGポリマーが結合した脂質DPPEをいう)、例えばDPPE-PEG2000 (これは約2000の平均分子量を有するPEGポリマーが結合したDPPEをいう); スルホン化単糖類、二糖類、オリゴ糖類もしくは多糖類を支持する脂質; コレステロール、硫酸コレステロールおよびヘミコハク酸コレステロール; ヘミコハク酸トコフェロール; エーテルおよびエステル結合脂肪酸をもった脂質; 重合化脂質 (それらの多種多様のものが当該技術分野でよく知られている); リン酸ジアセチル; リン酸ジセチル; ステアリルアミン; カルジオリピン; 約6ないし約8炭素鎖長の短鎖脂肪酸をもったリン脂質; 非対称アシル鎖、例えば約6炭素の1つのアシル鎖と約12炭素のもう1つのアシル鎖をもった合成リン脂質; セラミド類; 非イオン性リポソーム、例えばニオソーム、例えばポリオキシエチレン脂肪酸エステル類、ポリオキシエチレン脂肪アルコール類、ポリオキシエチレン脂肪アルコールエーテル類、ポリオキシエチル化ソルビタン脂肪酸エステル類、リシノール酸グリセロールポリエチレングリコール、エトキシ化大豆ステロール類、エトキシ化ヒマシ油、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンポリマー類、およびポリオキシエチレン脂肪酸ステアレート; ステロール脂肪酸エステル類、例えば硫酸コレステロール、酪酸コレステロール、イソ酪酸コレステロール、パルミチン酸コレステロール、ステアリン酸コレステロール、酢酸ラノステロール、パルミチン酸エルゴステロール、およびn-酪酸フィトステロール; 糖酸のステロールエステル類、例えばコレステロールグルコロニド、ラノステロールグルコロニド、7-デヒドロコレステロールグルコロニド、エルゴステロールグルコロニド、コレステロールグルコネート、ラノステロールグルコネート、およびエルゴステロールグルコネート; 糖酸とアルコールのエステル類、例えばラウリルグルコロニド、ステアロイルグルコロニド、ミリストイルグルコロニド、ラウリルグルコネート、ステアロイルグルコネート、ミリストイルグルコネート; 糖と脂肪酸のエステル類、ラウリン酸スクロース、ラウリン酸フルクトース、パルミチン酸スクロース、ステアリン酸スクロース、グルクロン酸、グルコン酸およびポリウロン酸; サポニン類、例えばサルササポゲニン、スミラゲニン、ヘデラゲニン、オレアノール酸、およびジギトキシゲニン; グリセロールジラウレート、グリセロールトリラウレート、グリセロールジパルミテート、グリセロールおよびグリセロールエステル類、例えばグリセロールトリパルミテート、グリセロールジステアレート、グリセロールトリステアレート、グリセロールジミリステート、グリセロールトリミリステート; 長鎖アルコール類、例えばn-デシルアルコール、ラウリルアルコール、ミリスチルアルコール、セチルアルコール、およびn-オクタデシルアルコール; 6-(5-コレステレン-3-イルオキシ)-1-チオ-D-ガラクトピラノシド; ジガラクトシルジグリセリド; 6-(5-コレステレン-3-イルオキシ)ヘキシル-6-アミノ-6-デオキシ-1-チオ-D-ガラクトピラノシド; 6-(5-コレステレン-3-イルオキシ)ヘキシル-6-アミノ-6-デオキシ-1-チオ-D-マンノピラノシド; 12-(((7'-ジエチルアミノクマリン-3-イル)カルボニル)-メチルアミノ)オクタデカン酸; N-[12-(((7'-ジエチルアミノクマリン-3-イル)カルボニル)メチルアミノ)オクタデカノイル]-2

10

20

30

40

50

- アミノパルミチン酸 ; N - スクシニルジオレイルホスファチジルエタノールアミン ; 1 , 2 - ジオレイル - sn - グリセロール ; 1 , 2 - ジパルミトイル - sn - 3 - スクシニルグリセロール ; 1 , 3 - ジパルミトイル - 2 - スクシニルグリセロール ; 1 - ヘキサデシル - 2 - パルミトイルグリセロホスホエタノールアミンおよびパルミトイルホモシステイン、および / またはそれらの組合せが挙げられる。

#### 【 0 0 4 2 】

好ましくは、脂質が膜形成リン脂質であり、より好ましくは、この膜形成リン脂質材料が飽和リン脂質または合成不飽和リン脂質またはそれらの混合物より選択され得る。適当なリン脂質の例は、飽和合成レシチン類、例えばジミリストイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリンもしくはジアラキドイルホスファチジルコリン、または不飽和合成レシチン類、例えばジオレイルホスファチジルコリンもしくはジリノレイルホスファチジルコリン、または混合鎖ホスファチジルコリン類、例えばモノオレイルモノパルミトイルホスファチジルコリンであるが、飽和リン脂質が好ましい。より一層好ましくは、飽和リン脂質は、飽和ホスファチジン酸、飽和ホスファチジルコリン、飽和ホスファチジルエタノールアミン、飽和ホスファチジルセリン、飽和ホスファチジルグリセロール、飽和ホスファチジリンシトール、飽和カルジオリピンおよび飽和スフィンゴミエリンより選択され得る。特に好ましいのは、以下の群 : ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミンまたはジアラキドイルホスファチジルエタノールアミン ; またはジオレイルホスファチジルエタノールアミン、またはジリノレイルホスファチジルエタノールアミン、前記のいずれかのフッ素化類似体、前記のいずれかの混合物より選択される飽和リン脂質であり、飽和ホスファチジルコリンが好ましい。

10

20

#### 【 0 0 4 3 】

コレステロール等の添加剤および他の物質も、0ないし50重量%の範囲の割合で前記脂質の1種以上に任意的に添加し得る。そのような添加剤としては、膜形成界面活性剤と混合して使用でき、かつ、それらの大部分が既知である他の非リン脂質界面活性剤が含まれ得る。例えば、ポリオキシプロピレングリコールおよびポリオキシエチレングリコールならびにそれらの共重合体、エルゴステロール、フィトステロール、シトステロール、ラノステロール、トコフェロール、没食子酸プロピル、パルミチン酸アスコルビルおよびブチル化ヒドロキシトルエン、脂肪酸、例えばミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキドン酸またはそれらの誘導体のような化合物が挙げられる。特に好ましいのはパルミチン酸である。これらの非膜形成界面活性剤の量は、通常は界面活性剤の全量の50重量%までであるが、好ましくは0ないし30%である。

30

#### 【 0 0 4 4 】

このカテゴリーには、気液界面で結合した界面活性剤の非常に薄い層により気体 / 液体界面で気泡が境界つけられた水性懸濁液が含まれる。本発明に使用できる調製容易なマイクロバブル懸濁液は、例えば EP 474833 ( US 5,271,928 )、US 5,380,519、US 5,531,980、US 5,567,414、US 5,643,553、US 5,658,551、US 5,911,972に開示されており、それらの全体が参照により本願に取り込まれる。これらの懸濁液は、層状または層板状の形態の膜形成界面活性剤、および任意的に親水性安定剤を含有する。これらのマイクロバブルは、両親媒性化合物、すなわち親水性部分と疎水性部分をもった化合物の1またはそれ以上の単分子層によって安定化される。これらの特許はまた、水性キャリア液体との混合により、その後本発明で使用可能であるマイクロバブルの無菌懸濁液を生成することになる乾燥組成物も開示している。好ましい懸濁液は、膜形成界面活性剤としてリン脂質、および任意的に親水性安定剤を含有する。リン脂質の全濃度は、全脂質濃度の0.01% ~ 20%の範囲とすることができ、好ましくは0.01 ~ 10% ( w / w ) の間、より一層好ましくは0.1 ~ 1% ( w / w ) の間であってよい。マイクロバブルの濃度は $10^7$ ないし $10^{10}$ 泡 / mLの範囲とすることができ、好ましい濃度は $10^8$ ないし $10^9$ 泡 / mLである。マイクロバブル懸濁液は複数ヶ月間安定な状態のままである。

40

50

## 【 0 0 4 5 】

好ましいリン脂質単分子層安定化マイクロバブルは、例えばUS 5,445,813 ; US 5,597,549 ; US 5,686,060 ( シュナイダー (Schneider) ら )、US 5,413,774 ; US 5,578,292 ( シュナイダー (Schneider) ら )、US 5,556,610 ; US 5,846,518 ( ヤン (Yan) ら ) ; US 5,827,504 ( ヤン (Yan) ら ) にも開示されており、それらの全体が参照により本願に取り込まれる。

## 【 0 0 4 6 】

本発明に有用な他のマイクロバブルには、例えばUS 5,798,091 ( トレビーノ (Trevino) ら ) および WO 97/29783 ( USを指定するナイコメッド (Nycomed)、EP 881 915 も ) が含まれ、それらの全体が参照により本願に取り込まれる。

## 【 0 0 4 7 】

例えば、US 5,798,091は、少なくとも第1界面活性剤および第2界面活性剤の層によって取り囲まれた複数の気泡を含んで成るガスエマルジョンであると述べられるものを開示している。第1界面活性剤は、全界面活性剤の少なくとも約5% w/wの、少なくとも10炭素原子数を含む、少なくとも1種のアシル鎖を有する疎水性リン脂質またはリン脂質混合物である。第2界面活性剤もリン脂質またはリン脂質混合物であっても又はなくともよいが、これは第1界面活性剤として供給されるリン脂質またはリン脂質混合物よりも親水性である。好ましい第2界面活性剤は、リン脂質、ホスホコリン類、リゾリン脂質、非イオン性界面活性剤、中性もしくは陰イオン性界面活性剤、中性でも又は陰イオン性でもよいフッ素化界面活性剤、およびそのような乳化剤または発泡剤の組合せから成る群より選択してよい。第2界面活性剤として有用である幾つかの特定の例としては、ポリオキシプロピレンとポリオキシエチレンのブロック共重合体 ( そのような分類の化合物の例はブルロニックF-68のようなブルロニックである )、糖エステル類、脂肪アルコール類、脂肪族アミノオキシド類、ヒアルロン酸脂肪族エステル類、ヒアルロン酸脂肪族エステル塩、ドデシルポリ ( エチレンオキシ ) エタノール、ノニルフェノキシポリ ( エチレンオキシ ) エタノール、誘導体化デンプン類 ( derivatized starches )、ヒドロキシエチルデンプン脂肪酸エステル類、脂肪酸の塩、市販の食用植物デンプン類、デキストラン脂肪酸エステル類、ソルビトール脂肪酸エステル類、ゼラチン、血清アルブミン類、およびそれらの組合せが挙げられる。同様に第2界面活性剤として考慮されるのは、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル類、例えばポリオキシエチレンステアレート類、ポリオキシエチレン脂肪アルコールエステル類、ポリオキシエチル化ソルビタン脂肪酸エステル類、グリセロールポリエチレングリコールオキシステアレート、グリセロールポリエチレングリコールレチノレート、エトキシ化大豆ステロール類、エトキシ化ヒマシ油、およびそれらの水素添加誘導体。加えて、非イオン性アルキルグルコシド類、例えばトゥイーン ( Tween (登録商標) )、スパン ( Span (登録商標) ) およびブリジ ( Brij (登録商標) ) も第2界面活性剤として使用し得る。

## 【 0 0 4 8 】

WO 9729783には、前記両親媒性物質が正味の電荷を帯びた分子を主に含むリン脂質から実質的に成ることを特徴とするリン脂質含有両親媒性物質によって安定化されたガスマイクロバブル ( 微粒気泡 ) の注射可能な水性キャリア液体中の懸濁液を含む、診断研究用コントラスト剤 ( 造影剤 ) が与えられている。コントラスト剤中のリン脂質材料の望ましくは少なくとも75%、好ましくは実質的に全てが、調製および/または使用の条件下で正味の全体電荷を帯びた分子 ( その電荷は正であっても又はより好ましくは負でもあってよい ) から成る。正に帯電したリン脂質の代表例としては、例えばヒドロキシエチレンジアミンのようなアミノアルコール類を有するジステアロイルホスファチジン酸またはジパルミトイルホスファチジン酸のようなホスファチジン酸のエステル類が挙げられる。負に帯電したリン脂質の例としては、天然産生 ( 例えば大豆または卵黄由来の )、半合成 ( 例えば部分的に又は完全に水素添加された ) および合成のホスファチジルセリン類、ホスファチジルグリセロール類、ホスファチジイノシトール類、ホスファチジン酸およびカルジオリピンが挙げられる。そのようなリン脂質の脂肪酸アシル基は各々が、通常、例えばパルミトイル基およびステアロイル基にあるような14~22炭素原子数を含む。そのよ

10

20

30

40

50

うな帯電したリン脂質のリゾ形も有用であり、「リゾ」(lyso)という用語は1つの脂肪酸アシル基のみを含有するリン脂質を表わし、これは好ましくはグリセリル部分の1位炭素原子にエステル結合される。そのような帯電したリン脂質のリゾ形は2つの脂肪酸アシル基を含有する帯電したリン脂質と混合して使用し得るのが有利である。

【0049】

本発明において有用な好ましいガス充填マイクロバブル懸濁液は、例えば以下の特許：EP 554213；US 5,578,292；EP 744962；EP 682530；US 5,556,610；EP 474833；US 5,567,414；EP 619743；US 5,597,549に従って行うことができ、それらの全体が参照により本願に取り込まれる。

【0050】

マイクロバブル懸濁液が調製される方法とは無関係に、肺系を通じての自由な通過を可能とするとともに共鳴を実現するためには、0.1～10 $\mu$ mの平均径を有するマイクロバブルを使用するのが便宜である場合がある。本発明で用いられるマイクロバブルは、超音波検査法用に好ましい範囲内のマイクロバブル分散のための非常に狭小なサイズ分布をもって製造することができ、それにより該マイクロバブルのエコー発生性のみならず生体内(in vivo)での安全性をも大きく向上させ、該マイクロバブルをそのような適用に特に有利なものとする。

【0051】

第2のカテゴリーは、天然または合成ポリマーでできた固体材料エンベロープ(外皮)を備えたコントラスト剤を含む。この場合に、そのガス充填体がマイクロバルーンと称される。「マイクロバルーン」または「マイクロカプセル」という用語は、境界またはエンベロープ(外皮)すなわちポリマー膜壁を備えたガス充填体を指す。例えばUS 5,580,575(アンガー(Unger))によるガス充填リポソームもこのカテゴリーに属し、参照により本願に取り込まれる。更にこれらに基づき異なる配合物がEP-A-0 324 938(US 4,844,882、ウィダー(Widder)ら)、US 5,711,933(ビション(Bichon)ら)、US 4,900,540(ライアン(Ryan))、US 5,230,882(アンガー(Unger))、US 4,718,433(ファインスタイン(Feinstein))、US 4,774,958(ファインスタイン(Feinstein))、WO 9501187(米国を指定するMBI)、US 5,529,766(ナイコメッド(Nycomed))、US 5,536,490(ナイコメッド(Nycomed))、US 5,990,263(ナイコメッド(Nycomed))に見出され、それらの内容が参照により本願に取り込まれる。

【0052】

本発明に特に有用となり得るマイクロバルーンとしては、柔軟かつ弾性の膜によって境界つけられた耐圧性マイクロバルーンが含まれ、これは圧力の変動下で一時的に変形可能で、高いエコー発生性が付与されており、生分解性である。

【0053】

ポリマー性マイクロバルーンとしては、注射可能なマイクロバルーンのエンベロープまたは境界膜を構成するポリマーを、大抵の親水性、生分解性、生理学的適合性のポリマーから選択し得る。そのようなポリマーとしては、低水溶性の多糖類、ポリラクチド類およびポリグリコリド類ならびにそれらの共重合体、 $\epsilon$ -カプロラクトン、 $\gamma$ -バレロラクトン等のラクトン類とラクチド類との共重合体およびポリペプチド類が含まれる。他の適当なポリマーとしては、ポリ(オルト)エステル類(例えばUS 4,093,709；US 4,131,648；US 4,138,344；US 4,180,646を参照、参照により本願に取り込まれる)；ポリ乳酸およびポリグリコール酸ならびにそれらの共重合体、たとえばデクソン(DEXON)(J. Heller, Biomaterials 1 (1980), 51を参照、その全体が参照により取り込まれる)；DL-ラクチド- $\epsilon$ -カプロラクトン共重合体(poly(DL-lactide-co- $\epsilon$ -caprolactone))、DL-ラクチド- $\gamma$ -バレロラクトン共重合体(poly(DL-lactide-co- $\gamma$ -valerolactone))、DL-ラクチド-g-ブチロラクトン共重合体(poly(DL-lactide-co-g-butylolactone))、ポリアルキルシアノアクリレート類；ポリアミド類；ポリヒドロキシ酪酸；ポリジオキサノン；ポリ- $\alpha$ -アミノケトン類(Polymer 23 (1982), 1693, その全体が参照により取り込まれる)；およびポリ無水物が挙げられる。生分解性ポリマーについての言及はR.ラ

10

20

30

40

50

ンガー (Langer) ら, Micromol. Chem. Phys. C23 (1983), 61-126に見出すことができ、その全体が参照により取り込まれる。ポリグルタミン酸およびポリアスパラギン酸等のポリアミノ酸だけでなく、それらの誘導体すなわち低級アルコールもしくはグリコールとの部分エステル類も使用できる。そのようなポリマーの1つの有用な例はポリ(t-ブチル-グルタメート)である。メチオニン、ロイシン、バリン、プロリン、グリシン、アラニン等の他のアミノ酸との共重合体も可能である。近年、制御された生分解性をもったポリグルタミン酸およびポリアスパラギン酸の幾つかの新規な誘導体が報告されている(US 4,892,733; US 4,888,398およびUS 4,675,381を参照、それらの全体が参照により本願に取り込まれる)。モノ-、ジ-およびトリグリセリド類、脂肪酸、ステロール類、ワックス類およびそれらの混合物より選択される生分解性、水不溶性であって室温で固体の脂質も、本発明によるマイクロバルーンの製造に使用し得る(WO 96/15815を参照、その全体が参照により本願に取り込まれる)。マイクロバルーンを製造するための非生分解性ポリマーは、大抵の非水溶性、生理学的許容可能、生体抵抗性ポリマー、例えばポリオレフィン類(ポリスチレン)、アクリル樹脂(ポリアクリレート、ポリアクリロニトリル)、ポリエステル類(ポリカーボネート)、ポリウレタン類、ポリ尿素およびそれらの共重合体より選択できる。ABS(アクリル・ブタジエン・スチレン)が好ましい共重合体である。

10

## 【0054】

膜の性質、例えば強さ、弾性および生分解性は、制御できる。添加剤をマイクロバルーンのポリマー壁に取り込んで、分散性、弾性、水透過性等の物性を変更できる。有用な添加剤のうちで、水透過性を減少させるべくマイクロバルーン膜を「疎水性化」(hydrophobize)できる化合物、例えば脂肪、ワックス、高分子量炭化水素を挙げることができる。注射可能な液体キャリア中のマイクロバルーンの分散性を改善する添加剤は、リン脂質等のような両親媒性化合物であり、それらは水透過性および生分解性の速度も増大させる。本発明のマイクロバルーンのポリマー形成膜に取り込まれる添加剤の量は、必要性に依存し、極めて大幅に変えることができる。場合によっては添加剤が全く使用されず、また場合によってはポリマーの重量の約20%に達する添加剤の量も可能である。

20

## 【0055】

安定化された又はカプセル化された気泡の第3のカテゴリーは、マイクロ粒子、該マイクロ粒子の気孔内に取込まれたガスマイクロバブルを運搬するポリマーまたは他の固体の多孔性粒子の懸濁液である。マイクロ粒子の凝集体を含む、これらの系はガスがその中に封じ込められ又はそれと会合している(例えば、参照によりその全体が本願に取り込まれるEP 0122 624、EP 0123 235、EP 0365 467、US 5,558,857、US 5,607,661、US 5,637,289、US 5,558,85、US 5,137,928、WO 9521631またはWO 9313809に記載されているように、例えばその表面に吸着され及び/又はその中の空隙、空洞または気孔内に封じ込められている)。

30

## 【0056】

本発明に使用されるカプセル化された又は安定化された気泡(安定化されたマイクロバブル、マイクロバルーンまたはマイクロ粒子の懸濁液)は、医薬的に許容可能な水性液体キャリアで投与し得るのが便宜である。安定な液体キャリアは、水、生理食塩水等の水溶液(注射用最終製品が低張性でないように平衡化されるのが有利である)、あるいは塩類または糖類、糖アルコール類、グリコール類および他の非イオン性ポリオール物質(例えばグルコース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、グリセロール、ポリエチレングリコール類など)の1種以上の張性調節物質の溶液である。実際には、全ての注射可能な組成物は血液と可能な限り等張性であるべきである。等張性剤は医薬品で慣用される生理学的溶液であり、それらは生理食塩水溶液(0.9% NaCl)、2.6%グリセロール溶液、5%デキストロース溶液等を含む。

40

## 【0057】

他の賦形剤も、望ましければ、乾燥される組成物中に存在してよいし、又は投与用の配合物に添加してよい。そのような賦形剤としては、例えば、pH調整剤、浸透圧調整剤、粘度向上剤、乳化剤、増量剤等が挙げられ、通常用量で使用し得る。

50

## 【0058】

カプセル化された又は安定化された気泡は、フッ素化ガス、例えば、六フッ化硫黄、トリフルオロメチルスルファペンタフルオリド、フレオン類 (Freons (登録商標)) (例えば  $C_2F_6$ 、 $C_3F_8$ 、 $C_4F_{10}$ 、 $C_2F_4$ 、 $C_2F_2$ 、 $C_2F_6$ 、 $C_2ClF_5$ 、 $CBrClF_2$ 、 $CBr_2F_2$ 、 $C_3F_8$  および  $C_4F_{10}$  ならびにそれらの混合物等のような 1 以上の炭素原子およびフッ素を含有する有機化合物)、およびペルフルオロカーボン類; 空気; 窒素; 酸素; 二酸化炭素; 水素; 一酸化二窒素; 不活性ガス、例えばヘリウム、クリプトン、キセノンおよびアルゴン; 超偏極 (hyperpolarized) ガス; 低分子量炭化水素 (例えば 7 炭素原子数までを含有するもの)、例えばメタン、エタン、プロパン、ブタンもしくはペンタン等のアルカン、シクロブタンもしくはシクロペンタン等のシクロアルカン、プロペンもしくはブテン等のアルケン、またはアセチレン等のアルキレン; エーテル; ケトン; エステル; ハロゲン化低分子量炭化水素 (例えば 7 炭素原子数までを含有するもの); または前記のいずれかの混合物; からなる群より選択されたガスまたはガス混合物で充填されている。ハロゲン化ガス中のハロゲン原子の少なくとも幾つかがフッ素原子であるのが有利である。

10

## 【0059】

生体適合性のハロゲン化炭化水素ガスは、例えば、ブromoklorodifluorometan、クロロジフルオロメタン、ジクロロジフルオロメタン、ブromotri fluorometan、クロロトリフルオロメタン、クロロペンタフルオロエタン、ジクロロテトラフルオロエタン、およびペルフルオロカーボン類、例えばペルフルオロアルカン類、例えばペルフルオロメタン、ペルフルオロエタン、ペルフルオロプロパン、ペルフルオロブタン類 (例えば任意的にペルフルオロイソブタン等の他の異性体と混合されているペルフルオロ - n - ブタン)、ペルフルオロペンタン類、ペルフルオロヘキサン類およびペルフルオロヘプタン類、ペルフルオロオクタン類、ペルフルオロノナン類、ペルフルオロデカン類; ペルフルオロアルケン類、例えばペルフルオロプロペン、ペルフルオロブテン類 (例えばペルフルオロブト - 2 - エン) およびペルフルオロブタジエン類; ペルフルオロアルキン類、例えばペルフルオロブト - 2 - イン; およびペルフルオロシクロアルカン類、例えばペルフルオロシクロブタン、ペルフルオロメチルシクロブタン、ペルフルオロジメチルシクロブタン類、ペルフルオロトリメチルシクロブタン類、ペルフルオロシクロペンタン、ペルフルオロメチルシクロペンタン、ペルフルオロジメチルシクロペンタン類、ペルフルオロシクロヘキサン、ペルフルオロメチルシクロヘキサンおよびペルフルオロシクロヘプタンより選択し得る。他のハロゲン化ガスとしては、フッ素化、例えば過フッ素化されたケトン類、例えばペルフルオロアセトン、およびフッ素化、例えば過フッ素化されたエーテル類、例えばペルフルオロジエチルエーテルが挙げられる。空気、酸素、窒素、ヘリウムまたは  $CO_2$  とともに、六フッ化硫黄、ペルフルオロカーボン類、例えばペルフルオロプロパンまたはペルフルオロブタンまたはそれらの混合物を含有するコントラスト剤が好ましく、 $SF_6$  および  $C_4F_{10}$  を含有するコントラスト剤が特に好ましい。

20

30

## 【0060】

ガスは上記ガスの混合物とすることができる。特に以下の組合せが特に好ましい: ガス (A) および (B) の混合物であって、0.5 ~ 41 体積% の間の量で存在するガス (B) の少なくとも 1 種が 80 ダルトンよりも大きな分子量を有し、(B) が  $SF_6$ 、 $C_2F_6$ 、 $C_2F_8$ 、 $C_3F_6$ 、 $C_3F_8$ 、 $C_4F_6$ 、 $C_4F_8$ 、 $C_4F_{10}$ 、 $C_5F_{10}$ 、 $C_5F_{12}$  およびそれらの混合物からなる群より選択され、(A) が空気、酸素、窒素、二酸化炭素およびそれらの混合物からなる群より選択され、該混合物の残量がガス (A) である、混合物。

40

## 【0061】

さらに、上述のように、コントラスト剤はガス前駆体 (例えば通常のヒトの体温 (37) で部分的にガス状態にある化合物または化合物混合物、すなわち  $C_5F_{12}$ 、 $C_6F_{14}$  シクロヘキサン、シクロオクタン、ヘキサン、シクロペンタン等) を含んでよい。特に好ましいのは 20 ないし 80 の沸点をもったガス前駆体である。ガス前駆体は単独で又はガスもしくは他のガス前駆体と組み合わせて使用し得る。

50

## 【 0 0 6 2 】

以上の説明は以下の実施例を参照して更に十分に理解されるだろう。しかしながら、そのような実施例は本発明を実施する方法の典型例であって、本発明の範囲を限定することが意図されるものではない。

## 【実施例】

## 【 0 0 6 3 】

## 実施例 1 :

図 4 は、コンピュータシミュレーションにより得られた、 $2.2 \mu\text{m}$ の半径をもった空気泡について時間の関数としてのサブおよびウルトラハーモニックエネルギー曲線（それぞれ上および下）を示す。明細書に記載されるように、これらの曲線は周囲液体圧力の異なる値について計算された。この液体圧力は過剰圧力すなわち  $760 \text{ mmHg}$  の大気圧を超える圧力値により示されている。過剰圧力の値は  $0$ 、 $50$ 、 $100$  および  $200 \text{ mmHg}$  である。異なる線はそれぞれのエネルギー曲線を示す。これらの曲線から、式 (2) に従って平均応答時間が計算され、平均サブおよびウルトラハーモニック応答時間についての値が表 1 の第 3 および第 4 欄にそれぞれ与えられる。参照として、空気泡が完全に消失するための時間が過剰圧力の関数として式 (1) により計算され、第 2 欄に与えられる。当該新たな方法では、異なる圧力（行と行の間の差）に対するサブおよびウルトラハーモニック応答時間（第 3 および第 4 欄）の差を見ることによって、消失時間を測定するよりも高いか又は類似の感度を得ることができることが明らかである。さらに、当該新たな方法の有意な利点は、全消失時間（第 2 欄）を測定するための取得時間と比較して取得時間が遥かに短い（ $2 \sim 3$  倍）ことであり、これは当該方法のリアルタイム用途にとって重要である。

## 【 0 0 6 4 】

## 【表 1】

表 1. 過剰圧力の関数としての消失時間 $t_d$ 、サブハーモニックについての平均応答時間 $t_{\text{sub}}$  およびウルトラハーモニックについての平均応答時間 $t_{\text{ul}}$

Pov [mmHg]	$t_d$ [ms]	$t_{\text{sub}}$ [ms]	$t_{\text{ul}}$ [ms]
0	120.8	51.0	51.5
50	112.7	42.6	43.1
100	105.7	35.7	36.4
200	94.1	26.7	27.0

## 【 0 0 6 5 】

## 実施例 2 :

この実施例は、コンピュータシミュレーションにより得られた、 $2.2 \mu\text{m}$ の半径をもった空気泡について  $10 \text{ mmHg}$  の臨床関連圧力差を測定するための当該新たな方法の感度を示す。この実施例の結果を表 2 に示す。過剰圧力は  $10 \text{ mmHg}$  ずつ  $80$  ないし  $120 \text{ mmHg}$  までの範囲にある。消失時間（表 2 の第 2 欄）の差は  $10 \text{ mmHg}$  の圧力変化当たり  $1.2$  ないし  $1.4 \text{ ms}$  の範囲にある。サブハーモニック（表 2 の第 3 欄）について

の平均応答時間の差は 1.7 ないし 2.7 ms の範囲にある。ウルトラハーモニック（表 2 の第 4 欄）についての平均応答時間の差は 2.1 ないし 2.8 ms の範囲にある。このことは、当該新たな方法を用いることにより、気泡の完全消失を考慮する方法と比較して感度が 40 ~ 100 % も増大したことを意味する。

【 0 0 6 6 】

【 表 2 】

表 2. 過剰圧力の関数としての消失時間 $t_d$ 、サブハーモニックについての平均応答時間 $t_{sub}$  およびウルトラハーモニックについての平均応答時間 $t_{ul}$

10

Pov [mmHg]	$t_d$ [ms]	$t_{sub}$ [ms]	$t_{ul}$ [ms]
80	108.4	40.2	41.3
90	107.0	37.5	38.5
100	105.7	35.7	36.4
110	104.4	34.0	34.0
120	103.2	32.1	31.5

20

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 6 7 】

【 図 1 】 式 ( 1 ) を用いることにより計算された水中での異なるガスの 2.2  $\mu$ m 泡についての半径 - 時間曲線である。 30

【 図 2 】 式 ( 1 ) を用いることにより計算された 0 および 200 mmHg 過剰圧力における水中での 2.2  $\mu$ m 空気泡についての半径 - 時間曲線である。

【 図 3 A 】 式 ( 1 ) を用いることにより計算された 0 mmHg 過剰圧力における水中での 2.2  $\mu$ m 空気泡についての半径 - 時間曲線である。

【 図 3 B 】 放出後 25 ms での 2.2  $\mu$ m 空気泡のサブおよびウルトラハーモニック応答ならびに関連スペクトルである。

【 図 3 C 】 放出後 45 ms での 2.2  $\mu$ m 空気泡のサブおよびウルトラハーモニック応答ならびに関連スペクトルである。

【 図 3 D 】 放出後 60 ms での 2.2  $\mu$ m 空気泡のサブおよびウルトラハーモニック応答ならびに関連スペクトルである。 40

【 図 4 】 異なる過剰圧力についてのエネルギー - 時間曲線である。

【 図 1 】

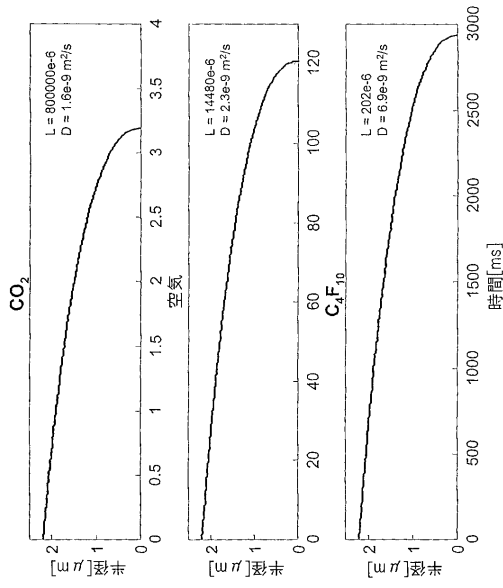


FIG. 1.

【 図 2 】

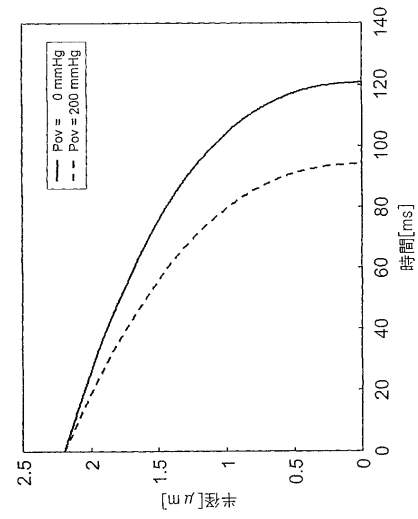


FIG. 2.

【 図 3 A 】

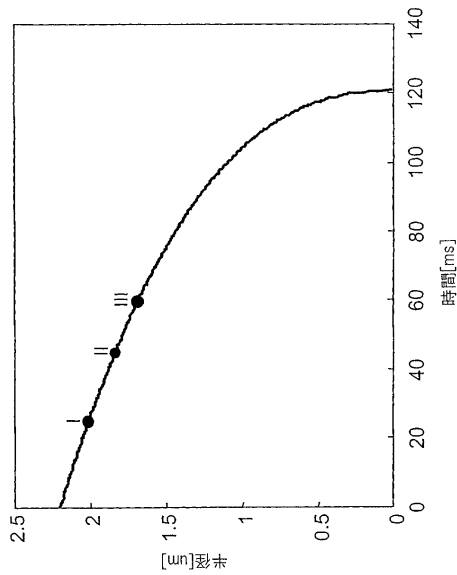


FIG. 3A.

【 図 3 B 】

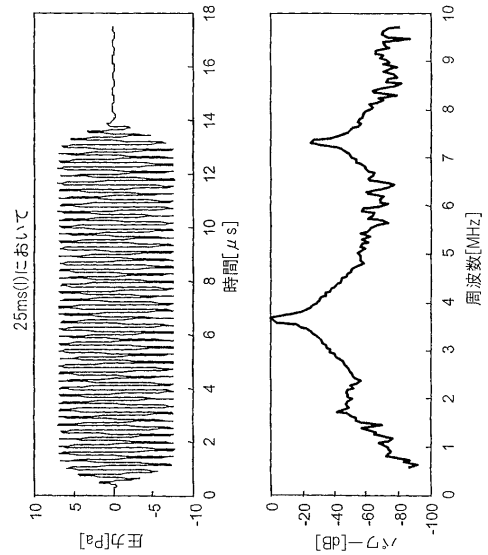


FIG. 3B.

【 図 3 C 】

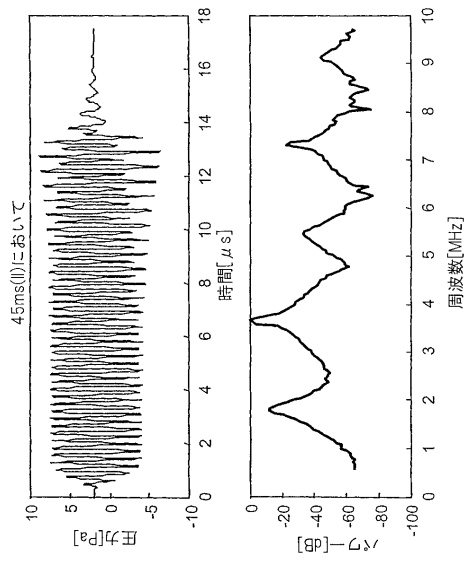


FIG. 3C.

【 図 3 D 】

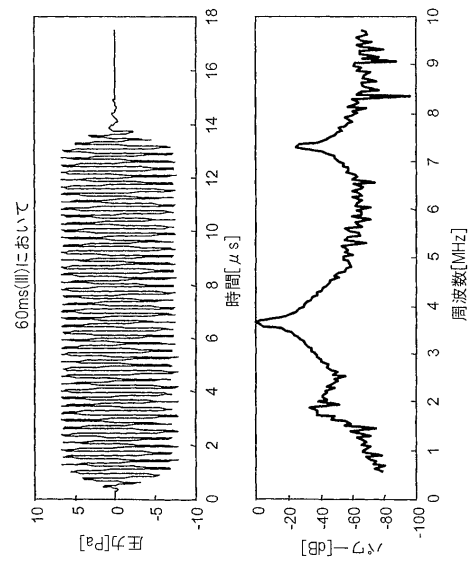


FIG. 3D.

【 図 4 】

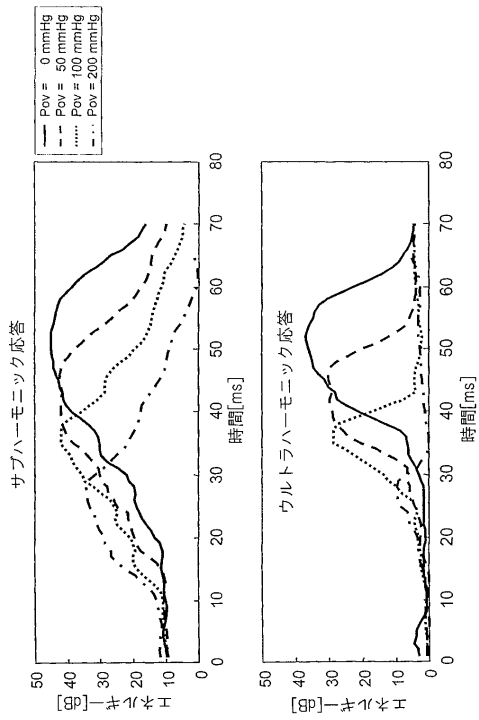


FIG. 4.

## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
17 October 2002 (17.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/080774 A2

(51) International Patent Classification: **A61B 8/00** J., A. [NI/CH]; 23, rue du XXXI Décembre, CH-1207 Genève (CH), **ARDITI, Marcel** [CH/CH]; 27, rue Daubin, CH-1203 GENEVA (CH).

(21) International Application Number: PCT/IB02/01229

(22) International Filing Date: 5 April 2002 (05.04.2002) (81) Designated States (national): AU, CA, JP, US.

(25) Filing Language: English (84) Designated States (regional): European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LI, MC, NL, PT, SE, TR).

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/281,794 6 April 2001 (06.04.2001) US Declaration under Rule 4.17:  
— of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only

(71) Applicant (for all designated States except US): **BRACCO RESEARCH S.A.** [CH/CH]; 31, route de la Galaise, CH-1228 Plan-les-Ouates (CH). Published:  
— without international search report and to be republished upon receipt of that report

(72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): **FRINKING, Peter,**

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/080774 A2

(54) Title: METHOD FOR IMPROVED MEASUREMENT OF LOCAL PHYSICAL PARAMETERS IN A FLUID-FILLED CAVITY

(57) Abstract: The present invention relates to remotely determining local physical parameters in a fluid-filled cavity (e.g. heart cavities, blood vessels, industrial container) by means of ultrasound waves and encapsulated or stabilised gas bubbles. A measuring method, a method of diagnostic ultrasound of the same and an apparatus for remotely determining ambient physical local parameters of a fluid-filled cavity are disclosed.

WO 02/080774

PCT/IB02/01229

**Method for improved measurement of local physical parameters  
in a fluid-filled cavity.**

5

Technical Field

The present invention relates to a noninvasive measuring method for remotely determining local physical parameters of a fluid-filled cavity, by means of ultrasound waves and encapsulated or stabilized gas bubbles (e.g. suspensions of stabilized microbubbles, microballoons or microparticles comprising gas).

Background of the Invention

Physiological parameters of the cardiovascular system, such as blood pressure, temperature and gas concentration are important since they provide essential information concerning the state of health of organs and the patient. Currently, dynamic blood pressure measurements are mainly performed by catheterization, consisting of a pressure-sensing catheter that is inserted into the heart chamber or blood vessel, or by Doppler echocardiography using the simplified Bernoulli equation (Burton C. Physiology and biophysics of the circulation. 2<sup>nd</sup> edition. Chicago, 1972). The first method is accompanied by the disadvantages of an invasive procedure, i.e. creating pain and risk of infection. The second, noninvasive method does not provide reliable or reproducible blood pressure values (Strauss AL, Roth FJ, Rieger H. "Noninvasive assessment of pressure gradients across iliac artery stenoses: duplex and catheter correlative study" *J Ultras Med* 1993; 12: 17-22).

30

Alternative techniques are described in the literature and are mainly based on the interaction of ultrasound waves with individual gas bubbles (Fairbank W, Scully M. "A new noninvasive technique for

WO 02/080774

PCT/IB02/01229

2

cardiac pressure measurement: resonant scattering of ultrasound from bubbles" *IEEE Trans Biomed Eng* 1977; 24: 107-110; H6k B. "A new approach to noninvasive manometry: interaction between ultrasound and bubbles" *Med Biol Eng Comput* 1981; 19: 35-39;

5 Tickner EG. "Precision microbubbles for right side intracardiac pressure and flow measurements" *Meltzer RS and Roelandt JTCR*, ed. Contrast echocardiography; London: Martinus Nijhoff, 1982; 15: 313-324; Ishihara K et al. "New approach to noninvasive manometry based on pressure dependent resonant shift of elastic microcapsules

10 in ultrasonic frequency characteristics" *Jap J App Phys* 1988; 27: 125-127; DE 29 46 662 A1 (Siemens AG); EP 0 296 189 B (Schering AG); US 4,483,345 (Miwa).

Due to the high compressibility of gas, the size of a gas bubble changes as a function of the local hydrostatic pressure. This change in size affects the acoustic characteristics of the gas bubble, like resonance frequency, scattering and attenuation cross-section, etc. Therefore, the local pressure in a fluid-filled cavity can be derived from these acoustic characteristics.

20

Recent attempts to utilize gas bubbles to noninvasively assess the pressure in fluid filled cavities (De Jong et al. WO 98/32378 (Andaris Ltd.); Shi et al. WO 99/47045) have been hampered by inaccuracy and insensitivity

25

De Jong et al. WO 98/32378 (Andaris Ltd.) and Bouakaz et al. ("Noninvasive measurement of the hydrostatic pressure in a fluid-filled cavity based on the disappearance time of micrometer-sized free gas bubbles" *Ultrasound in Medicine and Biology* 1999; 25: 1407-1415) disclosed a method for noninvasive measurement of the local pressure involving injection of what are referred to as gas containing microcapsules into the circulatory system. By transmitting a low

30 frequency, high amplitude ultrasound burst, free-gas bubbles are

WO 02/080774

PCT/IB02/01229

3

released from the gas containing microcapsules into the region where the local pressure is to be measured. The disappearance time of the released free gas depends on the local pressure and is used for noninvasive determination of the local pressure. In this application, the total response of the released gas bubbles (fundamental and second harmonic) is used to calculate the disappearance time. The Bouakaz article stated that this method is inaccurate for detecting small pressure changes on the order of 5-10 mmHg, which are clinically relevant (Bouakaz et al. "Noninvasive measurement of the hydrostatic pressure in a fluid-filled cavity based on the disappearance time of micrometer-sized free gas bubbles" *Ultrasound in Medicine and Biology* 1999; 25: 1407-1415).

Shi et al. WO 99/47045, stated that an excellent correlation exists between the amplitude of subharmonic signals generated by microbubbles and the local pressure. Thus, they suggested that sub and ultraharmonic amplitude may be used to noninvasively to estimate the local pressure, asserting that subharmonic amplitudes are a much better indicator of pressure variation than fundamental and second harmonic amplitudes. However, the difference in sub- and/or ultraharmonic amplitude is very small for pressure changes ranging from 5-10 mmHg (Shi et al. "Pressure dependence of subharmonic signals from contrast microbubbles" *Ultrasound in Medicine and Biology* 1999; 25: 275-283). Therefore, this method is also lacking sensitivity when detecting small pressure changes. Secondly, this method strongly depends on the size of the bubbles at the location where the pressure is to be measured. In the method disclosed in WO99/47045, after injection of the bubbles the size distribution will change due to lung filtration and microbubble uptake. Therefore, the exact size of the bubbles, and consequently the acoustic characteristics like sub- and ultraharmonic response, at the location of interest is unknown.

WO 02/080774

PCT/IB02/01229

4

It is an object of the present invention to provide a new method for accurate and sensitive, noninvasive measurement of the local physical parameters in a fluid-filled cavity. With this new method small pressure changes (5-10 mmHg) can be measured, which is the main limitation of the methods described by aforementioned references. Additionally, unlike the method disclosed in W099/47045, in the present method, the size of the bubbles at the location where the pressure is to be measured can be better controlled and, therefore, the acoustic characteristics of the bubbles at the site of interest are better specified, which makes the present invention more accurate. With reference to WO98/32378, the present invention entails shorter acquisition time, which makes it more efficient and more useful in the clinic.

This new method can provide clinicians with a valuable tool for determining the state of health of an organ without the risk of infection and with minimal patient discomfort. Moreover, it will be readily apparent to those skilled in the art that the present invention can be used as a general technique for remotely sensing physical parameters, for example in situations where direct measurement is impossible or too dangerous.

#### Summary of the invention

25

It is an object of the present invention to provide a technique for determining local physical parameters in a fluid-filled cavity by administering stabilized or encapsulated gas bubbles and monitoring the sub- and/or ultraharmonic response of the free gas bubbles released from these stabilized or encapsulated gas bubbles as a function of time.

WO 02/080774

PCT/IB02/01229

5

The stabilized or encapsulated gas bubbles useful in the invention may be divided into several categories : stabilized gasmicrobubbles, gas-filled microcapsules/microballoons, and gas containing microparticles according to the definitions given in for example, in EP 554213 and US 5,413,774.

The term "microbubble" specifically designates gas bubbles, in suspension in a liquid preferably also containing surfactants or tensides to control the surface properties and the stability of the bubbles. The term "microcapsule" or "microballoon" designates preferably air or gas-filled bodies with a material boundary or envelope, i.e. a polymer membrane wall. The term microparticle refers to gas-containing solid systems, for example microparticles (especially aggregates of microparticles) having gas contained therein or otherwise associated therewith (for example being adsorbed on the surface thereof and/or contained within voids, cavities or pores therein).

Free-gas bubbles, i.e. gas bubbles that are not stabilized by any means (gas bubbles which are neither stabilized by tensides or surfactants nor encapsulated by, for example, a polymer or contained in or associated with solids) are obtained from these stabilized or encapsulated gas bubbles by the destruction of the stabilized microbubbles, microballoons or microparticles by, for example, application of one or more ultrasound pulsed waves. The released free gas bubbles dissolve in the surrounding liquid. Consequently, the bubbles shrink and the sub- and/or ultraharmonic response, which is very sensitive to bubble size, changes as a function of time. The time for a gas bubble to completely dissolve in the surrounding liquid is a function of local parameters like gas concentration, temperature and pressure. Therefore, by monitoring the changes in sub- and/or ultraharmonic response of a free gas bubble as a function of time, these parameters can be measured non-invasively.

WO 02/080774

PCT/IB02/01229

6

The sub- and ultraharmonic responses of gas bubbles are very sensitive to their sizes. Consequently, the sub- and ultraharmonic responses of free gas bubbles are very sensitive to parameters that influence the bubble size. Therefore, by measuring the change in bubble size due to gas dissolving in the surrounding liquid, by means of the response of sub- and/or ultraharmonics as a function of time, an estimation of the local pressure or other parameters can be made.

10

#### Brief description of the drawings

- Figure 1. Radius-time curves for a 2.2- $\mu\text{m}$  bubble of different gases in water calculated by using equation (1).
- 15 Figure 2. Radius-time curves for a 2.2- $\mu\text{m}$  air bubble in water at 0 and 200 mmHg overpressure, calculated by using equation (1).
- Figure 3A. Radius-time curves for a 2.2- $\mu\text{m}$  air bubble in water at 0 mmHg overpressure, calculated by using equation (1).
- 20 Figure 3B. Sub- and ultraharmonic response and associated spectrum of a 2.2- $\mu\text{m}$  air bubble, 25 ms after release.
- Figure 3C. Sub- and ultraharmonic response and associated spectrum of a 2.2- $\mu\text{m}$  air bubble, 45 ms after release.
- Figure 3D. Sub- and ultraharmonic response and associated spectrum of a 2.2- $\mu\text{m}$  air bubble, 60 ms after release.
- 25 Figure 4. Energy-time curves for different overpressures.

30

#### Detailed description

One aspect of the present invention is to provide a noninvasive measuring method for remotely determining local physical parameters of a fluid-filled cavity, based on the combined use of encapsulated or

WO 02/080774

PCT/IB02/01229

7

stabilized gas bubbles and ultrasound waves, said measuring method comprising the steps of:

- a) administering stabilized or encapsulated gas bubbles to a fluid filled cavity;
- 5 b) applying with a transducer a first ultrasound pulsed wave or a train of pulsed waves to the fluid filled cavity to destroy the stabilized or encapsulated gas bubbles and generate free gas bubbles
- 10 c) applying with a transducer a second ultrasound pulsed wave or train of pulsed waves at a frequency specifically chosen for exciting the sub- and/or ultraharmonic response of the bubbles
- d) determining the mean response time.
- e) determining a value for a local physical parameter on  
15 the basis of the response time of step d)

It should be mentioned that the improved sensitivity for noninvasive measurement in a fluid-filled cavity as shown in this invention would not be obtainable by omitting one of the  
20 steps previously described.

For a better understanding of the invention, the local physical parameters considered here are the pressure, the temperature or the gas concentration.

25

Surprisingly, it has been found that the essential features of the invention lie in that the sub- and/or ultraharmonic responses of step b) are monitored as a function of time by successive ultrasound pulses, this function being an indication  
30 of the local physical parameter being measured. The method of the present invention provides improved accuracy and efficiency by measuring the sub- and ultraharmonic response as a function of time.

WO 02/080774

PCT/IB02/01229

8

The first ultrasound pulsed wave or train of pulsed waves is tuned in such a way (e.g. by adjusting its frequency and/or amplitude) that the size of the released free-gas bubbles is larger than the subharmonic size (as defined later in the specification).

Preferably, the frequency and amplitude of the first ultrasound pulsed wave or train of pulsed waves, to optimize gas release, can be chosen independently of the second ultrasound pulsed wave or train of pulsed waves, used for monitoring the sub- and/or ultraharmonic response.

Preferably, the frequency and amplitude of the second ultrasound pulsed wave or train of pulsed waves, used for monitoring the sub- and/or ultraharmonic response, can be chosen independently of the first ultrasound pulsed wave or train of pulsed waves, to optimize gas release.

The transducer used to apply the first ultrasound pulsed wave or train of pulsed waves can be the same as or distinct from that used for applying the second ultrasound pulsed wave or train of pulsed waves.

Viewed from a further aspect, the invention provides a method of diagnostic ultrasound for determining local physical parameters of a fluid-filled cavity "in situ", which comprises the steps of:

- a) administering to a subject a fluid agent comprising encapsulated or stabilised gas bubbles
- b) applying with a transducer a first ultrasound pulsed wave or a train of pulsed waves to generate free-gas bubbles

WO 02/080774

PCT/IB02/01229

9

c) applying with a transducer a second ultrasound pulsed wave or train of pulsed waves around a frequency specifically chosen for exciting the sub- and/or ultraharmonic response of the bubbles

d) determining the mean response time

5 e) determining a value for a local physical parameter on the basis of the response time of step d)

characterised in that the sub- and/or ultraharmonic responses of step c) are monitored as a function of time by successive ultrasound wave pulses, this function being an indication of the physical  
10 parameter being measured.

According to this method, said subject is a vertebrate, and said fluid agent containing encapsulated or stabilised gas bubbles is introduced into the vasculature or into a body cavity of said vertebrate.

15

Viewed from a further aspect, the invention provides an apparatus for carrying out the above method of measurement. This apparatus comprises elements found in ultrasound equipment, coupled with a specific software to generate the required excitations  
20 and monitoring transmit-pulse sequences, plus the signal-processing functions required for interpreting the observed responses as a function of the local physical parameters. The apparatus includes for example: timing circuits, at least one pulse or arbitrary waveform generator with amplifier, at least one transmit-transducer capable of  
25 projecting an ultrasound wave into the region of interest, at least one receive-transducer sensitive to the reflected ultrasound waves, at least one receiving circuit dedicated to the amplification and conditioning of the echo signals, analog or digital circuits dedicated to perform filtering of the echo responses from microbubbles, a Central  
30 Processing Unit capable of performing the required computations and comparisons with look-up tables to derive values of the local physical parameters, a memory for storing the required programs, look-up

WO 02/080774

PCT/IB02/01229

10

tables, signal data and computed values, and display means for presenting the computed values in a graphical or textual form.

In summary, the objective of the present invention relates to the remote measurement of local physical parameters in a fluid-filled cavity (e.g. heart cavities, blood vessels, industrial container, etc.) by means of ultrasound waves and encapsulated or stabilized gas bubbles, which are used as a vehicle for delivering free-gas bubbles to a site of interest. Stabilisation or encapsulation of the gas, by means of, for example, stabilizing with a tenside or surfactant, encapsulating a gas bubble by a wall or shell, or associating it with a solid prevents the gas content from rapidly dissolving in the surrounding liquid. At the site of interest, where for example the local pressure or other local parameters (like temperature, gas concentration, etc.) are to be measured, the stabilized or encapsulated structure is ruptured by means of ultrasound waves and the gas content is subsequently released. The release can be optimally tuned for releasing known-size free-gas bubbles e.g. by adjusting the frequency and/or the amplitude of the applied ultrasound wave (Frinking et al. "Scattering properties of encapsulated gas bubbles at high ultrasound pressures" *Journ. Acoust. Soc. Am.* 1999: 105; 1989-1996). Surprisingly, it has been found that free-gas bubbles are more susceptible to changes in environmental conditions, like changes in temperature, gas concentration or local pressure, compared to stabilized or encapsulated gas bubbles.

It is known that the radius of a free-gas bubble changes as a function of time according to:

$$\frac{dR}{dt} = \frac{DL}{R} \left[ 1 - \frac{2\sigma}{RP_0} \frac{P_{ex}}{P_0} \right] \left[ 1 + \frac{4\sigma}{3RP_0} \right] \quad (1)$$

WO 02/080774

PCT/IB02/01229

11

where

$R$  = radius of the bubbles

$t$  = time

$D$  = diffusion constant

5  $C_i/C_0$  = ratio of the dissolved gas concentration to the saturation  
concentration

$\sigma$  = surface tension

$P_0$  = atmospheric pressure

$L$  = Ostwald coefficient

10  $p_{ov}$  = overpressure.

The time for a free-gas bubble to completely dissolve in the surrounding liquid, i.e. the disappearance time, depends on the type of gas. This is reflected in equation (1) by the Ostwald coefficient and  
15 diffusion constant of a gas. For example, for a 2.2- $\mu\text{m}$  gas bubble the disappearance time is 3.2 ms for  $\text{CO}_2$ , 120.8 ms for air and 2936.6 ms for  $\text{C}_4\text{F}_{10}$  (Figure 1).

In a gas-saturated liquid, the dissolution of micron-sized free-  
20 gas bubbles is caused by a difference in gas concentration between the gas inside the bubble and inside the liquid due to surface tension and overpressure. In figure 2, for example, the radius-time curve for a 2.2- $\mu\text{m}$  air bubble in water is simulated at values of the overpressure of 0 mmHg and 200 mmHg. It is assumed that temperature and gas  
25 concentration are constant. The disappearance time is 120.9 and 94.1 ms, respectively.

The ultrasound parameters for releasing free gas bubbles are  
30 tuned in such a way (e.g. by adjusting its frequency and/or amplitude) that the size of the released bubbles is larger than the subharmonic size. The subharmonic size of a gas bubble is defined as

WO 02/080774

PCT/IB02/01229

12

the radius of the bubble for which the resonance frequency equals half the transmitted frequency ( $f_0$ ). After the release of known-size free-gas bubbles, gas dissolving into the surrounding liquid, i.e. the bubble size as a function of time, is monitored by means of  
5 ultrasound waves.

When the bubble size equals the subharmonic size, the response of the gas bubble to the monitoring ultrasound waves will show the appearance of subharmonics ( $1/2f_0$ ,  $1/3f_0$ ,  $3/4f_0$ ...) of the  
10 transmitted frequency. Additionally, the response of the gas bubble to the ultrasound waves will show the appearance of ultraharmonics ( $3/2f_0$ ,  $5/2f_0$ ...) of the transmitted frequency.

This is advantageously illustrated in figure 3, which shows the  
15 response of a 2.2- $\mu\text{m}$  air bubble to an ultrasound wave at different time instants during gas dissolution in the surrounding liquid at 0 mmHg overpressure (101.3 kPa). In this particular example, the subharmonic component is chosen to be  $1/2f_0$  and the ultraharmonic component is chosen to be  $3/2f_0$ . Figure 3A shows the radius-time  
20 curve of a 2.2- $\mu\text{m}$  air bubble in water. The three dots, I, II and III correspond to a bubble size greater than subharmonic size, at subharmonic size and smaller than subharmonic size, respectively. The corresponding time and frequency responses are shown in figures 3B, 3C and 3D for I, II and III, respectively.  
25

Surprisingly, the sub- and ultraharmonic responses of gas bubbles are very sensitive to their sizes. Consequently, the sub- and ultraharmonic responses of gas bubbles are very sensitive to  
30 parameters that influence the bubble size. Measuring the change in bubble size due to gas dissolving in the surrounding liquid, by means of the response of sub- and/or ultraharmonics as a function of time, an improved estimation of the local pressure or other parameters can be made. It should be mentioned that the improved sensitivity for

WO 02/080774

PCT/IB02/01229

13

noninvasive measurement in a fluid-filled cavity, as shown in this invention, is only obtainable by the combination of the sub- and/or ultraharmonic response and the disappearance time of the released gas bubbles.

5

After the release of a free-gas bubble with a radius larger than the subharmonic size, the sub- and ultraharmonic response amplitude of the gas bubble will increase until it reaches a maximum and subsequently decrease until it disappears. The mean sub- or ultraharmonic response time is defined as the mean time (weighted by for example the energy or correlation coefficient of the sub- or ultraharmonic response) for sub- or ultraharmonics to appear after the release of the gas from the stabilized or encapsulated gas bubble. In formula form this is:

15

$$\bar{T} = \frac{\sum_{t=t_1}^{t_2} t \times E(t)}{\sum_{t=t_1}^{t_2} E(t)}, \quad (2)$$

where

$\bar{T}$  = mean response time

$t$  = time

20  $E(t)$  = sub- or ultraharmonic energy or correlation at time  $t$

$t_1, t_2$  = time after the release of free-gas bubbles where the sub- or ultraharmonic energy is half the maximum energy.

As it is known by a person skilled in the art, absolute values of the local physical parameters can be derived from the mean response time, as calculated in equation 2, by comparing the calculated mean response time with predetermined values listed in calibration or look-up tables.

25

WO 02/080774

PCT/IB02/01229

14

The sub- and/or ultraharmonic component of the transmit frequency can be obtained by standard signal processing techniques, like digital band-pass filtering of the time responses. The energy of the sub- and/or ultraharmonic components of the transmit frequency as a function of time is obtained by taking the sum of the squared value of the filtered responses at each time point. The correlation of the sub- and/or ultraharmonic components of the transmit frequency as a function of time is obtained by taking the correlation between the filtered responses at two successive time instants, at each time point.

10

Special care is taken to tune the monitoring ultrasound waves in such a way (e.g. by adjusting its frequency and/or amplitude) as to generate sub- and ultraharmonics and to minimize rupture or destruction of the encapsulated gas-filled microparticles.

15

The suspensions of encapsulated or stabilised gas bubbles useful in the present invention may be divided into three categories: stabilized microbubbles; microballoons (also called microcapsules); and microparticles. Free-gas bubbles are not included in these categories since, due to their rapid dissolution in the surrounding liquid; they are not stable enough to reliably deliver gas bubbles to the area of interest. Interest has accordingly been shown in methods of stabilising gas bubbles commonly used for echography and other ultrasonic studies, for example using emulsifiers, oils, thickeners or sugars, or by entrapping or encapsulating the gas or a precursor thereof in a variety of systems.

For the present invention, the encapsulated or stabilized gas bubbles are microbubbles bounded by a very thin envelope involving the surfactant bound at the gas to liquid interface, microballoons (microcapsules or gas-filled liposomes) bounded by a material envelope made of organic polymers or biodegradable water insoluble and at room temperature solid lipids or microparticles having gas contained therein or otherwise associated therewith (for example

30

WO 02/080774

PCT/IB02/01229

15

being adsorbed on the surface thereof and/or contained within voids, cavities or pores therein).

The first category, belonging to the class of microbubbles, specifically designates gas bubbles in suspension in a liquid preferably also containing surfactants or tensides to control the surface properties and the stability of the bubbles.

Preferably the microbubble suspension comprises a surfactant or a tenside, such as, for example, a polyoxyethylene-polyoxypropylene block copolymer surfactant such as Pluronic® or a polymer surfactant like that disclosed in US 5,919,434. More preferably amphipathic compounds capable of forming stable films in the presence of water (or an aqueous carrier) and gas are used as surfactants in the stabilized microbubbles useful in the invention. Such compounds may include, for example a film forming lipid. The lipids, synthetic or naturally-occurring generally amphipathic and biocompatible, usable for preparing the gas-containing agents used in the present invention include, for example, fatty acids; lysolipids; phospholipids such as: phosphatidylcholine (PC) with both saturated and unsaturated lipids; including phosphatidylcholine such as dioleoylphosphatidylcholine; dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), dipentadecanoylphosphatidylcholine, dilauroylphosphatidylcholine (DLPC); dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC); distearylphosphatidylcholine (DSPC); and diarachidonylphosphatidylcholine (DAPC); phosphatidylethanolamines (PE), such as dioleoylphosphatidylethanolamine, dipalmitoylphosphatidylethanolamine (DPPE) and distearylphosphatidylethanolamine (DSPE); phosphatidylserine (PS) such as dipalmitoyl phosphatidylserine (DPPS), distearylphosphatidylserine (DSPS); phosphatidylglycerols (PG), such as dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG), distearylphosphatidylglycerol (DSPG); phosphatidylinositol;

WO 02/080774

PCT/IB02/01229

16

sphingolipids such as sphingomyelin; glycolipids such as gangliosides GM1 and GM2; glucolipids; sulfatides; glycosphingolipids; phosphatidic acids as dipalmitoylphosphatidic acid (DPPA) and distearoylphosphatidic acid (DSPA); fatty acids such as: palmitic acid; 5 stearic acid; arachidonic acid; oleic acid; lipids bearing polymers, such as chitin, hyaluronic acid, polyvinylpyrrolidone or polyethylene glycol (PEG), also referred as "pegylated lipids", with preferred lipids bearing polymers including DPPE-PEG (DPPE-PEG), which refers to the lipid DPPE having a PEG polymer attached thereto, including, for 10 example, DPPE-PEG2000, which refers to DPPE having attached thereto a PEG polymer having a mean average molecular weight of about 2000; lipids bearing sulfonated mono- di-, oligo- or polysaccharides; cholesterol, cholesterol sulfate and cholesterol hemisuccinate; tocopherol hemisuccinate; lipids with ether and ester- 15 linked fatty acids; polymerized lipids (a wide variety of which are well known in the art); diacetyl phosphate; dicetyl phosphate; stearylamine; cardiolipin; phospholipids with short chain fatty acids of about 6 to about 8 carbons in length; synthetic phospholipids with asymmetric acyl chains, such as, for example, one acyl chain of about 20 6 carbons and another acyl chain of about 12 carbons; ceramides; non-ionic liposomes including niosomes such as polyoxyethylene fatty acid esters, polyoxyethylene fatty alcohols, polyoxyethylene fatty alcohol ethers, polyoxyethylated sorbitan fatty acid esters, glycerol polyethylene glycol ricinoleate, ethoxylated soybean sterols, 25 ethoxylated castor oil, polyoxyethylene-polyoxypropylene polymers, and polyoxyethylene fatty acid stearates; sterol aliphatic acid esters including cholesterol sulfate, cholesterol butyrate, cholesterol isobutyrate, cholesterol palmitate, cholesterol stearate, lanosterol acetate, ergosterol palmitate, and phytosterol n-butyrate; sterol esters 30 of sugar acids including cholesterol glucuronides, lanosterol glucuronides, 7-dehydrocholesterol glucuronide, ergosterol glucuronide, cholesterol gluconate, lanosterol gluconate, and ergosterol gluconate; esters of sugar acids and alcohols including

WO 02/080774

PCT/IB02/01229

17

lauryl glucuronide, stearoyl glucuronide, myristoyl glucuronide, lauryl gluconate, myristoyl gluconate, and stearoyl gluconate; esters of sugars and aliphatic acids including sucrose laurate, fructose laurate, sucrose palmitate, sucrose stearate, glucuronic acid, gluconic acid and polyuronic acid; saponins including sarsasapogenin, smilagenin, hederagenin, oleanolic acid, and digitoxigenin; glycerol dilaurate, glycerol trilaurate, glycerol dipalmitate, glycerol and glycerol esters including glycerol tripalmitate, glycerol distearate, glycerol tristearate, glycerol dimyristate, glycerol trimyristate; long chain alcohols including n-decyl alcohol, lauryl alcohol, myristyl alcohol, cetyl alcohol, and n-octadecyl alcohol; 6-(5-cholesten-3 $\beta$ -yloxy)-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside; digalactosyldiglyceride; 6-(5-cholesten-3 $\beta$ -yloxy)hexyl-6-amino-6-deoxy-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside; 6-(5-cholesten-3 $\beta$ -yloxy)hexyl-6-amino-6-deoxy-1-thio- $\beta$ -D-mannopyranoside; 12-(((7'-diethylaminocoumarin-3-yl)carbonyl)methylamino)octadecanoic acid; N-[12-(((7'-diethylaminocoumarin-3-yl)carbonyl)methylamino)octadecanoyl]-2-aminopalmitic acid; N-succinyldioleoylphosphatidylethanolamine; 1,2-dioleoyl-sn-glycerol; 1,2-dipalmitoyl-sn-3-succinylglycerol; 1,3-dipalmitoyl-2-succinylglycerol; 1-hexadecyl-2-palmitoylglycerophosphoethanolamine and palmitoyl-homocysteine, and/or combinations thereof.

Preferably, the lipid is a film forming phospholipid and more preferably the film forming phospholipid material may be selected from saturated phospholipids or synthetic non-saturated phospholipids or a mixture thereof. Examples of suitable phospholipids are saturated synthetic lecithins, such as, dimyristoylphosphatidylcholine, dipalmitoylphosphatidylcholine, distearoylphosphatidylcholine or diarachidoylphosphatidylcholine or unsaturated synthetic lecithins, such as dioleoylphosphatidyl choline or dilinoleoylphosphatidylcholine or mixed chains phosphatidylcholines such as for instance monooleyl-monopalmitoylphosphatidylcholine, with saturated phospholipids

WO 02/080774

PCT/IB02/01229

18

being preferred. Even more preferably, the saturated phospholipid may be selected from saturated phosphatidic acid, saturated phosphatidylcholine, saturated phosphatidyl-ethanolamine, saturated phosphatidylserine, saturated phosphatidylglycerol, saturated phosphatidyl-inositol, saturated cardiolipin and saturated sphingomyelin. Particularly preferred are the saturated phospholipids selected in the following group: dimyristoylphosphatidylethanolamine, dipalmitoylphosphatidylethanolamine, distearoylphosphatidylethanolamine or diarachidoylphosphatidylethanolamine; or dioleylphosphatidylethanolamine or dilinoleylphosphatidylethanolamine, fluorinated analogues of any of the foregoing, mixtures of any of the foregoing, with saturated phosphatidylcholine being preferred.

Additives like cholesterol and other substances can optionally be added to one or more of the foregoing lipids in proportions ranging from zero to 50% by weight. Such additives may include other non-phospholipid surfactants that can be used in admixture with the film forming surfactants and most of which are known. For instance compounds like polyoxypropylene glycol and polyoxyethylene glycol as well as copolymers thereof, ergosterol, phytosterol, sitosterol, lanosterol, tocopherol, propyl gallate, ascorbyl palmitate and butylated hydroxytoluene, fatty acids such as myristic acid, palmitic acid, stearic acid, arachidic acid or their derivatives. Particularly preferred is palmitic acid. The amount of these non-film-forming surfactants is usually up to 50% by weight of the total amount of surfactants but preferably between 0 and 30%.

This category includes aqueous suspensions in which the gas bubbles are bounded at the gas/liquid interface by a very thin layer of surfactant bound at the gas to liquid interface. Easy-to-produce aqueous microbubble suspensions usable in the present invention are disclosed in, for example, EP 474833 (US 5,271,928), US 5,380,519, US 5,531,980, US 5,567,414, US 5,643,553, US

WO 02/080774

PCT/IB02/01229

19

5,658,551, US 5,911,972, incorporated herein by reference in their entirety. The suspensions contain film forming surfactants in laminar and/or lamellar form and, optionally, hydrophilic stabilisers. These microbubbles are stabilised by one or more mono-molecular layer(s) of amphipathic compounds i.e. compounds with hydrophilic and hydrophobic moieties. These patents also disclose a dry composition, which, upon admixing with an aqueous carrier liquid, will generate a sterile suspension of microbubbles thereafter usable in the present invention. Preferred suspensions contain phospholipids as film forming surfactants and, optionally, hydrophilic stabilizers. The total concentration of phospholipids may range from 0.01% to 20% and preferably comprised between 0.01-10% (w/w) of the total lipid concentration and even most preferably between 0.1-1% (w/w). The concentration of microbubbles may range from  $10^7$  to  $10^{10}$  bubbles/mL, with a preferred concentration of is between  $10^8$  and  $10^9$  bubbles/mL. The microbubble suspensions remain stable for months.

Preferred phospholipid monolayer stabilized microbubbles are also disclosed in for example, US 5,445,813; US 5,597,549; US 5,686,060 (Schneider et al), US 5,413,774; US 5,578,292 (Schneider et al), US 5,556,610; US 5,846,518 (Yan et al) and US 5,827,504 (Yan et al), incorporated herein by reference in their entirety.

Other microbubble suspensions useful in the invention include those disclosed in, for example, US 5,798,091 (Trevino et al) and WO 97/29783 (Nycomed designating the US, also EP 881 915), incorporated herein by reference in their entirety.

For example, US 5,798,091 discloses what is stated to be a gas emulsion comprising a plurality of bubbles surrounded by a layer of at least a first and a second surfactant. The first surfactant is a hydrophobic phospholipid or mixture of phospholipids having at least

WO 02/080774

PCT/IB02/01229

20

one acyl chain, which comprises at least 10 carbon atoms, which is at least about 5% w/w of the total surfactant. The second surfactant is may or may not also be a phospholipid or mixture of phospholipids, but which is more hydrophilic than the phospholipid or combination of phospholipid provided as the first surfactant. Preferred second surfactants may be selected from the group consisting of phospholipids, phosphocholines, lysophospholipids, nonionic surfactants, neutral or anionic surfactants, fluorinated surfactants, which can be neutral or anionic, and combinations of such emulsifying or foaming agents. Some specific examples of surfactants which are useful as the second surfactant include block copolymers of polyoxypropylene and polyoxyethylene (an example of such class of compounds is Pluronic, such as Pluronic F-68), sugar esters, fatty alcohols, aliphatic amine oxides, hyaluronic acid aliphatic esters, hyaluronic acid aliphatic ester salts, dodecyl poly(ethyleneoxy)ethanol, nonylphenoxy poly(ethyleneoxy) ethanol, derivatized starches, hydroxy ethyl starch fatty acid esters, salts of fatty acids, commercial food vegetable starches, dextran fatty acid esters, sorbitol fatty acid esters, gelatin, serum albumins, and combinations thereof. Also contemplated as a second surfactant are polyoxyethylene fatty acids esters, such as polyoxyethylene stearates, polyoxyethylene fatty alcohol ethers, polyoxyethylated sorbitan fatty acid esters, glycerol polyethylene glycol oxystearate, glycerol polyethylene glycol ricinoleate, ethoxylated soybean sterols, ethoxylated castor oils, and the hydrogenated derivatives thereof. In addition, nonionic alkylglucosides such as Tweens®, Spans® and Brijis® may also be used as the second surfactant.

In WO 9729783, there is provided a contrast agent for use in diagnostic studies comprising a suspension in an injectable aqueous carrier liquid of gas microbubbles stabilised by phospholipid-containing amphiphilic material characterised in that said

WO 02/080774

PCT/IB02/01229

21

amphiphilic material consists essentially of phospholipid predominantly comprising molecules with net charges.

Desirably at least 75%, preferably substantially all of the phospholipid material in the contrast agents consists of molecules  
5 bearing a net overall charge under conditions of preparation and/or use, which charge may be positive or, more preferably, negative. Representative positively charged phospholipids include esters of phosphatidic acids such as dipalmitoylphosphatidic acid or distearoylphosphatidic acid with aminoalcohols such as  
10 hydroxyethylenediamine. Examples of negatively charged phospholipids include naturally occurring (e.g. soya bean or egg yolk derived), semisynthetic (e.g. partially or fully hydrogenated) and synthetic phosphatidylserines, phosphatidylglycerols, phosphatidylinositols, phosphatidic acids and cardiolipins. The fatty  
15 acyl groups of such phospholipids will typically each contain about 14-22 carbon atoms, for example as in palmitoyl and stearoyl groups. Lyso forms of such charged phospholipids are also useful, the term "lyso" denoting phospholipids containing only one fatty acyl group, this preferably being ester-linked to the 1 position carbon atom of the  
20 glyceryl moiety. Such lyso forms of charged phospholipids may advantageously be used in admixture with charged phospholipids containing two fatty acyl groups.

The preparation of a preferred gas-filled microbubble suspension  
25 useful in the invention can be done according to, for example, the methods described in the following patents: EP 554213; US 5,413,774; US 5,578,292; EP 744962; EP 682530; US 5,556,610; EP 474833; US 5,271,928; US 5,380,519; US 5,531,980; US 5,567,414; EP 619743; US 5,445,813; US 5,597,549, incorporated by reference  
30 herein in their entirety.

Regardless of how the microbubble suspension is prepared, in order to permit free passage through the pulmonary system and to

WO 02/080774

PCT/IB02/01229

22

achieve resonance, it may be convenient to employ microbubbles having an average size of 0.1-10  $\mu\text{m}$ . Microbubbles used in the present invention may be produced with a very narrow size distribution for the microbubble dispersion within the range preferred for echography, thereby greatly enhancing their effective echogenicity as well as their safety in vivo, and rendering the microbubbles of particular advantage in such application.

The second category includes contrast agents with a solid material envelope formed of natural or synthetic polymers. In this case, the gas filled bodies are referred to as microballoons. The term "microballoon" or "microcapsule" designates gas-filled bodies with a material boundary or envelope, i.e. a polymer membrane wall. Gas-filled liposomes according to, for example, US 5,580,575 (Unger) also belong to this category and are incorporated herein by reference. More on these different formulations may be found in EP-A-0 324 938 (US 4,844,882, Widder et al.), US 5,711,933 (Bichon et al.), US 4,900,540 (Ryan), US 5,230,882 (Unger), US 4,718,433 (Feinstein), US 4,774,958 (Feinstein), WO 9501187 (MBI designating the US), US 5,529,766 (Nycomed), US 5,536,490 (Nycomed), US 5,990,263 (Nycomed) the contents of which are incorporated herein by reference.

Microballoons, which may be particularly useful in the present invention, include pressure resistant microballoons bounded by a soft and elastic membrane, which can temporarily deform under variations of pressure and are endowed with enhanced echogenicity and are biodegradable.

For polymeric microballoon, the polymer, which constitutes the envelope or bounding membrane of the injectable microballoons can be selected from most hydrophilic, biodegradable physiologically compatible polymers. Such polymers include polysaccharides of low water solubility, polylactides and polyglycolides and their copolymers,

WO 02/080774

PCT/IB02/01229

23

copolymers of lactides and lactones such as  $\epsilon$ -caprolactone,  $\gamma$ -valerolactone and polypeptides. Other suitable polymers include poly(orthoesters) (see for instance US 4,093,709; US 4,131,648; US 4,138,344; US 4,180,646 also incorporated herein by reference);

5 poly(lactic and polyglycolic acid and their copolymers, for instance DEXON (see J. Heller, *Biomaterials* 1 (1980), 51, incorporated herein by reference in its entirety); poly(DL-lactide-co- $\gamma$ -caprolactone), poly(DL-lactide-co- $\gamma$ -valerolactone), poly(DL-lactide-co- $\epsilon$ -butyrolactone), polyalkylcyanoacrylates; polyamides,

10 polyhydroxybutyrate; polydioxanone; poly- $\beta$ -aminoketones (Polymer 23 (1982), 1693, incorporated herein by reference in its entirety); polyphosphazenes (*Science* 193 (1976), 1214, incorporated herein by reference in its entirety); and polyanhydrides. References on biodegradable polymers can be found in R. Langer et al., *Macromol.*

15 *Chem. Phys. C*23 (1983), 61-126, incorporated herein by reference in its entirety. Polyamino-acids such as polyglutamic and polyaspartic acids can also be used as well as their derivatives, i.e. partial esters with lower alcohols or glycols. One useful example of such polymers is poly-(t.butyl-glutamate). Copolymers with other amino-acids such

20 as methionine, leucine, valine, proline, glycine, alanine, etc. are also possible. Recently some novel derivatives of polyglutamic and polyaspartic acid with controlled biodegradability have been reported (see US 4,892,733; US 4,888,398 and US 4,675,381 incorporated herein by reference in their entirety). Biodegradable water insoluble

25 and at room temperature solid lipids selected from a mono-, di- or tri-glycerides, fatty acids, sterols, waxes and the mixtures thereof may also be used for the manufacture of microballoons according to the invention (see WO 96/15815 incorporated herein by reference in its entirety). Non-biodegradable polymers for making microballoons can

30 be selected from most water-insoluble, physiologically acceptable, bioresistant polymers including polyolefins (polystyrene), acrylic resins (polyacrylates, polyacrylonitrile), polyesters (polycarbonate),

WO 02/080774

PCT/IB02/01229

24

polyurethanes, polyurea and their copolymers. ABS (acryl-butadiene-styrene) is a preferred copolymer.

Properties of the membrane, for instance strength, elasticity and biodegradability, can be controlled. Additives can be incorporated into the polymer wall of the microballoons to modify the physical properties such as dispersibility, elasticity and water permeability. Among the useful additives, one may cite compounds which can "hydrophobize" the microballoons membrane in order to decrease water permeability, such as fats, waxes and high molecular-weight hydrocarbons. Additives, which improve dispersibility of the microballoons in the injectable liquid carrier, are amphipatic compounds like the phospholipids; they also increase water permeability and rate of biodegradability. The quantity of additives to be incorporated in the polymer forming the membrane of the present microballoons is extremely variable and depends on the needs. In some cases no additive is used at all, in other cases amounts of additives, which may reach about 20% by weight of the polymer, are possible.

20

The third category of stabilized or encapsulated gas bubbles are microparticles, suspensions of porous particles of polymers or other solids, which carry gas microbubbles, entrapped within the pores of the microparticles. These systems, which include aggregates of microparticles, have gas contained therein or otherwise associated therewith (for example being adsorbed on the surface thereof and/or contained within voids, cavities or pores therein, e.g. as described in EP 0122 624, EP 0123 235, EP 0365 467, US 5,558,857, US 5,607,661, US 5,637,289, US 5,558,85, US 5,137,928, WO 9521631 or WO 9313809, incorporated by reference herein in their entirety.

25

The encapsulated or stabilised gas bubbles (stabilized microbubble, microballoon or microparticle suspensions) used in the

30

WO 02/080774

PCT/IB02/01229

25

present invention may conveniently be administered in a pharmaceutically acceptable aqueous liquid carrier. Suitable liquid carriers are water, aqueous solutions such as saline (which may advantageously be balanced so that the final product for injection is not hypotonic), or solutions of one or more tonicity adjusting substances such as salts or sugars, sugar alcohols, glycols and other non-ionic polyol materials (e.g. glucose, sucrose, sorbitol, mannitol, glycerol, polyethylene glycols, propylene glycols and the like). In practice all injectable compositions should also be as far as possible isotonic with blood. Hence, before injection, small amounts of isotonic agents may also be added to the suspensions of the invention. The isotonic agents are physiological solutions commonly used in medicine and they comprise aqueous saline solution (0.9% NaCl), 2,6% glycerol solution, 5% dextrose solution, etc.

15

Other excipients may if desired be present in the composition being dried or may be added on formulation for administration. Such excipients may for example include pH regulators, osmolality adjusters, viscosity enhancers, emulsifiers, bulking agents, etc. and may be used in conventional amounts.

20

The encapsulated or stabilised gas bubbles are filled with a gas or a gas mixture comprising a physiologically acceptable gas selected from the group consisting of fluorinated gases, including sulfur hexafluoride, trifluoromethylsulfur pentafluoride, Preons® (e.g. organic compounds containing one or more carbon atoms and fluorine such as CF<sub>4</sub>, CBrF<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>F<sub>8</sub>, CClF<sub>3</sub>, CCl<sub>2</sub>F<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>F<sub>6</sub>, C<sub>2</sub>ClF<sub>5</sub>, CBrClF<sub>2</sub>, CBr<sub>2</sub>F<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> and C<sub>4</sub>F<sub>10</sub> and mixtures thereof), and perfluorocarbons; air; nitrogen; oxygen; carbon dioxide; hydrogen; nitrous oxide; inert gases such as helium, krypton, xenon, and argon; hyperpolarized gases; a low molecular weight hydrocarbon (e.g. containing up to 7 carbon atoms), for example an alkane such as methane, ethane, a propane, a butane or a pentane, a cycloalkane

30

WO 02/080774

PCT/IB02/01229

26

such as cyclobutane or cyclopentane, an alkene such as propene or a butene, or an alkyne such as acetylene; an ether; a ketone; an ester; a halogenated low molecular weight hydrocarbon (e.g. containing up to 7 carbon atoms); or a mixture of any of the foregoing. At least some of the halogen atoms in halogenated gases advantageously are fluorine atoms.

Biocompatible halogenated hydrocarbon gases may, for example, be selected from bromochlorodifluoromethane, chlorodifluoromethane, dichlorodifluoromethane, bromotrifluoromethane, chlorotrifluoromethane, chloropentafluoroethane, dichlorotetrafluoroethane and perfluorocarbons, e.g. perfluoroalkanes such as perfluoromethane, perfluoroethane, perfluoropropanes, perfluorobutanes (e.g. perfluoro-n-butane, optionally in admixture with other isomers such as perfluoro-isobutane), perfluoropentanes, perfluorohexanes and perfluoroheptanes, perfluorooctanes, perfluorononanes, perfluorodecanes; perfluoroalkenes such as perfluoropropene, perfluorobutenes (e.g. perfluorobut-2ene) and perfluorobutadiene; perfluoroalkynes such as perfluorobut-2-yne; and perfluorocycloalkanes such as perfluorocyclobutane, perfluoromethylcyclobutane, perfluorodimethylcyclobutanes, perfluorotrimethylcyclobutanes, perfluorocyclopentane, perfluoromethylcyclopentane, perfluorodimethylcyclopentanes, perfluorocyclohexane, perfluoromethylcyclohexane and perfluorocycloheptane. Other halogenated gases include fluorinated, e.g. perfluorinated, ketones such as perfluoroacetone and fluorinated, e.g. perfluorinated, ethers such as perfluorodiethyl ether. Contrast agents containing sulphur hexafluoride, perfluorocarbons, such as for example, perfluoropropane or perfluorobutane or mixtures thereof with air, oxygen, nitrogen, helium or CO<sub>2</sub> are preferred, with SF<sub>6</sub> and C<sub>4</sub>F<sub>10</sub> are particularly preferred.

WO 02/080774

PCT/IB02/01229

27

The gas can be a mixture of the gases above defined. In particular the following combinations are particularly preferred: a mixture of gases (A) and (B) in which, at least one of the gases (B), present in an amount of between 0.5 - 41% by vol., has a molecular weight greater than 80 daltons and (B) is selected from the group consisting of SF<sub>6</sub>, CF<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>F<sub>6</sub>, C<sub>2</sub>F<sub>8</sub>, C<sub>3</sub>F<sub>6</sub>, C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>, C<sub>4</sub>F<sub>6</sub>, C<sub>4</sub>F<sub>8</sub>, C<sub>4</sub>F<sub>10</sub>, C<sub>5</sub>F<sub>10</sub>, C<sub>5</sub>F<sub>12</sub> and mixtures thereof and (A) is selected from the group consisting of air, oxygen, nitrogen, carbon dioxide and mixtures thereof the balance of the mixture being gas A.

10

In addition, as discussed, the contrast agent may include a gas precursor (e.g. a compound or compound mixture which is partially in gaseous form (including vapour) at normal human body temperatures (37 °C) i.e. C<sub>5</sub>F<sub>12</sub>, C<sub>6</sub>F<sub>14</sub>, cyclohexane, cyclooctane, hexane, cyclopentane, etc.).

15

Particularly preferred are gas precursors with boiling points between 20 and 80 °C. The gas precursor may be used alone or in combination with a gas or another gas precursor.

20

The foregoing description will be more fully understood with reference to the following Examples. Such Examples, are, however, exemplary of methods of practising the present invention and are not intended to limit the scope of the invention.

25

#### Examples

Example 1:

WO 02/080774

PCT/IB02/01229

28

Figure 4 shows the sub- and ultraharmonic energy curves (top and bottom, respectively) as a function of time for an air bubble with a radius of 2.2  $\mu\text{m}$  as obtained by computer simulation. The curves were calculated, as described in the specification, for different values of the surrounding liquid pressure. The liquid pressure is indicated by the overpressure, i.e. the pressure value over the atmospheric pressure of 760 mmHg. The values for the overpressure were 0, 50, 100 and 200 mmHg. The different lines show the respective energy curves. From these curves the mean response time was calculated according to equation (2) and the values for the mean sub- and ultraharmonic response time are given in table 1 in the third and fourth column, respectively. As a reference, the time for the air bubble to completely disappear as a function of the overpressure is calculated by equation (1), and is given in the second column. By looking at the difference in sub- and ultraharmonic response time (column 3 and 4) for different pressures (difference between the rows), it is clear that with the new method similar or higher sensitivity can be obtained than by measuring the disappearance time. Additionally, a significant advantage of the new method is that the acquisition time will be much shorter (2-3 times) compared to the acquisition time for measuring the total disappearance time (column 2), which is important for real time application of the method.

Table 1. Disappearance time,  $t_d$ , mean response times for subharmonic,  $t_{\text{sub}}$ , and ultraharmonic,  $t_{\text{ul}}$ , as a function of the overpressure.

$P_{\text{ov}}$ [mmHg]	$t_d$ [ms]	$t_{\text{sub}}$ [ms]	$t_{\text{ul}}$ [ms]
0	120.8	51.0	51.5
50	112.7	42.6	43.1
100	105.7	35.7	36.4
200	94.1	26.7	27.0

Example 2:

25

WO 02/080774

PCT/IB02/01229

29

This example shows the sensitivity of the new method to measure clinical relevant pressure differences of 10 mmHg, for an air bubble with a radius of 2.2  $\mu\text{m}$  as obtained by computer simulation. The results of this example are shown in table 2. The overpressures range from 80 to 120 mmHg in steps of 10 mmHg. The difference in disappearance time (column 2 in table 2) ranges from 1.2 to 1.4 ms per 10 mmHg of pressure change. The difference in mean response time for the subharmonic (column 3 in table 2) ranges from 1.7 to 2.7 ms. The difference in mean response time for the ultraharmonic (column 4 in table 2) ranges from 2.1 to 2.8 ms. This means that by using the new method, the sensitivity increased by 40-100%, compared to methods that consider the complete disappearance of gas bubbles.

Table 2. Disappearance time,  $t_d$ , mean response times for subharmonic,  $t_{\text{sub}}$ , and ultraharmonic,  $t_{\text{ul}}$ , as a function of the overpressure.

Pov [mmHg]	$t_d$ [ms]	$t_{\text{sub}}$ [ms]	$t_{\text{ul}}$ [ms]
80	108.4	40.2	41.3
90	107.0	37.5	38.5
100	105.7	35.7	36.4
110	104.4	34.0	34.0
120	103.2	32.1	31.5

WO 02/080774

PCT/IB02/01229

30

Claims

1. A noninvasive measuring method for remotely determining local  
5 physical parameters of a fluid-filled cavity, based on the combined  
use of encapsulated or stabilized gas bubbles and ultrasound waves,  
said measuring system comprising the steps of:

a) administering encapsulated or stabilized gas bubbles to a  
10 fluid filled cavity

b) applying with a transducer a first ultrasound pulsed  
wave or a train of pulsed waves to the fluid filled cavity to  
destroy the encapsulated or stabilized gas bubbles and generate  
free-gas bubbles

15 c) applying with a transducer a second ultrasound pulsed  
wave or train of pulsed waves at a frequency specifically chosen  
for exciting the sub- and/or ultraharmonic response of the  
bubbles

d) determining the mean response time

20 e) determining a value for a local physical parameter on  
the basis of the response time of step d)

characterised in that, the sub- and/or ultraharmonic responses  
of step c) are monitored as a function of time by successive  
ultrasound wave pulses, this function being an indication of the  
25 physical parameter being measured.

2. The measuring method according to claim 1, characterised in  
that the first ultrasound pulsed wave or train of pulsed waves is  
tuned in such a way that the size of the released free-gas  
30 bubbles is larger than the subharmonic size.

3. The measuring method according to claim 1 or 2,  
characterised in that the frequency and amplitude of the first

WO 02/080774

PCT/IB02/01229

31

ultrasound pulsed wave or train of pulsed waves can be chosen independently of the second ultrasound pulsed wave or train of pulsed waves.

5 4. The measuring method according to claim 1, characterised in that the frequency and amplitude of the second ultrasound pulsed wave or train of pulsed waves can be chosen independently of the first ultrasound pulsed wave or train of pulsed waves.

10

5. The measuring method according to claim 1, characterised in that the transducer used to apply the first ultrasound pulsed wave or train of pulsed waves can be the same as or distinct from that used for applying the second ultrasound pulsed wave or train of pulsed waves.

15

6. The measuring method according to any one of the claims 1, 2, 3, 4 or 5, wherein the local parameters are selected from the group consisting of the pressure, the temperature and the gas concentration.

20

7. The measuring method according to claim 1, wherein the encapsulated or stabilized gas bubbles are selected from the group consisting of microbubbles bounded by a very thin envelope involving the surfactant bound at the gas to liquid interface, microballoons  
25 bounded by a material envelope made of organic polymers or biodegradable water insoluble and at room temperature solid lipids and microparticles of polymers or other solids, which carry gas microbubbles, entrapped within or associated with the pores of the microparticles.

30

8. The measuring method according to claim 7, in which the encapsulated or stabilised gas bubbles comprise gas or a gas mixture selected from the group consisting of sulfur hexafluoride, a

WO 02/080774

PCT/IB02/01229

32

perfluorocarbon, air, nitrogen, carbon dioxide, helium, krypton, xenon, argon, methane, hyperpolarized helium, hyperpolarized xenon and mixtures thereof.

5 9. The measuring method according to claim 8, in which the encapsulated or stabilized gas bubbles comprise a perfluorocarbon selected from the group consisting of perfluoromethane, perfluoroethane, perfluoropropane, perfluorobutane, perfluorocyclobutane, perfluoropentane, perfluorohexane and  
10 mixtures thereof.

10. The measuring method according to claim 7, wherein at least one of the surfactants comprises a film-forming phospholipid.

15 11. The measuring method according to claim 10, wherein the phospholipid film forming surfactant is selected from the group consisting of a saturated phospholipid, a synthetic non-saturated phospholipid and mixtures thereof.

20 12. The measuring method according to claim 11, wherein the phospholipid film forming surfactant is a saturated phospholipid selected from the group consisting of saturated phosphatidic acid, saturated phosphatidylcholine, saturated phosphatidyl-ethanolamine, saturated phosphatidylserine, saturated phosphatidylglycerol,  
25 saturated phosphatidyl-inositol, cardiolipin and sphingomyelin.

13. The measuring method according to claim 7, in which the encapsulated or stabilized gas bubble is a microballoon bounded by a polymer selected from the group consisting of polylactic or  
30 polyglycolic acid and their copolymers, denaturated serum albumin, denaturated haemoglobin, polycyanoacrylate, and esters of polyglutamic and polyaspartic acids or a biodegradable water insoluble and at room temperature solid lipid selected from a mono-

WO 02/080774

PCT/IB02/01229

33

di- or tri-glycerides, fatty acids, sterols, waxes and the mixtures thereof.

14. The measuring method according to claim 13, in which the  
5 microballoon is bounded by a saturated tri-glycerides selected from the group consisting of tristearine, tripalmitine or mixtures thereof with other glycerides.

15. A method of diagnostic ultrasound for determining local physical  
10 parameters of a fluid-filled cavity "in situ", which comprises the steps of:

a) administering to a subject a fluid agent containing encapsulated or stabilized gas bubbles;

15 b) applying with a transducer a first ultrasound pulsed wave or a train of pulsed waves to the fluid-filled cavity to destroy the encapsulated or stabilized gas bubbles and generate free-gas bubbles;

20 c) applying with a transducer a second ultrasound pulsed wave or train of pulsed waves around a frequency specifically chosen for exciting the sub- and/or ultraharmonic response of the bubbles;

d) determining the mean response time;

25 e) determining a value for a local physical parameter on the basis of the response time of step d); characterised in that, the sub- and/or ultraharmonic responses of step c) are monitored as a function of time by successive ultrasound wave pulses, this function being an indication of the physical parameter being measured.

30 16. The method according to claim 15, wherein said subject is a vertebrate and said fluid agent containing encapsulated or stabilised gas bubbles is introduced into the vasculature or into a body cavity of said vertebrate.

1/7

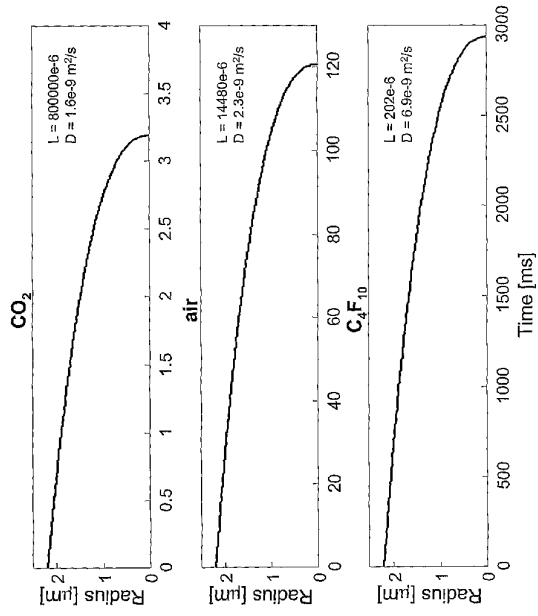


FIG. 1.

2/7

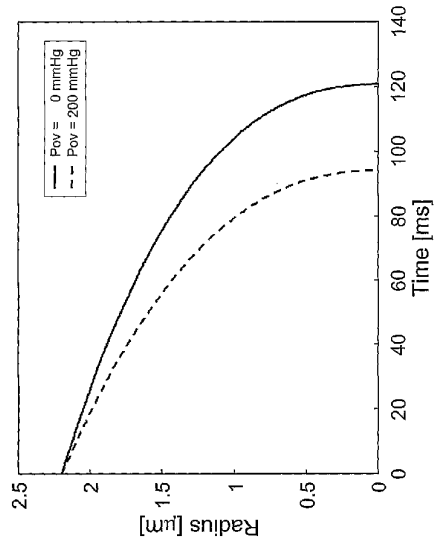


FIG. 2.

3/7

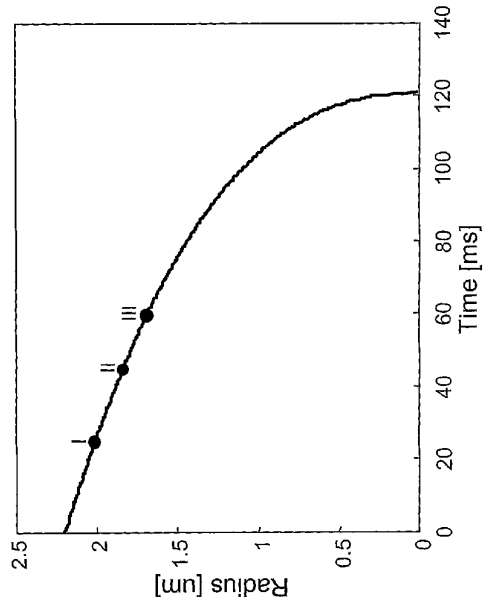
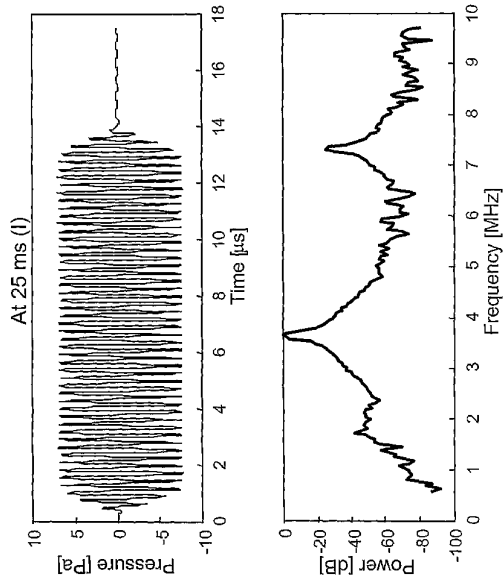


FIG. 3A.

4/7



**FIG. 3B.**

5/7

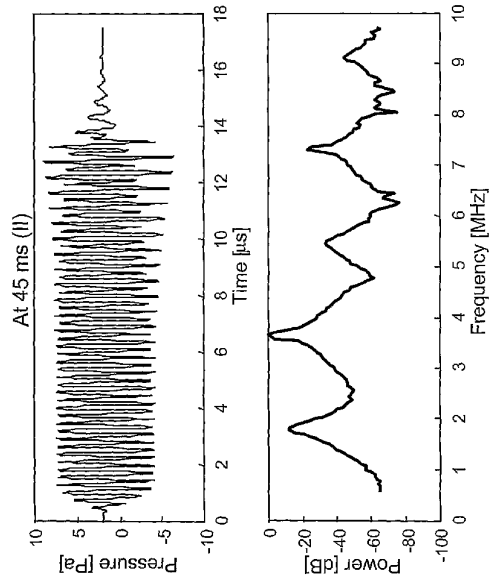


FIG. 3C.

6/7

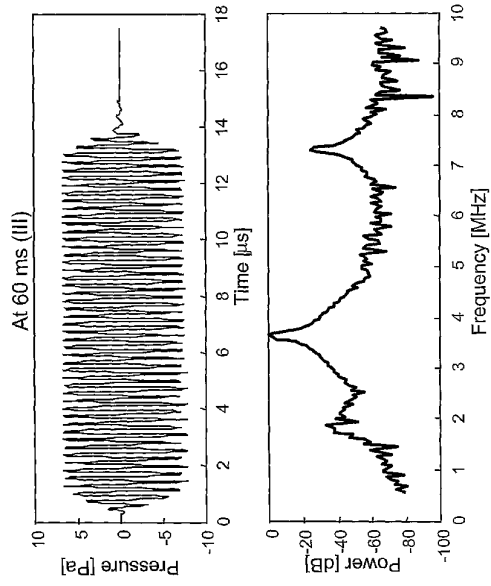


FIG. 3D.

7/7

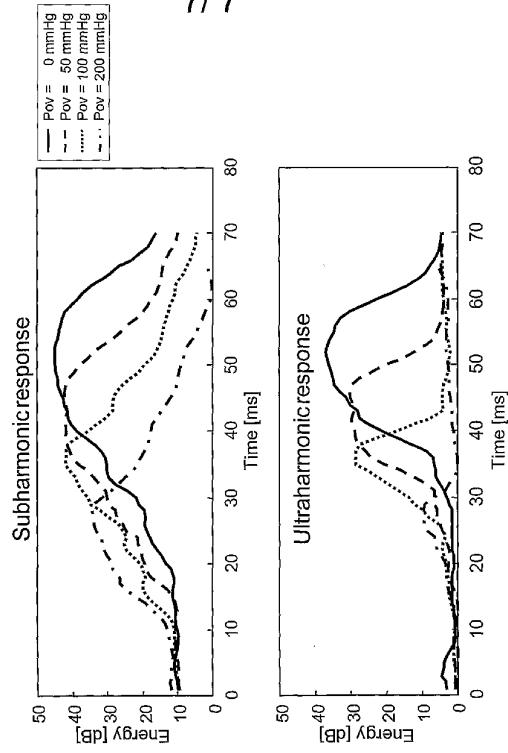


FIG. 4.

## 【国際公開パンフレット(コレクション)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
17 October 2002 (17.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 02/080774 A3**

- (51) International Patent Classification: **A61B 8/00**, Genève (CH), **ARDITI, Marcel** [CH/CH]; 27, rue Daubin, G01N 29/02, G01L 11/06, G01K 5/28, CH-1203 GENEVA (CH).
- (21) International Application Number: PCT/IB02/01229 (81) Designated States (*national*): AU, CA, JP, US.
- (22) International Filing Date: 5 April 2002 (05.04.2002) (84) Designated States (*regional*): European patent (AT, BE, CIL, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English **Declaration under Rule 4.17:**  
*of inventorship (Rule 4.17(v)) for US only*
- (30) Priority Data: 60/281,794 6 April 2001 (06.04.2001) US **Published:**  
*with international search report*
- (71) Applicant (*for all designated States except US*): **BRACCO RESEARCH SA**, [CH/CH]; 31, route de la Galaise, CH-1228 Plan-les-Ouates (CH), (88) Date of publication of the international search report:  
27 February 2003
- (72) Inventors: and *For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*
- (75) Inventors/Applicants (*for US only*): **FRINKING, Peter, J., A.**, [NL/CH]; 23, rue du XXXI Décembre, CH-1207



WO 02/080774 A3

(54) Title: METHOD FOR IMPROVED MEASUREMENT OF LOCAL PHYSICAL PARAMETERS IN A FLUID-FILLED CAVITY

(57) Abstract: The present invention relates to remotely determining local physical parameters in a fluid-filled cavity (e.g. heart cavities, blood vessels, industrial container) by means of ultrasound waves and encapsulated or stabilised gas bubbles. A measuring method, a method of diagnostic ultrasound of the same and an apparatus for remotely determining ambient physical local parameters of a fluid-filled cavity are disclosed.

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/IB 02/01229
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61B/00 G01N29/02 G01L11/06 G01K5/28		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61B G01N G01L G01K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 98 32378 A (ANDARIS LTD ;FRINKING PETER (NL); JONG NICO DE (NL)) 30 July 1998 (1998-07-30) cited in the application page 11, line 21 -page 12, line 9	1
Y	WO 99 47045 A (FORSBERG FLEMMING ;RAICHLEN JOEL S (US); SHI WILLIAM TAO (US); UNI) 23 September 1999 (1999-09-23) cited in the application page 15, line 16 - line 19	1
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		** later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *** document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *F* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 6 November 2002		Date of mailing of the international search report 15/11/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5618 Patentlaan 2 NL - 2220 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-2016		Authorized officer Clevorn, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP 02/01229
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input checked="" type="checkbox"/>	<p>Claims Nos.: 1-14 (partly), 15, 16 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by surgery in step a) of claims 1 and 15; for an in-vivo application of claims 1-16 corresponding apparatus features have been searched</p>
2.	<input type="checkbox"/>	<p>Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:</p>
3.	<input type="checkbox"/>	<p>Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1.	<input type="checkbox"/>	<p>As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.</p>
2.	<input type="checkbox"/>	<p>As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.</p>
3.	<input type="checkbox"/>	<p>As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</p>
4.	<input type="checkbox"/>	<p>No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:</p>
<b>Remark on Protest</b>		<p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No. PCT/IB 02/01229	
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9832378	A	30-07-1998	AU 5570998	A	18-08-1998
			CN 1251028	T	19-04-2000
			EP 0963176	A1	15-12-1999
			WO 9832378	A1	30-07-1998
			JP 2001508344	T	26-06-2001
			US 6322512	B1	27-11-2001
			ZA 9800520	A	29-07-1998
WO 9947045	A	23-09-1999	AU 3103099	A	11-10-1999
			WO 9947045	A1	23-09-1999
			US 2001021808	A1	13-09-2001

---

フロントページの続き

(74)代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72)発明者 フランカン, ペテル ジェー.アー.

スイス国, ツェーハー - 1 2 0 7 ジュネーブ, リュ デュ トランテアン デサンプル, 2 3

(72)発明者 アルディティ, マルセル

スイス国, ツェーハー - 1 2 0 3 ジュネーブ, リュ ドーバン, 2 7

F ターム(参考) 4C017 AA00 AA01 AA08 AB04 FF02 FF08

4C085 HH09 JJ08 KA14 KA16 KB38 KB39 KB41 KB42 KB60 KB68

KB75 KB82 KB83 LL01 LL20

4C601 DD06 DD22 DE06 DE07 DE12 EE09 EE20 HH04 HH05 HH06

专利名称(译)	用于测量充满流体的腔中的局部物理参数的改进方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004529697A</a>	公开(公告)日	2004-09-30
申请号	JP2002578814	申请日	2002-04-05
[标]申请(专利权)人(译)	BRACCO RES美国		
申请(专利权)人(译)	布拉科研究法兴ANONYME		
[标]发明人	フランカンペテルジェーアー アルディティマルセル		
发明人	フランカン,ペテル ジェー.アー. アルディティ,マルセル		
IPC分类号	A61B5/022 A61B8/00 A61B8/04 A61K49/00 G01L11/06 G01N7/14 G01N15/00 G01N15/02 G01N29/036		
CPC分类号	G01N29/036 A61B8/481 G01L11/06 G01N15/02 G01N2015/0011 G01N2291/02433 G01N2291/02854 G01N2291/02872		
FI分类号	A61B8/04 A61K49/00.C A61B5/02.332.Z		
F-TERM分类号	4C017/AA00 4C017/AA01 4C017/AA08 4C017/AB04 4C017/FF02 4C017/FF08 4C085/HH09 4C085/JJ08 4C085/KA14 4C085/KA16 4C085/KB38 4C085/KB39 4C085/KB41 4C085/KB42 4C085/KB60 4C085/KB68 4C085/KB75 4C085/KB82 4C085/KB83 4C085/LL01 4C085/LL20 4C601/DD06 4C601/DD22 4C601/DE06 4C601/DE07 4C601/DE12 4C601/EE09 4C601/EE20 4C601/HH04 4C601/HH05 4C601/HH06		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 西山雅也		
优先权	60/281794 2001-04-06 US		
其他公开文献	JP3819845B2 JP2004529697A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及通过超声和封装或稳定的气泡远程确定充满流体的腔(例如,心腔,血管,工业容器等)中的局部物理参数。公开了一种用于远程确定流体填充腔的环境的物理局部参数的测量方法及其超声诊断方法和设备。

$$\frac{dR}{dt} = \frac{DL}{R} \left( \frac{\frac{C_i}{C_0} - 1 - \frac{2\sigma}{RP_0} - \frac{P_{ov}}{P_0}}{1 + \frac{4\sigma}{3RP_0}} \right)$$