

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
13. September 2018 (13.09.2018)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2018/162473 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
A61K 9/00 (2006.01) *A61K 49/04* (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2018/055463

(22) Internationales Anmeldedatum:
06. März 2018 (06.03.2018)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
00284/17 09. März 2017 (09.03.2017) CH

(71) Anmelder: FUMEDICA INTERTRADE AG [CH/CH];
Gewerbstrasse 5, 6330 Cham (CH). UNIVERSITÄT
BERN [CH/CH]; Verwaltungsdirektion, Hochschulstrasse
6, 3012 Bern (CH).

(72) Erfinder: STEGER, Beat; CP 10, 6749 Sobrio (CH).
HLUSHCHUK, Ruslan; Schwabstrasse 72, 3018 Bern
(CH). DJONOV, Valentin; Bühlstrasse 25, 3012 Bern
(CH).

(74) Anwalt: PESTALOZZI, Deborah; c/o Isler & Pedrazzini
AG, Postfach 1772, 8027 Zürich (CH).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN,
KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,

(54) Title: CONTRAST MEDIUM FOR MICROANGIOGRAPHY

(54) Bezeichnung: KONTRASTMITTEL FÜR MIKROANGIOGRAFIE

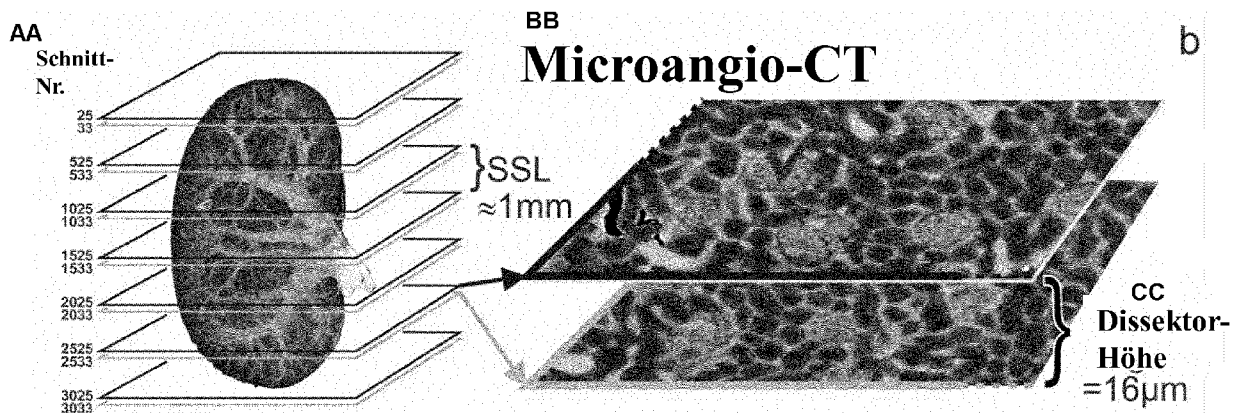


FIG. 4

AA Slice no.
BB Microangio CT
CC Dissector height = 16 µm

(57) Abstract: The invention relates to a contrast medium for *ex vivo* microangiography for digital imaging of the vascular system of a mouse or rat or other laboratory animals, and of individual animal and human organs, comprising an iodized, esterified oil, a polyurethane, and a hardener. The invention further relates to a method for producing the contrast medium; to a kit of parts, comprising the various containers having the components of the contrast medium according to the invention that are to be mixed; and to a preferred use of the contrast medium according to the invention for imaging by means of a micro-CT device.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Kontrastmittel für *ex vivo* Mikroangiografie zur digitalen Bildgebung des Gefäßsystems einer Maus oder Ratte oder anderer Labortiere, sowie einzelner tierischer und menschlicher Organe, aufweisend ein iodiertes, verestertes Öl, ein Polyurethan und einen Härter. Die Erfindung betrifft ebenso ein Verfahren zur Herstellung des Kontrastmittels, sowie ein Kit-of-Parts, aufweisend die verschiedenen Behälter mit den zu mischenden Komponenten des erfindungsgemässen Kontrastmittels, und eine bevorzugte Anwendung des erfindungsgemässen Kontrastmittels für die Bildgebung durch ein Micro-CT-Gerät.

WO 2018/162473 A1

SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

TITEL

Kontrastmittel für Mikroangiografie

5

TECHNISCHES GEBIET

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Kontrastmittel für postmortale Mikroangiografie, d.h. zur digitalen Bildgebung eines Gefäßsystems, insbesondere von Kleintieren, wie
10 beispielsweise einer Maus, einer Ratte, oder anderer Labortiere, sowie einzelner tierischer und menschlicher Organe mittels eines röntgenbasierten Bildgebungsverfahrens, insbesondere eines Nano- oder Micro-CT-Geräts.

STAND DER TECHNIK

15 Ziel der Mikroangiografie ist es, kleinste Gefäße, d.h. Kapillaren einzelner Organe oder ganzer Körper dreidimensional zu visualisieren und zwecks Analyse exakt wiederzugeben. Vor allem für die pharmakologische Forschung, aber auch in der Forensik, ist eine Analyse der intakten Gefäße erforderlich. Bisher wurden im Wesentlichen zwei Technologien zur Darstellung der Mikrogefäße verwendet: einerseits die sogenannte Ausguss-Methode, und
20 zweitens die radiologische Kontrastmitteldarstellung, insbesondere die Microfil®-Methode.

3D-Darstellungsmethoden wie Micro Computed Tomography (Micro-CT) haben in den vergangenen Jahren vermehrte Aufmerksamkeit erregt. Die Darstellung des Gefäßsystems erfordert eine Perfusion mit einem röntgenopaken (radiopaquen) Kontrastmittel zur
25 Visualisierung mittels Micro-CT. In der Gefäßforschung wurde Micro-CT bisher in Kombination mit verschiedenen Kontrastmitteln verwendet, um das Gefäßsystem verschiedener Organe, wie z.B. Hirn, Herz, Leber, Niere, Lungen, sowie der hinteren Extremitäten, als auch von Tumoren darzustellen. Diese Studien waren aber stets hinsichtlich der Auflösung limitiert, oder aber durch eine unvollständige Füllung und
30 fehlerhafte Perfusion (auch aufgrund der relativ hohen Viskosität des verwendeten Kontrastmittels) (z.B. Perrien, D.S., 2016).

Bei der Ausguss-Methode (engl.: vascular corrosion casting) wird Giessmaterial, z.B. ein zu polymerisierendes, auf Polyurethan basiertes Mittel, in die Gefäße injiziert (z.B. Meyer

et al., 2007 & 2008; Krucker et al., 2006). Anschliessend, nach dessen Polymerisation, wird das umliegende Gewebe chemisch mazeriert und verdaut. Die so entstandenen Gefässausgüsse werden anschliessend mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) oder radiologisch dreidimensional ausgewertet. Es besteht auch die Möglichkeit, ein
5 dreidimensionales Gefässmodell zu erstellen. Der schwerwiegende Hauptnachteil dieser Methode entsteht durch die Gewebemazeration, da diese eine (anschliessende) histologische Untersuchung ausschliesst und dementsprechend auch nicht einmal eine Lokalisierung innerhalb des Gewebes möglich ist. Ein weiterer Nachteil dieser Methode beim Einsatz der Rasterelektronmikroskopie ist die limitierte Darstellbarkeit von Gefässen,
10 da man zwar ein Bild von Gefässen an der Aussenoberfläche des Gefässausgusses erhält, aber nicht im Inneren des Ausgusses.

Die Microfil®-Methode eignet sich vor allem für die Darstellung von Gefässen mit einem Durchmesser von bis zu 100 μm . Da dieser Gefässdurchmesser kaum Rückschlüsse auf das Kapillargebiet zulässt, wird die Anwendung vom Benutzer auf verschiedene Arten
15 modifiziert. Das heisst, der Benutzer variiert je nach Bedarf jeweils die Zusammensetzung der Kontrastmittelsubstanz durch Verdünnung oder anderweitige Veränderung, sodass das Kontrastmittel in kleinere Gefässe eindringen kann. In der Regel kann so ein Kapillargebiet von bis zu 10 μm erreicht und dargestellt werden. Die Art der Verdünnung oder Veränderung der Kontrastmittelzusammensetzung erfolgt jedoch nach keinem
20 bekannten Standard, sondern individuell. Die Applikation erfolgt in der Regel manuell. Gemäss publizierten Studien ist die Perfusion, wahrscheinlich infolge einer relativ hohen Viskosität, trotzdem mangelhaft (Perrien, D.S. 2016).

Der Austausch von Sauerstoff und Metaboliten findet hauptsächlich auf Höhe des Kapillarbettes statt, also bei Gefässdurchmessern von ca. 4 bis 10 μm . Präklinische Studien
25 beschränken sich in der Regel auf die Darstellung von Mikrogefässen mittleren Durchmessers (ca. 15 μm). Mittlerweile stehen der Forschung MikroCT-Scanner bzw. Mikro-CT-Geräte zur Verfügung, welche Kapillaren bis zu einem Durchmesser von 3-4 μm darstellen können, sofern diese Kapillaren mit einem geeigneten zugefügten Kontrastmittel auch erreicht und gefüllt werden können.

30 Entsprechend besteht ein grosser Bedarf für ein Kontrastmittel, welches genügend weit in die kleinsten Gefässe vordringen kann und eine möglichst Artefakt-freie Visualisierung der Microvaskulatur bzw. eine morphometrische 3D-Bildanalyse mittels Micro-CT ermöglicht (siehe auch Zagorchev et al., 2010).

DARSTELLUNG DER ERFINDUNG

Entsprechend löst die vorliegende Erfindung die Aufgabe, ein verbessertes Kontrastmittel zur Verfügung zu stellen, welches bis in Kapillaren mit einem Durchmesser von bis zu 3-4
5 μm einzudringen vermag und so eine Darstellung der Gefässe mittels Micro-CT-Verfahrens ermöglicht. Ebenso besteht ein grosser Bedarf für ein verbessertes *ex vivo* Angiografieverfahren, welches eine reproduzierbare Darstellbarkeit des Gefässsystems erlaubt. Mit der Entwicklung der erfindungsgemässen Kontrastlösung steht nun ein solches verbessertes Kontrastmittel, welches die Nachteile des momentanen Standes der Technik
10 überwindet, sowie ein verbessertes Angiografieverfahren zur Verfügung.

Die oben beschriebene Aufgabe wird durch das Kontrastmittel gemäss Anspruch 1 gelöst, bzw. durch den in Anspruch 10 beanspruchten Kit-of-Parts. Die Bereitstellung des verbesserten Kontrastmittels erfolgt vorzugsweise nach dem Herstellungsverfahren gemäss
15 Anspruch 14, und das *ex vivo* Mikroangiografie-Verfahren gemäss Anspruch 15 ermöglicht eine reproduzierbare und damit optimierte Anwendung des erfindungsgemässen Kontrastmittels.

Das erfindungsgemässe Kontrastmittel, welches es ermöglicht, Kapillaren mit einem Durchmesser von bis zu 3-4 μm darzustellen, wird *ex vivo* eingesetzt. Das erfindungsgemässe Kontrastmittel für *ex vivo* bzw. postmortale Mikroangiografie dient
20 vorzugsweise zur digitalen Bildgebung und somit der Untersuchung des Gefässsystems einer Maus oder einer Ratte, oder anderer Labortiere und menschlicher Organe mittels eines Micro-CT-Geräts. Das erfindungsgemässe Kontrastmittel enthält ein iodiertes, verestertes Öl, vorzugsweise ein iodiertes, verestertes Leinsamenöl (Leinöl) oder ein iodiertes, verestertes Mohnsamenöl (Mohnöl). Zudem weist das erfindungsgemässe
25 Kontrastmittel ein Polyurethan und einen Härter auf, sowie ein Keton als Lösungsmittel. Das Keton ist vorzugsweise ausgewählt aus der folgenden Gruppe: Butanon (bzw. 2-Butanon bzw. Methylethylketon bzw. $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$), Aceton (bzw. 2-Propanon bzw. Dimethylketon bzw. $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$), oder 3-Pentanon (bzw. Diethylketon bzw. $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}$). Dabei wird als Lösungsmittel insbesondere 2-Butanon oder Aceton bevorzugt, am meisten
30 bevorzugt ist 2-Butanon. Alternativ kann unter Umständen als Lösungsmittel auch Methylenchlorid verwendet werden. Die Mischung von dem iodierten, veresterten Öl mit dem Keton wird für den Zweck dieser Anmeldung als „Kontrastlösung“ bezeichnet.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform des Kontrastmittels enthält ausserdem einen

Farbstoff, wobei der Farbstoff vorzugsweise ein blauer Farbstoff ist (z.B. BlueDye von VasQtec). Im Falle der Beifügung eines Farbstoffs, ist dieser auch Teil der zum Zweck dieser Anmeldung als „Kontrastlösung“ bezeichneten Mischung.

Eine bevorzugte Ausführungsform enthält, wie oben erwähnt, als iodiertes verestertes Öl ein iodiertes, verestertes Leinsamenöl. Das erfindungsgemäße Kontrastmittel ist somit eine jodhaltige und vorzugsweise auch farbstoffhaltige, polymerisierende Substanz, welche vorzugsweise auf iodiertem, verestertem Leinsamenöl basiert. Vorzugsweise ist das iodierte, veresterte Leinsamenöl Ethyl-9,12,15-triiodo-octadecatrienoat, bzw. Ethyl-Linolenat.

Das erfindungsgemäße Kontrastmittel verfügt vorzugsweise über autofluoreszierende Eigenschaften und führt dazu, dass sich in der initialen Applikationsphase die Gefäße vorzugsweise blau verfärben, was die optische Kontrolle der Injektion erleichtert.

Vor der Applikation bzw. Injektion in den zu untersuchenden Körper bzw. selektiv in das zu untersuchende Organ wird die Kontrastlösung nach einem definierten Schema mit dem erwähnten Polyurethan (PU-) Resin und mit einem Härter gemischt.

Das zur Herstellung des erfindungsgemässen Kontrastmittels verwendete Polyurethan ist vorzugsweise ein Polyisocyanat-Präpolymer. Es handelt sich dabei vorzugsweise um ein aliphatisches Isocyanat. Vorzugsweise weist das Isocyanat eine aromatische oder vorzugsweise eine aliphatische Gruppe auf. Damit das Polyurethan flexibel bleibt, werden normalerweise Polyether eingesetzt. Es ist besonders vorteilhaft, wenn das Polyurethan einen Polyester, oder vorzugsweise einen Polyether enthält, insbesondere bevorzugt einen Polyether, der aus Ethylenglykol- und/oder Propylenglykol-Resten gebildet ist. Vorzugsweise weist das Polyurethan einen Kettenverlängerer auf, insbesondere ein Diol oder vorzugsweise einen Diamin-basierten Kettenverlängerer, insbesondere bevorzugt Diethylmethylbenzoldiamin. Eine besonders für die Mikroangiografie geeignetes Kontrastmittel weist als Polyurethan 4,4'-Methylendi(cyclohexyl-isocyanat) (HDMI) auf, bzw. 4,4'-Dicyclohexylmethan-diisocyanat.

Der im erfindungsgemässen Kontrastmittel verwendete Härter, welcher vorzugsweise erst kurz vor der Einspritzung in den Körper, bzw. selektiv in ein Organ, der Mischung aus dem iodierten, veresterten Öl, Butanon, und PU beigemischt wird, ist vorzugsweise ein modifiziertes aromatisches Diamin, insbesondere bevorzugt ein Diethylmethylbenzoldiamin, beispielsweise 2,6-diamino-3,5-diethyltoluen. Ein für die Verwendung im erfindungsgemässen Kontrastmittel besonders vorteilhafter Härter weist

eine Mischung von zwei Isomeren von Diethylmethylbenzoldiamin auf, am meisten bevorzugt ein Isomerengemisch von 2,6-Diamino-3,5-diethyltoluol und 2,4-Diamino-3,6-diethyltoluol im Verhältnis 7:3.

5 Vorteilhafterweise ist das iodierte, veresterte Öl zu 20-60%, vorzugsweise zu 22-45%, insbesondere bevorzugt zu 24-30% im Kontrastmittel enthalten (jeweils Volumenprozent).

Das Keton, bzw. vorzugsweise das 2-Butanon, ist vorteilhafterweise zu 7-30%, vorzugsweise zu 10-25%, insbesondere bevorzugt zu 14-22% im Kontrastmittel enthalten (jeweils Volumenprozent).

10 Das Polyurethan ist vorteilhafterweise zu 25-60%, vorzugsweise zu 35-50%, insbesondere bevorzugt zu 38-50%, und am meisten bevorzugt zu 43-47% im Kontrastmittel enthalten (jeweils Volumenprozent).

Der Härter ist vorteilhafterweise zu 4-10%, vorzugsweise zu 5-9%, insbesondere bevorzugt zu 6-8% im Kontrastmittel enthalten (jeweils Volumenprozent).

15 Die Erfindung betrifft ausserdem einen Kit-of-Parts für Mikroangiografie, umfassend:

- einen ersten Behälter, der das oben erwähnte iodierte, veresterte Öl, und das erwähnte Keton, bzw. vorzugsweise das 2-Butanon enthält; und
- einen zweiten Behälter, der das oben erwähnte Polyurethan enthält; und
- einen dritten Behälter, der den oben erwähnten Härter enthält.

20 Der erste Behälter enthält dabei vorzugsweise eine erste Mischung aus 2-4 ml, vorzugsweise 2.5-2.8 ml des iodierten, veresterten Öls, vorzugsweise des iodierten, veresterten Leinsamenöls, und 2-3 ml, vorzugsweise 2.2-2.9 ml des Ketons, bzw. des 2-Butanons. Das heisst, der erste Behälter enthält die „Kontrastlösung“. Dabei enthält der erste Behälter vorzugsweise zusätzlich den oben erwähnten Farbstoff, vorzugsweise einen

25 blauen Farbstoff, welcher im Falle seiner Beimischung auch zu der „Kontrastlösung“ gehört. Die Beigabe einer Messerspitze des Farbstoffs, was ca. 0.2 g des Farbstoffs entspricht, reicht bereits für die vorliegende Anwendung. Der zweite Behälter enthält vorzugsweise 4-7 ml, insbesondere bevorzugt 4.5-5 ml des Polyurethans; und der dritte Behälter enthält vorzugsweise 0.5-1.5 ml, insbesondere bevorzugt 0.8-1.2 ml des Härters.

30 Vorzugsweise liegt in dem zu injizierenden Gemisch das Volumenverhältnis des Polyurethans zum Härter im Bereich von 100:10 bis 100:25, insbesondere bevorzugt im Bereich von 100:16 bis 100:19.

Vorzugsweise enthält der Kit-of-Parts des Weiteren

- eine erste Spritze zur Aufnahme des Inhalts des ersten Behälters und des zweiten Behälters, vorzugsweise eine Spritze mit 12 ml Volumen;
- eine zweite Spritze zur Aufnahme des Inhalts des dritten Behälters, vorzugsweise eine Spritze mit 1 ml Volumen;
- 5 - einen Mischbehälter zur Vermengung des Inhalts der ersten Spritze und der zweiten Spritze;
- einen Dispenser zur Steuerung der ersten Spritze und der zweiten Spritze, wobei der Dispenser eine Vorrichtung zur Aufnahme eines jeweils ersten Endes der ersten und der zweiten Spritze aufweist;
- 10 - und vorzugsweise ein Adapterelement zur Aufnahme eines jeweils zweiten Endes der ersten und der zweiten Spritze und zur Aufnahme eines ersten Endes des Mischbehälters.

Die Erfindung betrifft ausserdem ein Verfahren zur Herstellung des oben beschriebenen
15 Kontrastmittels für Mikroangiografie, zur digitalen Bildgebung eines Gefässsystems einer Maus oder einer Ratte mittels eines Micro-CT- (μ CT-) Geräts, wobei das Herstellungsverfahren die folgenden Schritte aufweist:

- a) Bereitstellung einer ersten Mischung von iodiertem, verestertem Öl, vorzugsweise von iodiertem, verestertem Leinsamenöl, mit einem Keton, vorzugsweise mit 2-
20 Butanon, in einem ersten Behälter;
- b) Bereitstellung eines Polyurethans in einem zweiten Behälter;
- c) Bereitstellung eines Härters in einem dritten Behälter;
- d) Vermengung und Mischen des Inhalts des ersten Behälters mit dem Inhalt des zweiten Behälters zu einer zweiten Mischung;
- 25 e) Vermengung des Inhalts des dritten Behälters mit der zweiten Mischung von Schritt d) in einem Mischelement unmittelbar vor der Einspritzung in das Gefässsystem der Maus oder der Ratte; wobei vorzugsweise ein Mischverhältnis von 100:16 des Polyurethans zum Härter verwendet wird.

30 Die Erfindung betrifft des Weiteren ein Verfahren für Mikroangiografie zur digitalen Bildgebung eines Gefässsystems eines Tierkörpers, insbesondere einer Maus oder einer Ratte, mittels eines Micro-CT-Geräts, aufweisend die folgenden Schritte:

- Bereitstellung des oben beschriebenen Kontrastmittels, vorzugsweise nach dem oben

beschriebenen Verfahren;

- Kanülierung und Ausspülung bzw. Ausbluten des zu untersuchenden Tierkörpers, vorzugsweise mit einer Klarlösung, insbesondere mit PBS (phosphatgepufferte Salzlösung, engl.: phosphate buffered saline), wobei vorzugsweise für eine Maus
5 eine Spülmenge von 20-100 ml, und alternativ für eine Ratte eine Spülmenge von 20-200 ml verwendet wird;
- Injektion des Kontrastmittels, vorzugsweise mit gleichmässiger Flussrate und vorzugsweise bei möglichst gleichmässigem Druck, wobei die Flussrate vorzugsweise maximal 3 ml/min, insbesondere bevorzugt maximal 1.5 ml/min
10 beträgt.

Die Applikation bzw. Injektion des Kontrastmittels kann entweder manuell mittels eines Dispensers erfolgen, oder alternativ mittels einer Injektionspumpe bzw. mittels eines vorzugsweise modifizierten, bzw. einen auf individuelle Anforderungen angepassten Perfusors, mittels welchem ein bestimmtes Volumen pro Zeiteinheit eingehalten werden
15 kann.

Für eine Maus werden normalerweise zwischen 1-12 ml des Kontrastmittels injiziert, und für eine Ratte normalerweise zwischen 1-30 ml des Kontrastmittels, abhängig vom zu untersuchenden Zielorgan.

Die Injektion des Kontrastmittels in die Maus oder Ratte erfolgt vorzugsweise während
20 eines Zeitfensters von 1-6 min, wobei vorzugsweise für eine Maus oder eine Ratte eine Einspritzrate von 0.5-12 ml/min, insbesondere bevorzugt von 1-3 ml/min verwendet wird, am meisten bevorzugt von maximal 1.5 ml/min.

Nach der Injektion des Kontrastmittels wird vorzugsweise eine Aushärtung des Kontrastmittels im Tierkörper abgewartet. Als Nächstes wird das betreffende Organ oder
25 der betreffende Körperteil ausgeschnitten und chemisch fixiert, und anschliessend mittels eines Micro-CT-Geräts gescannt.

Das erfindungsgemässe Kontrastmittel eignet sich in erster Linie für Versuchszwecke, d.h. in der präklinischen Forschung für die Perfusion von Kleintierkörpern, insbesondere von Maus und Ratte. Es kann aber beispielsweise auch für die selektive Perfusion einzelner
30 Gebiete oder Organe von grösseren Versuchstieren verwendet werden, so z.B. von Kaninchen, Hunden, Fischen, Schafen, Minischweinen, etc. Diese werden beispielsweise in der orthopädischen oder zahnmedizinischen Forschung (Zahnersatz, Knochenersatz, etc.) eingesetzt. Zu diesem Zweck wird das Kontrastmittel spezifisch in jene Arterie, deren

„Endgebiet“ dargestellt werden soll, eingespritzt. Auf diese Weise kann in einzelne Organe oder Körperteile, wie z.B. in den Unterkiefer, etc. selektiv Kontrastmittel injiziert werden und die entsprechenden Organe oder Körperteile können dann dargestellt werden. Das erfindungsgemäße Kontrastmittel eignet sich auch für die Anwendung in der Forensik, und dabei insbesondere auch bei der gerichtsmedizinischen Untersuchung von menschlichen Leichen.

Die Bereitstellung des erfindungsgemässen Kontrastmittels öffnet neue Anwendungsgebiete für *ex vivo* Micro-CT Technologie in diversen Gebieten der Biomedizinischen Forschung. Während bei der PU-Verdauungsmethode nach dem Stand der Technik nach dem CT-Scan umliegendes Gewebe weg-verdaut werden muss, um ein 3D-Modell des Gefässsystems zu erhalten, erlaubt es das erfindungsgemäße, nicht-destruktive Verfahren, einerseits hochauflösende Bilder des Gefässsystems zu erhalten und andererseits können anschliessend bereits gescannte Proben zudem als Grundlage für histologische oder elektronenmikroskopische Untersuchungen dienen, da umliegendes Gewebe intakt bleibt. Ebenso können die besonders interessierenden Organteile rausgeschnitten und bei einer noch höheren Auflösung gescannt werden. Die Bildanalyse erfolgt dann unter Verwendung einer geeigneten Quantifizierungs-Software.

Nachgewiesen wurde der vorteilhafte Einsatz des Kontrastmittels beispielsweise für die Morphometrie des Nieren-Gefässsystems, einschliesslich einer Quantifizierung von Nieren-Glomeruli bei Mäusen mit einer Auflösung von bis unter 2.5 Micrometer (voxel side size) (Shokiche, C.C. et al, 2016), sowie in der korrelativen Darstellung des Gefässsystems und Muskelgewebes der hinteren Extremität der Maus (Schaad et al., 2017). Bei einer Perfusion des Tierkörpers mit Microfil® (Fluitec), dem bisherigen Standard-Bildgebungsverfahren, kann normalerweise eine Auflösung von bis zu ca. 50-100 Micrometer erreicht werden. Um diese Auflösung zu verbessern, wurde das Microfil® von Angiografie-Technikern individuell verdünnt, was je nach Verdünnungsgrad eine Auflösung von bis zu ca. 12 Micrometern erlaubte. Die Perfusion von kleineren Gefässen und Kapillaren ist aber infolge mehrerer Faktoren, wie beispielsweise der höheren Viskosität, mangelhaft (Perrien D.S., 2016).

Das erfindungsgemäße Kontrastmittel mit der Kontrastlösung hingegen dringt bis in die kleinsten Kapillaren von bis zu 3-4 Mikrometern Durchmesser ein und erlaubt so eine detailliertere Darstellung des Gefässsystems. Das erfindungsgemäße Anwendungsverfahren bietet auch eine reproduzierbare niedrige Viskosität (im Vergleich

zu den diversen individuellen Modifikationen der Microfil®-Methode).

Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemässen Kontrastmittels ist der, dass die Polymerisierung dem Testobjekt zusätzliche Stabilität verleiht, was insbesondere während des Micro-CT-Scans von Vorteil ist, da es die Qualität der Bildgebung verbessert. Ebenso weist das neue auf der Kontrastlösung basierende Kontrastmittel einen hohen Röntgen-Absorptionsgrad auf, welcher nahe bei demjenigen von Knochengewebe ist. Dies vereinfacht eine auf Schwellenwerten basierende Segmentierung der darzustellenden Gefässe und deren Visualisierung.

Die Aushärtungs- und Autofluoreszenz-Eigenschaften des erfindungsgemässen Kontrastmittels erlauben somit zusammenfassend eine korrelative Herangehensweise, d.h. nach der Micro-CT-Bildgebung und Definition der weiter zu erforschenden Gewebeabschnitte, kann zusätzlich eine morphologische Analyse durch Histologie und Transmissionselektronenmikroskopie an denselben Versuchsobjekten durchgeführt werden. Das erfindungsgemässe Kontrastmittel verbleibt in den perfundierten Blutgefässen und ist autofluoreszent, was die „Lokalisierung“ eines spezifischen histologischen Schnittes innerhalb des virtuellen Micro-CT-Schnitt-Stapels erleichtert.

Bezogen auf die Nierenmorphometrie, können weder bisherige Hochfeld-MRI-Techniken noch die vor Kurzem beschriebene Methode mit „Lightsheet Microscopy“ mittels in vivo antiCD31-Markierung eine Darstellung des Gefässbaums der Niere in dem Ausmass bieten, wie das auf Micro-CT basierte Morphometrie-Verfahren mit dem erfindungsgemässen Kontrastmittel. Zudem ermöglicht dieses Verfahren eine 3D-Skeletonisierung und eine entsprechende Analyse des Organgefässsystems mittels bereits öffentlich verfügbarer Software. Neben der raschen 3D-Gefässdarstellung erlaubt das auf Micro-CT basierte Morphometrie-Verfahren eine grosse Zeiteinsparung (unter 24 Stunden gegenüber 1-2 Wochen bei dem klassischen, auf Histologie basierenden Verfahren oder der Ausgussmethode).

Überraschenderweise wurde festgestellt, dass das erfindungsgemässe Kontrastmittel auch zur Visualisierung von Knochengefässen nach der Entkalkung verwendet werden kann.

Für die vorangehende Entkalkung, welche zum Stand der Technik gehört und nicht Gegenstand der Erfindung ist, können grundsätzlich drei Haupttypen von Entkalkungsmitteln verwendet werden: erstens solche, die auf starken Mineralsäuren basieren, wie beispielsweise Salzsäure oder Salpetersäure, zweitens solche, die auf

schwächeren organischen Säuren basieren, wie beispielsweise Ameisensäure (z.B. in einer einfachen 10% wässrigen Lösung oder kombiniert mit Formalin oder mit einem Puffer) oder Trichloressigsäure, und drittens solche, welche aus sogenannten Chelatbildnern zusammengesetzt sind, z.B. eine 10% EDTA Lösung. Für den Zweck der Sichtbarmachung von Knochengefäßen werden vorzugsweise Chelatbildner verwendet. EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) wirkt zwar langsam, aber bewirkt wenig Gewebeerstörung und herkömmliche Anfärbereagenzien werden kaum beeinflusst. Eine mögliche Zusammensetzung eines auf EDTA basierenden Entkalkungsmittels ist eine Mischung aus 250 g EDTA Dinatrium-Salz und 1750 ml destilliertem Wasser, wobei die Lösung auf pH 7 eingestellt wird, vorzugsweise durch Beigabe von ca. 25 g Natriumhydroxid.

Weitere Ausführungsbeispiele sind in den abhängigen Ansprüchen beschrieben.

15 KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

Das erfindungsgemäße Kontrastmittel fand bisher beispielsweise Einsatz bei der Darstellung der Vaskulatur der hinteren Extremität einer Maus (siehe Fig. 1), sowie der Nierenvaskulatur und Glomeruli (Fig. 2-5).

20 Bevorzugte Ausführungsformen, bzw. Beispiele für Anwendungen der Erfindung werden im Folgenden anhand der Zeichnungen beschrieben, die lediglich zur Erläuterung dienen und nicht einschränkend auszulegen sind. In den Zeichnungen zeigen:

Fig. 1 Vaskulatur der unteren hinteren Extremität einer Maus, visualisiert durch MicroCT; wobei A) eine laterale 3D Ansicht zeigt, bei einer Voxel-Seitenlänge von 2.7µm; B) ein virtueller Transversalschnitt der Vaskulatur (auf dem in A angegebenen Niveau), bei einer Voxel-Seitenlänge von 0.8, bzw. 0.66µm: Tibia (T) und Fibula (F) scheinen leicht gefärbt aufgrund ihrer hohen Röntgenabsorption; in C-F sind virtuelle Transversalschnitte des isolierten Soleus Muskels (C, D) bzw. des Plantaris Muskels (E, F) dargestellt; in C'-F') sind spezifische Ausschnitte detaillierter dargestellt, markiert durch Rechtecke in C)-F); wobei die Mikrovaskulatur bei höherem

Vergrößerungsgrad in Volumendarstellung abgebildet ist, mit unterschiedlicher Gefässdichte, Tortuosität, und 3D-Anordnung.

Fig. 2 verschiedene Visualisierungsmodalitäten der Nierenvaskulatur und der
5 Glomeruli; wobei in A) der rekonstruierte 3D-Stapel des Micro-CT-Datensatzes mit Fokus auf der Nierenvaskulatur dargestellt ist; In B ist ein virtueller Schnitt durch den Datensatz dargestellt, unter Verwendung einer anderen Transferfunktion: Die Visualisierung ist auf das Nierengewebe fokussiert; C-C' zeigen die Visualisierung mit Fokus auf die Glomeruli:
10 Abbildung C zeigt ein Volumen-Rendering einer virtuellen 500 µm dicken Scheibe, wie durch die weisse Box unten links angezeigt; der weisse Rahmen in C zeigt die Stelle mit den Glomeruli in höherer Vergrößerung in Abbildung C' an; Abbildung D-D' stellt die fortgeschrittene Visualisierungsoption dar: Microangio-CT bei einer höheren Auflösung
15 (Voxelseitenlänge =0.59µm). Der Einsatz in Abbildung D zeigt das in D gezeigte virtuelle Schnittniveau; Das 3D-Volumen-Rendering der Mikrovaskulatur eines in D markierten Glomerulus ist in D' dargestellt.

Fig. 3 Korrelative Mikroskopie: Visualisierung von korrespondierenden Stellen
20 unter Verwendung der Micro-CT-Daten und des histologischen Ansatzes. Nach der Bildgebung wurde die fixierte Niere zwecks histologischem Schnitt und Untersuchung weiter verarbeitet; Abbildungen a-c zeigen die Visualisierung desselben Niveaus (Schnittes) derselben Niere, unter Verwendung von Hellfeld- (a & a') und Fluoreszenz- (b & b') Mikroskopie,
25 sowie Micro-CT (c & c'). Das grüne Signal in b und b' kommt vom autofluoreszierenden Kontrastmittel, welches in den Gefässen polymerisiert. Diese Eigenschaft erleichtert die Registrierung zwischen Histologie und Micro-CT aufgrund der Orientierung auf grössere Gefässe. In den Abbildungen a'-c' sind die in a-c markierten Regionen vergrössert dargestellt. Die Glomeruli sind mit Kreisen in a'-c' dargestellt.
30

Fig. 4. Schema des angewandten kombinierten Fraktionator/Dissektor-Prinzips für stereologische Schätzung der Glomeruli-Zahl, basierend auf (a)

histologischen und (b) Micro-CT Daten. a) Klassisches histologisches Prinzip: ausführliche Sektionierung der gesamten Niere, in Schnittpaaren bei 15µm Distanz (Dissektor Höhe (engl.: „disector height“) in ca. 10 equidistanten Niveaus (SSL: section sampling level, ca. 1mm). Schnittdicke 5µm. Für die Disektor-Höhe wird jeder dritte Schnitt verwendet, und für den SSL werden 197 Schnitte (200-3) weggeworfen, bis das nächste relevante Disektor-Paar verwendet wird. Auf den korrespondierenden Abbildungen, welche einen Disektor bilden, werden die Glomeruli gezählt, welche in einem Abschnitt und nicht im anderen auftauchen, und innerhalb des Zählrahmens liegen ohne die linke und untere Linie zu berühren (schwarze Häkchen). Die geschätzte Zahl wird durch den umgekehrten Schnittprobenfaktor (SSF) und Flächenprobenfaktoren (ASF) multipliziert, um die auf der Histologie basierende absolute Zahl von Glomeruli pro Niere zu erhalten (Nabs-histo(glom)) (siehe Text).

b) Prinzip gemäss µaCT (Microangio-CT): Beinahe das gleiche Prinzip basierend auf virtuellen Bildstapeln, aus Micro-CT-Daten. Disektor Höhe (16µm oder 8 voxel Höhe) und Schnittmuster-Niveau (1mm oder 500 voxel Höhe) werden realisiert, indem die entsprechenden Schnittzahlen des Voxel-Stapels verwendet werden (linke Seite der Abbildung). Schnitt/Voxel-Höhe: 2µm. Alle Glomeruli auf einem gesamten Schnittniveau wurden nach dem Disektor-Prinzip gezählt (Häkchen), sodass kein Zählrahmen nötig ist. Die geschätzte Glomeruli-Zahl wird nur mit dem umgekehrten Schnittmuster-Faktor multipliziert, wodurch kein Bedarf für den Flächenmuster-Bruchteil besteht, um die gesamte Zahl der Glomeruli pro Niere zu erhalten (Nabs - µaCT (glom)).

Fig. 5. Schema des vorgeschlagenen Mikroangio-CT-Verfahrens der Niere (nach Fig. 2-4) unter der Verwendung des erfindungsgemässen Kontrastmittels.

Fig. 6. Vaskulatur des Tibiaknochens einer Maus, dargestellt mittels microCT unter Anwendung des erfindungsgemässen Kontrastmittels; (6a) und (6b) zeigen beide einen virtuellen Querschnitt durch denselben Tibiaknochen, wobei in (6a) der Knochen vor und in (6b) nach der Entkalkung mit EDTA 10%

5 abgebildet ist. Aufgrund der höheren Röntgenabsorption scheint Tibiaknochen (T) in (6a) heller, und in (6b) infolge der niedrigen Röntgenabsorption nach der Entkalkung transparent. Demzufolge sind die kleinen, quer durch Knochengewebe durchlaufende Verbindungsgefäße zwischen Periostalgefäßen und Gefäßen der Knochenmarkhöhle (KH) in (6b) besser sichtbar und auffindbar (aufwärts gerichtete Pfeile). Die Visualisierung der Gefäße innerhalb der Knochenmarkhöhle ist infolge der geringeren Röntgenabsorption des entkalkten Knochengewebes der Tibia in (6b) sichtbar besser. Am äusseren Rande der Tibia sind die Versorgungarterien (avn=arteria und vena nutricia) gut erkennbar.

10 Fig. 7. Vaskulatur des Tibiaknochens einer Maus, dargestellt mittels microCT unter Anwendung des erfindungsgemässen Kontrastmittels; (7a) und (7b) zeigen beide den virtuellen Längsschnitt durch denselben Tibiaknochen, wobei in (7a) der Knochen vor und in (7b) nach der Entkalkung mit EDTA 10% 15 abgebildet ist. Aufgrund der höheren Röntgenabsorption scheint der Tibiaknochen (T) in (7a) heller, in (7b) infolge der niedrigen Röntgenabsorption nach der Entkalkung transparent. Demzufolge sind die durch Knochengewebe hindurch laufenden Knochengefäße (avn=arteria und vena nutricia) in (7b) einfacher zu verfolgen, obwohl sie auch in (7a) sichtbar sind. In der Mitte der Knochenmarkhöhle (KH) ist der Zentrale Sinus (ZS) mit seinen Verbindungen gut sichtbar.

25 BESCHREIBUNG BEVORZUGTER AUSFÜHRUNGSFORMEN

1. Vorbereitung der einzelnen Komponenten:

Es werden 3 Behälter bereitgestellt. Behälter 1 enthält eine erste Mischung aus iodiertem, verestertem Öl, vorzugsweise iodiertes, verestertes Leinsamenöl (Leinöl) und 2-Butanon (C_4H_8O), und einen Farbstoff (BlueDye von VasQtec). Diese erste 30 Mischung, ob mit oder ohne Farbstoff, wird im Rahmen dieser Anmeldung „Kontrastlösung“ genannt. Behälter 2 enthält das Polyurethan (PU). Behälter 3 enthält den Härter.

2. Entfernung der Kontrastlösung aus dem Behälter 1:
Aufschrauben einer 12ml-Einwegspritze (z.B. Monoject syringe with luer lock c1086, Qosina) auf Luer Connector (Needlefree Swabable Valve Female Luer to 20mm Vial Cap Polycarbonate, Value Plastic) des Behälters 1; Einspritzen von 5
5 ml Luft in den Behälter 1 (aufrechter Druck), Umdrehen des Behälters 1, Aspiration der kompletten Kontrastlösung in die Spritze.
3. Herstellung einer zweiten Mischung aus Kontrastlösung und Polyurethan:
Einspritzen der Kontrastlösung in den Behälter 2 (welcher das PU enthält);
10 Entfernung der Spritze und Verschliessen des Luer Connectors mit Luer Kappe.
4. Mischung der zweiten Mischung:
Mischen der zweiten Mischung in Behälter 2 auf einem Vortex-Gerät. Die Viskosität der für die bisherigen Versuche verwendeten zweiten Mischung aus
15 Kontrastlösung und PU (ohne Härter) beträgt ca. 100 mPas.s bei 20°C.
5. Aspiration der zweiten Mischung in einer Spritze:
Entfernung der Luer Kappe; Einspritzen von 10 ml Luft in den Behälter 2
Umdrehen des Behälters 2 und Aspiration der zweiten Mischung in eine 12ml-
20 Einwegspritze.
6. Aspiration des Härters:
Aufschrauben einer 1ml-Einwegspritze (1 ml syringe with luer slip c3302, Qosina) auf den Behälter 3 (bzw. auf einen auf Behälter 3 befestigten Luer Connector);
25 Einspritzen von 0.5 ml Luft in den Behälter 3; Aspiration des gesamten Härters (1 ml).
7. Lagerung/Entfernung von Mikrobläschen:
Zur Entlüftung der Spritzeninhalte, d.h. zur Entfernung von Mikrobläschen, werden
30 die Spritzen für mindestens 15 min in eine aufrechte Position gebracht.
8. Vorbereitung der Maus/Ratte:
Zunächst wird das Tier tief betäubt oder euthanasiert und dann kanüliert. Das

Ausspülen des Tierkörpers erfolgt mit 2 x 5-50 ml Klarlösung, vorzugsweise mit isotonischer Lösung, wie beispielsweise PBS (phosphate buffered saline) Lösung. Vorzugsweise wird das Tier in zwei Hälften ausgespült (und dann auch jede Hälfte einzeln mit Kontrastmittel gefüllt).

5 8a.) Zwecks Kanülierung und Ausspülung der *unteren* Körperhälfte wird eine Kanüle (z.B. BD Neoflon 0.6x19 mm, 26G, von Aichele Medica AG) in die Aorta eingeführt, mit anschliessender antegrader Perfusion der Klarlösung, d.h. vom Herz weg. Der Einstichort in die Aorta befindet sich vorzugsweise im Thorakalbereich der Aorta. Ein Indiz für die Füllung der
10 unteren Körperhälfte ist das Ballonieren des Herzens: Wenn das Herz beginnt, zu ballonieren, wird eine Inzision im rechten Vorhof vorgenommen. Dort läuft die Klarlösung dann aus, zunächst vermischt mit dem ausgespülten Blut des Tieres. Sobald die aus der Vorhof-Inzision austretende Klarlösung klar austritt, kann davon ausgegangen werden,
15 dass die untere Körperhälfte vollständig gespült ist.

 8b.) Zwecks Kanülierung der *oberen* Körperhälfte wird eine Kanüle, am selben Einstichort eingeführt, allenfalls die gleiche Kanüle wie in Schritt 8a in umgekehrter Ausrichtung, wobei im gleichen Gefäss, d.h. in der Aorta, mit der Klarlösung retrograd, d.h. gegen das Herz, perfundiert wird.

20

9. Befestigung der Spritze:

 9a.) am (manuellen) Dispenser: Einsetzen der 12ml-Spritze und der 1ml-Spritze mit ihrem jeweiligen ersten Ende in einen 2-Spritzen-Dispenser (zwei zusammengefügte Einwegdispenser 11:1, M-System, Medmix Systems AG); Befestigen eines Adapters (Adapter L-System, Medmix Systems AG) auf das jeweilige zweite Ende der beiden Spritzen; Befestigung des Adapters an einem Mischbehälter (Mischer, ML 3.2-16-LLM, DN3.2x16, Med.LuerLock, Medmix Systems AG); oder

 9b.) an der Injektionspumpe: Befestigung beider Spritzen auf der
30 Injektionspumpe; manuelles Einstellen der richtigen Position der Pumpe; Aufschrauben des Adapters auf das jeweilige zweite Ende der beiden Spritzen; Befestigung des Adapters am Mischbehälter; Einrichtung der Pumpe (Syringe Pump LEGATO 100, 220V/50 Hz, CE, kdScientific), Wahl

der Parameter (Modus: Infuse only; Syringe: Sherwood 12ml; Flussraten: max. 1.5 ml/min; Maximalvolumen: ca. 3 ml/Maus, ca. 9-10 ml/ Ratte)

10. Injektion/Perfusion:

- 5 10a.) sorgfältig und gleichmässig, mit möglichst gleichmässigem Fluss, oder
10b.) Pumpe in Betrieb nehmen, Flussrate max. 1.5 ml/min

Füllung der gesamten unteren und/oder oberen Körperhälfte des Tierkörpers:

10 Nun wird eine Kanüle (z.B: BD Neoflon 0.6x19 mm, 26G, von Aichele Medica AG, ggf. die für die Ausspülung verwendete Kanüle) am manuellen Dispenser (Variante a) oder an der Pumpe (Variante b) befestigt.

15 Zur Perfusion der *unteren* Körperhälfte wird, wie bei der Auswaschung, das Kontrastmittel durch eine antegrade Perfusion vom gleichen Einspritzort aus, der für die Ausspülung bzw. Desanguisierung des Tieres gedient hat, in den Tierkörper in Richtung vom Herzen weg eingespritzt. Als Indiz für die Füllung der *unteren* Körperhälfte dient die Verfärbung der unteren Extremitäten in der Farbe des Kontrastmittels (vorzugsweise blauer Farbstoff).

20 Zur Füllung der gesamten *oberen* Körperhälfte mit dem Kontrastmittel wird nun, wie bei der oben beschriebenen Kanülierung bzw. Auswaschung, am gleichen Einspritzort, das Kontrastmittel in die obere Körperhälfte des Tierkörpers eingespritzt, d.h. durch eine retrograde Perfusion des Kontrastmittels. Zur Absicherung, dass kein Kontrastmittel ins Herz läuft, d.h. um eine Dilatation des linken Ventrikels zu verhindern, wird die Aorta ascendens mit einem Faden abgebunden. Wenn die oberen Extremitäten, d.h. die Pfoten, sowie die Nase des
25 Tieres die Farbe des Kontrastmittels annehmen, kann davon ausgegangen werden, dass die obere Körperhälfte des Tieres komplett gefüllt ist.

Zur Füllung eines gesamten Körpers einer Maus bzw. einer Ratte sind bis zu ca.10 ml bzw. bis zu ca. 35 ml Kontrastmittel nötig.

30

Selektive Füllung eines oder mehrerer Organe des Tierkörpers:

Alle Organe, welche der unteren Körperhälfte angehören, können wie oben beschrieben durch die gesamte Füllung der unteren Körperhälfte mit Kontrastmittel

gefüllt werden. Das Gehirn kann durch die gesamte Füllung der oberen Körperhälfte mit Kontrastmittel gefüllt werden.

Das Füllen des Herzens und/oder der Lunge muss aber selektiv durchgeführt werden: dazu wird eine Kanüle in die Aorta descendens eingeführt, wobei distal von der Aorta descendens abgeklemmt wird, damit nur die Aorta ascendens und die Herzkranzgefäße gefüllt werden. Dann wird Klarlösung (z.B. PBS) nur in diesen abgeklemmten Teil eingespritzt.

Das Lungengefäßsystem wird über die Lungenvenen, welche in den linken Vorhof des Herzens münden, retrograd gefüllt.

Zum Füllen selektiver Organe, z.B. des Herzens und/oder der Lunge sind, im Vergleich zur vollständigen Füllung des Tierkörpers, nur ca. 0.5-1.5 ml Kontrastmittel nötig.

11. Aushärtenlassen:

Nach dem Einspritzen wandert das Kontrastmittel von der Aorta über die Arterien in das Kapillarnetz und venöses System des Tierkörpers hinein und härtet dort infolge Polymerisation aus. Das Kontrastmittel sollte mindestens 20-30 min aushärten. Anschliessend wird der Tierkörperteil mit ausgehärtetem Kontrastmittel chemisch fixiert, vorzugsweise mit 2% Paraformaldehyd-Lösung, und ist dann bei 0-8°C lagerbar bis zu mehreren Monaten.

12. Bildanalyse mittels Micro-CT-Scan:

Das Bildgebungsverfahren des Tierkörpers, bzw. das Scannen mittels Micro-CT-Gerät, erfolgt im ausgehärteten Zustand. Während des Scannens darf sich der Körper nicht bewegen/bewegt werden, da dies zu Störungen der Aufnahmen führt. Zur Verhinderung von kleinsten Bewegungen sollte der Tierkörper während des Scans mechanisch fixiert werden.

Die Versuchsobjekte wurden für die in den Figuren dargestellten Bilder unter Verwendung eines „desktop microCT“ Gerätes (SkyScan 1172 oder 1272, Bruker, MicroCT, Kontich, Belgien) gescannt.

13. Lagerung:

Nach Ausführung des CT-Scans kann der Tierkörper wieder in einer 2%-

Paraformaldehyd-Lösung bei 0-8°C gelagert werden.

14. Histologie:

5 Anschliessend können histologische Untersuchungen von Tierkörperteilen oder Organen vorgenommen werden. Dazu sind die klassische Paraffin-Einbettung, die klassische histologische Schnitttechnik, Färbungen sowie Immunohistochemie anwendbar.

10 Dabei verbleibt das ausgehärtete Kontrastmittel intravaskulär und ist gut sichtbar, auch nach der histologischen Sektion. Die Autofluoreszenz des Kontrastmittels erlaubt einen direkten Vergleich der histologischen Schnitte mit den korrespondierenden virtuellen Schnitten des Micro-CT-Datensatzes.

15. Auswertung (Quantitative und qualitative Analyse des Micro-CT-Datensatzes):

15 MicroCT Projektionen können nach dem Scannen rückwärts projektionsrekonstruiert werden, z.B. unter Verwendung der NRecon Software (NReconServer64bit, Bruker, MicroCT, Kontich, Belgien), „volume-rendered“ und mittels der CTVox Software (Bruker, MicroCT, Kontich, Belgium) dreidimensional visualisiert werden. Gewebe und Blutgefässe können segmentiert und analysiert werden unter Verwendung der CTAn Software (Bruker, MicroCT, Kontich, Belgium) oder auch anderer öffentlich verfügbarer Software, wie z.B. Matlab (The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA) oder ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2016.) bestimmt.

25 Mischtests:

30 Bei der Suche nach der optimalen Zusammensetzung des Kontrastmittels wurden verschiedene Verhältnisse des iodierten, veresterten Leinöls zum 2-Butanon und zum PU getestet. Dabei wurde stets das bevorzugte konstante Verhältnis von PU zu Härter von 100:16 Gewichtsprozent verwendet. Zudem wurden jeweils 0.2 g (bzw. eine Messerspitze) eines blauen Farbstoffs in Pulverform verwendet. Die Mischtests wurden wie folgt durchgeführt:

Jede Komponente wurde einzeln bereitgestellt. Das Polyurethan (PU) wurde mit dem Butanon, dem iodierten, veresterten Leinöl, und dem Farbstoff unter Verwendung eines

Ultraschall-Bads in einem Glasbehälter gemischt. Anschliessend wurde der Härter beigefügt, und während ca. 30 sec. ebenfalls im Ultraschallbad gemischt. Der Glasbehälter mit der Mischung wurde dann in eine Vakuumkammer gestellt und gewartet, bis kleine Bläschen sich an der Oberfläche bildeten (ca. 40 sec.). Anschliessend wurde eine Spritze mit der Mischung gefüllt und die Mischung in das zu untersuchende Objekt injiziert (Perfusion).

Zur Bestimmung der Viskosität wurde die Mischung einem „Drop Fall Test“ unterzogen. Jede Minute wurden 0.1ml der Mischung auf ein Blatt Papier, welches in vertikaler Position gehalten wurde, aufgetragen. Die Mischung durchlief das Papier. Um die Viskosität zu messen, wurde die Distanz, welche von der Mischung zu bestimmten Zeitpunkten passiert wurde, beobachtet. Ein Venflon-Venenkatheter wurde auf der Spritze montiert, um die Perfusion am Körper zu imitieren. Nach dem Viskositätstest wurde der Venenkatheter mit der polymerisierten Mischung von der Spritze entfernt. Alle Venenkatheter wurden in einem micro-CT-Gerät auf die Absorption der verschiedenen Mischungen untersucht.

| Probe Nr. | PU | Härter | 2-Butanon | iod.,verestertes Leinöl | Farbstoff | Bemerkung |
|-----------|----|--------|-----------|-------------------------|----------------|-------------------------|
| 1a | 5g | 0.8ml | 2ml | 2.2ml | 1 Messerspitze | Minimum |
| 1b | 5g | 0.8ml | 2.2ml | 2.5ml | 1 Messerspitze | |
| 1c | 5g | 0.8ml | 2.2ml | 3.0ml | 1 Messerspitze | |
| 2 | 5g | 0.8ml | 2ml | 3.0ml | 1 Messerspitze | |
| 3 | 5g | 0.8ml | 1ml | 3.0ml | 1 Messerspitze | keine Perfusion |
| 4 | 5g | 0.8ml | 1.5ml | 3ml | 1 Messerspitze | keine Perfusion |
| 5 | 5g | 0.8ml | 1.5ml | 3.5ml | 1 Messerspitze | Keine Perfusion |
| 6 | 5g | 0.8ml | 2ml | 3.5ml | 1 Messerspitze | Abscheidung |
| 7 | 5g | 0.8ml | 2ml | 5ml | 1 Messerspitze | Abscheidung |
| 8 | 5g | 0.8ml | 2ml | 7ml | 1 Messerspitze | Abscheidung |
| 9 | 5g | 0.8ml | 2ml | 8ml | 1 Messerspitze | Abscheidung; max. Öl |

In Bezug auf die Polymerisation eigneten sich alle bis auf drei der getesteten Zusammensetzungen für die Perfusion. Es wurden 10 Minuten als Minimalzeit für die Perfusion festgelegt. Die Proben 1a-c, 2, 6-9 erfüllten diese Voraussetzung.

Die Tests zeigten, dass mindestens 2 ml 2-Butanon (für 5g PU und 0.8ml Härter) verwendet werden sollten. Unter diesem Wert erfolgt die Polymerisation zu schnell und erlaubt daher keine vollständige Perfusion.

Die Menge des iodierten, veresterten Öls beeinflusst ebenfalls die Polymerisationszeit. Die Proben 8 und 9 zeigten eine schnellere Polymerisation als die anderen Proben. Daher scheint es, als ob bei unverändertem Volumen des PU, des Härter und des 2-Butanons, 8ml des Öls der maximalen geeigneten Konzentration entsprechen.

Proben 6-9 zeigten eine Abscheidung von Öl und Farbstoff nach Beendigung der Polymerisation, was zur Diffusion des Kontrastmittels in das umliegende Gewebe, und möglicherweise zur Verminderung der Bildqualität führen könnte.

Proben 8 und 9 wiesen eine hohe Konzentration des iodierten Öls auf und somit auch eine hohe Absorption (ev. ähnlich wie Knochengewebe). Dies erfordert zur Reduktion der Artefakte die Verwendung eines Aluminium-Filters für das Scannen, was zu einer längeren Scan-Dauer führt. Eine hohe Absorption könnte allerdings auch die Kapillar-Erkennung positiv beeinflussen, könnte aber auch zu einer Übersättigung der Kapillar-Pixel führen, was den Partialvolumeneffekt vermindern würde und möglicherweise eine grössere Pixel-Grösse erlauben würde (in den Versuchen wurde jeweils eine isotrope Pixelgrösse von 0.8 μm verwendet).

Die Verwendung von iodiertem, verestertem Mohnöl anstatt von iodiertem, verestertem Leinöl zeigte eine gute Perfusion, aber einen schlechteren Kontrast bei der Angiographie, was wahrscheinlich auf den geringeren Iodanteil zurück zu führen ist. Die Verwendung von Aceton statt Butanon als Lösungsmittel zeigte ähnliche Effekte wie Butanon, was auch von anderen Ketonen, wie beispielsweise Diethylketon zu erwarten ist. Auch eine Verwendung von Methylenchlorid als Lösungsmittel-Alternative ist denkbar.

Folgende Messungen dienten dem Ausdruck der Konzentrationen als Gewichtsprozent in der untenstehenden Tabelle: 3.5 ml iodiertes, verestertes Leinöl wogen 4.8g. 0.8 ml Härter wogen 0.8g. 2 ml Butanon wogen 1.5g. Das verwendete PU hatte eine Dichte von ca. 1.05 g/cm^3 :

| Probe | PU | Härter | Butanon | iod.,verestertes Leinöl |
|-------|--------|--------|---------|----------------------------|
| 1a | 48.48% | 7.76% | 14.54% | 29.22% |
| 1b | 45.96% | 7.35% | 15.17% | 31.52% |
| 1c | 43.24% | 6.92% | 14.27% | 35.56% |
| 2 | 43.82% | 7.01% | 13.15% | 36.02% |
| 3 | 46.90% | 7.50% | 7.04% | 38.56% |
| 4 | 45.31% | 7.25% | 10.19% | 37.25% |
| 5 | 42.66% | 6.83% | 9.60% | 40.91% |
| 6 | 41.34% | 6.61% | 12.40% | 39.64% |
| 7 | 35.34% | 5.65% | 10.60% | 48.41% |
| 8 | 29.60% | 4.74% | 8.88% | 56.78% |
| 9 | 27.38% | 4.38% | 8.21% | 60.02% |

Optimierungstests:

Nach den Mischtests wurde die Kontrastmittel-Mischung weiterhin optimiert. Beim
5 aktuellen, oben beschriebenen Verfahren zum Einspritzen des Kontrastmittels in den zu
untersuchenden Körper bzw. das zu untersuchende Organ oder Gewebe wird ja der Härter,
bzw. der Inhalt des 3. Behälters erst beim bzw. unmittelbar vor dem Einspritzen den
restlichen Kontrastmittelkomponenten beigemischt. Dazu wird eine Doppelspritze
verwendet. Diese gibt ein gewisses Volumenverhältnis von 1:11 zwischen dem Härter und
10 der restlichen (zweiten) Mischung vor. Daher ergibt sich stets ein Härterüberschuss,
weshalb die Menge des Härters an der Gesamtmenge nicht definierend sein sollte. Bei den
Mischtests wurde noch keine Doppelspritze verwendet, und daher wurde eine definierte
Menge Härter von 0.8 ml verwendet.

Der bevorzugte Bereich des Volumenverhältnisses vom PU zum Härter beträgt 100:16-
15 100:19. Dies ist aber auch variabel und beeinflusst die Qualität des Kontrastmittels nicht
substantiell.

Bei den Optimierungstests wurde in der Kontrastlösung (bei Vernachlässigung des
optionalen Farbstoffs aufgrund dessen kleiner Menge) ein Volumenverhältnis vom
iodierten, veresterten Leinöl zum 2-Butanon von 54%/46% als optimal befunden
20 (Varianten 2, 5, 6). Aber auch Volumenverhältnisse vom iodierten, veresterten Leinöl zum
2-Butanon von 53%/47% (Variante 1) oder von 56%/44% (Variante 3) oder gar 58%/42%

(Variante 4) zeigen gute Resultate bei der Perfusion und anschliessend einen guten Kontrast bei der Bildgebung. Somit lassen sich bevorzugte Bereiche der Verhältnisse vom Volumen des iodierten, veresterten Öls zum Volumen des Ketons definieren, nämlich 0.75-4, vorzugsweise 1-1.5, insbesondere 1.1-1.3.

- 5 Das iodierte, veresterte Öl beeinflusst den Kontrast. Das Butanon dient als Verflüssigungsmittel. Für einen gewünschten höheren Kontrast wird der Mischung verhältnismässig mehr iodiertes, verestertes Öl beigemischt, für weniger Kontrast entsprechend weniger iodiertes, verestertes Öl. Bei einer verhältnismässig zu grossen Ölmenge kommt es zum Austreten von Öl aus der Lösung aufgrund von Übersättigung und
10 zu einer zu hohen Viskosität, was die Perfusion erschwert bzw. verhindert.

Da beim Entleeren der einzelnen Behälter und beim Mischen der Komponenten sowie beim Einspritzen des Kontrastmittels sowohl in den Behältern, als auch in den Mischröhrchen und den Spritzen jeweils ein Restvolumen an den Wänden bzw. am
15 Behälterboden verbleibt, wurden die Volumina der Komponenten in den Optimierungstests bei gleichbleibendem optimalen Verhältnis von iodiertem, veresterten Leinöl zu 2-Butanon (54%/46% von Variante 2) auf das Füllmaximum der Behälter optimiert (Varianten 5, 6). Die effektiven Füllmengen der Behälter sind somit natürlich vom jeweiligen Behältervolumen bzw. an die vom zu untersuchenden Objekt abhängige Füllmenge
20 anzupassen.

Varianten der Zusammensetzung des Kontrastmittels:

| Kontrastmittel-Kit (Variante 1: Minimum) | | | | |
|---|---|-------------------|--|---------------------------------------|
| Behälter Nr. | | Menge [ml] | Mengen der Kontrastlösungs-Komponenten [ml] | Volumenprozent [%] (vom Total) |
| 1 | Kontrastlösung: (iod. Leinöl, 2-Butanon, Farbstoff) | 4.70 | 2.50 2.20 1 Messerspitze | 24.39 21.46 vernachlässigbar |
| 2 | PU | 4.75 | | 46.34 |
| 3 | Härter | 0.80 | | 7.80 |
| Total | | 10.25 | | 100 |

| Kontrastmittel-Kit (Variante 2: Optimum) | | | | |
|---|---|-----------------------|---|---|
| Behälter Nr. | | Menge [ml] | Mengen der Kontrastlösungs- Komponenten [ml] | Volumenprozent [%] (vom Total) |
| 1 | Kontrastlösung: (iod. Leinöl, 2-Butanon, Farbstoff) | 4.80 | 2.60 2.20 1 Messerspitze | 25.12 21.26 vernachlässigbar |
| 2 | PU | 4.75 | | 45.89 |
| 3 | Härter | 0.80 | | 7.73 |
| Total | | 10.35 | | 100 |

| Kontrastmittel-Kit (Variante 3: Maximum) | | | | |
|---|---|-----------------------|---|---|
| Behälter Nr. | | Menge [ml] | Mengen der Kontrastlösungs- Komponenten [ml] | Volumenprozent [%] (vom Total) |
| 1 | Kontrastlösung: (iod. Leinöl, 2-Butanon, Farbstoff) | 5.00 | 2.80 2.20 1 Messerspitze | 26.54 20.85 vernachlässigbar |
| 2 | PU | 4.75 | | 45.02 |
| 3 | Härter | 0.80 | | 7.58 |
| Total | | 10.55 | | 100 |

| Kontrastmittel-Kit (Variante 4, mit angepasster Füllmenge, inkl. Verlustvolumen) | | | | |
|---|---|-----------------------|---|--|
| Behälter Nr. | | Menge [ml] | Mengen der Kontrastlösungs- Komponenten [ml] | Volumenprozent [%](vom Total) |
| 1 | Kontrastlösung: (iod. Leinöl, 2-Butanon, Farbstoff) | 6.3 | 3.65 2.65 1 Messerspitze | 27.65 20.08 vernachlässigbar |
| 2 | PU | 5.80 | | 43.94 |
| 3 | Härter | 1.10 | | 8.33 |
| Total | | 13.20 | | 100 |

| Kontrastmittel-Kit (Variante 5: Optimum mit angepasster Füllmenge) | | | | |
|---|---|-----------------------|---|--|
| Behälter Nr. | | Menge [ml] | Mengen der Kontrastlösungs- Komponenten [ml] | Volumenprozent [%](vom Total) |
| 1 | Kontrastlösung: (iod. Leinöl, 2-Butanon, Farbstoff) | 5.20 | 2.80 2.40 1 Messerspitze | 26.05 22.33 vernachlässigbar |
| 2 | PU | 4.75 | | 44.19 |
| 3 | Härter | 0.80 | | 7.44 |
| Total | | 10.75 | | 100 |

5

10

15

| Kontrastmittel-Kit (Variante 6: Optimum mit angepasster Füllmenge, inkl. Verlustvolumen) | | | | |
|---|---|-----------------------|---|---|
| Behälter Nr. | | Menge [ml] | Mengen der Kontrastlösungs- Komponenten [ml] | Volumenprozent [%] (vom Total) |
| 1 | Kontrastlösung: (iod. Leinöl, 2-Butanon, Farbstoff) | 6.30 | 3.40 2.90 1 Messerspitze | 25.76 21.97 vernachlässigbar |
| 2 | PU | 5.80 | | 43.94 |
| 3 | Härter | 1.10 | | 8.33 |
| Total | | 13.20 | | 100 |

Viskositäten:

5

| Komponente | Viskosität ([mPa s/ 20°C] |
|-------------------------------|----------------------------------|
| Iodiertes, verestertes Leinöl | 85 |
| 2-Butanon | 0.4 |
| PU | 6500 |
| Härter | 290 |

Die Viskosität der zweiten Mischung, d.h. der Kombination aus Kontrastlösung und PU (bzw. des Kontrastmittels noch ohne Härter) beträgt ca. 100 mPas.s bei 20°C.

10

15

20

25

REFERENZEN

- Zagorchev, L. et al., Micro computed tomography for vascular exploration, *Journal of Angiogenesis Research* 2010, 2:7
- 5 - Meyer, E. et al., Polyurethane Elastomer: A New Material for the Visualization of Cadaveric Blood Vessels, *Clinical Anatomy* 20:000-000 (2007) (Wiley Interscience)
- Krucker et al., New Polyurethane-Based Material for Vascular Corrosion Casting with Improved Physical and Imaging Characteristics. *Res. Tech.* 69: 138-147
- 10 (2006)
- Meyer, E. et al., Altered morphology and 3D architecture of brain vasculature in a mouse model for Alzheimer's disease, *PNAS*, 105; 9; 3587-3592 (2008)
- Grabherr et al., Angiofil®-mediated Visualization of the Vascular System by Microcomputed Tomography: A Feasibility Study, *Microscopy Research and*
- 15 *Technique* 71(7): 551-556, 2008.
- Shokiche, C.C., Baumann P., Hlushchuk R., Djonov V., Reyes M. (2016) High-Throughput Glomeruli Analysis of μ -CT Kidney Images Using Tree Priors and Scalable Sparse Computation. In: Ourselin S., Joskowicz L., Sabuncu M., Unal G., Wells W. (eds) *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention – MICCAI 2016*.
- 20 - Perrien, D.S. et al., Novel methods for microCT-based analyses of vasculature in the renal cortex reveal a loss of perfusable arterioles and glomeruli in eNOS-/- mice, *BMC. Nephrol.* 17, 24 (2016).
- Schaad, L., et al., Correlative Imaging of the Murine Hind Limb Vasculature and
- 25 *Muscle Tissue by MicroCT and Light Microscopy*, *Scientific Reports*, 7:41842 (2017), doi: 10.1038/srep4184

PATENTANSPRÜCHE

- 5 1. Kontrastmittel für *ex vivo* Mikroangiografie, vorzugsweise zur digitalen
Bildgebung eines Gefäßsystems einer Maus oder einer Ratte oder anderer
Labortiere, oder einzelner tierischer und menschlicher Organe, mittels eines
Mikro-CT-Geräts, aufweisend
- ein Polyurethan, und
 - einen Härter,
- 10 dadurch gekennzeichnet, dass das Kontrastmittel zudem
- iodiertes, verestertes Öl, und
 - ein Keton
- enthält.
- 15 2. Kontrastmittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das iodierte,
veresterte Öl ein iodiertes, verestertes Mohnsamenöl, oder ein iodiertes, verestertes
Leinsamenöl ist, wobei das iodierte, veresterte Leinsamenöl vorzugsweise Ethyl-9,
12, 15-triiodo-octadecatrienoat ist.
- 20 3. Kontrastmittel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch
gekennzeichnet, dass das Keton ausgewählt ist aus 2-Butanon, Aceton oder 3-
Pentanon, wobei das Keton vorzugsweise 2-Butanon ist.
- 25 4. Kontrastmittel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch
gekennzeichnet, dass das Kontrastmittel einen Farbstoff enthält, wobei der
Farbstoff vorzugsweise ein blauer Farbstoff ist.
- 30 5. Kontrastmittel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch
gekennzeichnet, dass das Polyurethan ein Polyisocyanat-Präpolymer ist,
vorzugsweise ein aliphatisches Isocyanat, insbesondere bevorzugt 4,4'-
Methylendi(cyclohexyl-isocyanat).
6. Kontrastmittel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch

gekennzeichnet, dass der Härter ein modifiziertes aromatisches Diamin ist, wobei der Härter vorzugsweise ein Diethylmethylbenzoldiamin ist, insbesondere bevorzugt eine Mischung von zwei Isomeren von Diethylmethylbenzoldiamin ist, am meisten bevorzugt ein Isomerengemisch von 2,6-Diamino-3,5-diethyltoluol und
5 2,4-Diamino-3,6-diethyltoluol im Verhältnis 7:3.

7. Kontrastmittel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass

- das iodierte, veresterte Öl zu 20-60%, vorzugsweise zu 22-45%,
10 insbesondere bevorzugt zu 24-30% im Kontrastmittel enthalten ist; und
- das Keton zu 7-30%, vorzugsweise zu 10-25%, insbesondere bevorzugt zu 14-22% im Kontrastmittel enthalten ist.

8. Kontrastmittel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch
15 gekennzeichnet, dass in einer Kontrastlösung, welche das iodierte, veresterte Öl und das Keton aufweist, das Verhältnis vom Volumen des iodierten, veresterten Öls zum Volumen des Ketons 0.75-4 beträgt, vorzugsweise 1-1.5, insbesondere 1.1-1.3 beträgt.

20 9. Kontrastmittel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Polyurethan zu 25-60%, vorzugsweise zu 35-55%, insbesondere bevorzugt zu 38-50%, und am meisten bevorzugt zu 43-47% im Kontrastmittel enthalten ist; und

- der Härter zu 4-10%, vorzugsweise zu 5-9%, insbesondere bevorzugt zu 6-
25 8% im Kontrastmittel enthalten ist,
- wobei vorzugsweise das Volumen-Verhältnis vom Polyurethan zum Härter im Bereich von 100:10-100:25 liegt, insbesondere bevorzugt im Bereich von 100:16-100:19.

30 10. Kit-of-Parts für ex vivo Mikroangiografie, aufweisend:

- einen ersten Behälter, der ein iodiertes, verestertes Öl, vorzugsweise ein iodiertes, verestertes Leinsamenöl, insbesondere bevorzugt Ethyl-9, 12, 15-triiodo-octadecatrienoat, enthält, und ein Keton, vorzugsweise 2-

Butanon enthält;

- einen zweiten Behälter, der ein Polyurethan, vorzugsweise ein Polyisocyanat-Präpolymer, insbesondere bevorzugt 4,4'-Methylendi(cyclohexyl-isocyanat) enthält; und
- 5 - einen dritten Behälter, der einen Härter, vorzugsweise ein modifiziertes aromatisches Diamin, insbesondere bevorzugt 2,6-diamino-3,5-diethyltoluen enthält.

10 11. Kit-of-Parts gemäss Anspruch 10, wobei der erste Behälter zusätzlich einen Farbstoff, vorzugsweise einen blauen Farbstoff, enthält.

12. Kit-of-Parts gemäss einem der Ansprüche 10-11, wobei

- 15 - der erste Behälter eine erste Mischung aus 2-4 ml, vorzugsweise 2.5-2.8 ml des iodierten, veresterten Öls und 2-3 ml, vorzugsweise 2.2-2.9 ml des Ketons enthält; und wobei
- der zweite Behälter 4-7 ml, vorzugsweise 4.5-5 ml des Polyurethans enthält; und wobei
- der dritte Behälter 0.5-1.5 ml, vorzugsweise 0.8-1.2 ml des Härters enthält.

20 13. Kit-of-Parts gemäss einem der Ansprüche 10-12, des Weiteren aufweisend

- eine erste Spritze zur Aufnahme des Inhalts des ersten Behälters und des zweiten Behälters, vorzugsweise eine Spritze mit 12 ml Volumen;
- eine zweite Spritze zur Aufnahme des Inhalts des dritten Behälters, vorzugsweise eine Spritze mit 1 ml Volumen;
- 25 - einen Mischbehälter zur Vermengung des Inhalts der ersten Spritze und der zweiten Spritze;
- vorzugsweise einen Dispenser zur Steuerung der ersten Spritze und der zweiten Spritze, wobei der Dispenser eine Vorrichtung zur Aufnahme eines jeweils ersten Endes der ersten und der zweiten Spritze aufweist;
- 30 - und vorzugsweise ein Adapterelement zur Aufnahme eines jeweils zweiten Endes der ersten und der zweiten Spritze und zur Aufnahme eines ersten Endes des Mischbehälters.

14. Verfahren zur Herstellung eines Kontrastmittels für *ex vivo* Mikroangiografie gemäss einem der Ansprüche 1-9, zur digitalen Bildgebung eines Gefässsystems einer Maus oder einer Ratte mittels eines Micro-CT-Geräts, aufweisend die folgenden Schritte:

- 5 f) Bereitstellung einer ersten Mischung von iodiertem, veresterten Öl mit einem Keton in einem ersten Behälter;
- g) Bereitstellung eines Polyurethans in einem zweiten Behälter;
- h) Bereitstellung eines Härters in einem dritten Behälter;
- 10 i) Vermengung und Mischen des Inhalts des ersten Behälters mit dem Inhalt des zweiten Behälters zu einer zweiten Mischung;
- j) Vermengung des Inhalts des dritten Behälters mit der zweiten Mischung von Schritt i) in einem Mischelement unmittelbar vor der Einspritzung in das zu untersuchende Gefässsystem; wobei vorzugsweise ein Volumen-Mischverhältnis von 100:16 bis 100:19 des Polyurethans zum Härter
- 15 verwendet wird.

15. Verfahren für *ex vivo* Mikroangiografie zur digitalen Bildgebung eines Gefässsystems eines tierischen oder menschlichen Körpers oder Organs, insbesondere einer Maus oder einer Ratte, mittels eines micro-CT-Geräts, aufweisend die folgenden Schritte:

- 20 k) Bereitstellung eines Kontrastmittels gemäss einem der vorhergehenden Ansprüche 1-9, vorzugsweise nach einem Verfahren gemäss Anspruch 14;
- l) Kanülierung und Ausspülung des zu untersuchenden Tierkörpers, vorzugsweise mit einer Klarlösung, insbesondere mit PBS, wobei
- 25 vorzugsweise für eine Maus eine Spülmenge von 20-100 ml, und vorzugsweise alternativ für eine Ratte eine Spülmenge von 20-200 ml verwendet wird;
- m) Injektion des Kontrastmittels in den Körper bzw. in das Organ, vorzugsweise mit gleichmässiger Flussrate, wobei die Flussrate
- 30 vorzugsweise maximal 3 ml/min, insbesondere bevorzugt maximal 1.5 ml/min beträgt.

16. Verfahren für *ex vivo* Mikroangiografie nach Anspruch 15, dadurch

gekennzeichnet, dass nach der Injektion des Kontrastmittels eine Aushärtung des Kontrastmittels im Tierkörper abgewartet wird, und anschliessend der Tierkörper mittels eines Micro-CT-Geräts gescannt wird.

5 17. Verfahren für ex vivo Mikroangiografie gemäss Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Injektion in Schritt m) manuell, vorzugsweise mittels eines Dispensers erfolgt, oder dass die Injektion in Schritt m) mittels einer Injektionspumpe erfolgt.

10 18. Verwendung eines Kontrastmittels gemäss einem der Ansprüche 1-9 oder eines Kit of Parts gemäss einem der Ansprüche 10-13 für die postmortale Mikroangiografie, dadurch gekennzeichnet, dass das Kontrastmittel in einen menschlichen oder tierischen Körper oder in ein menschliches oder tierisches
15 Organ eingespritzt wird.

15

20

25

30

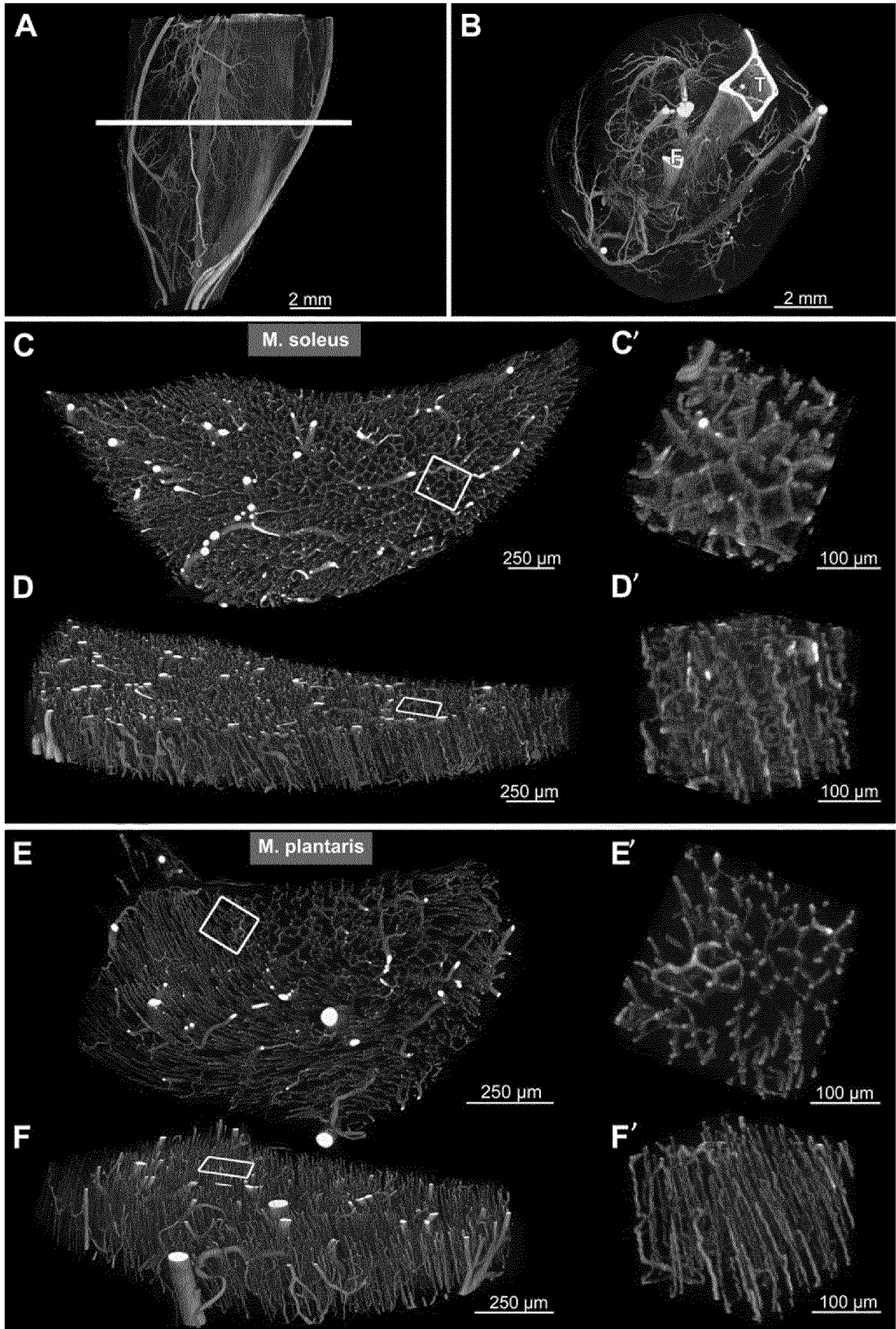


FIG. 1

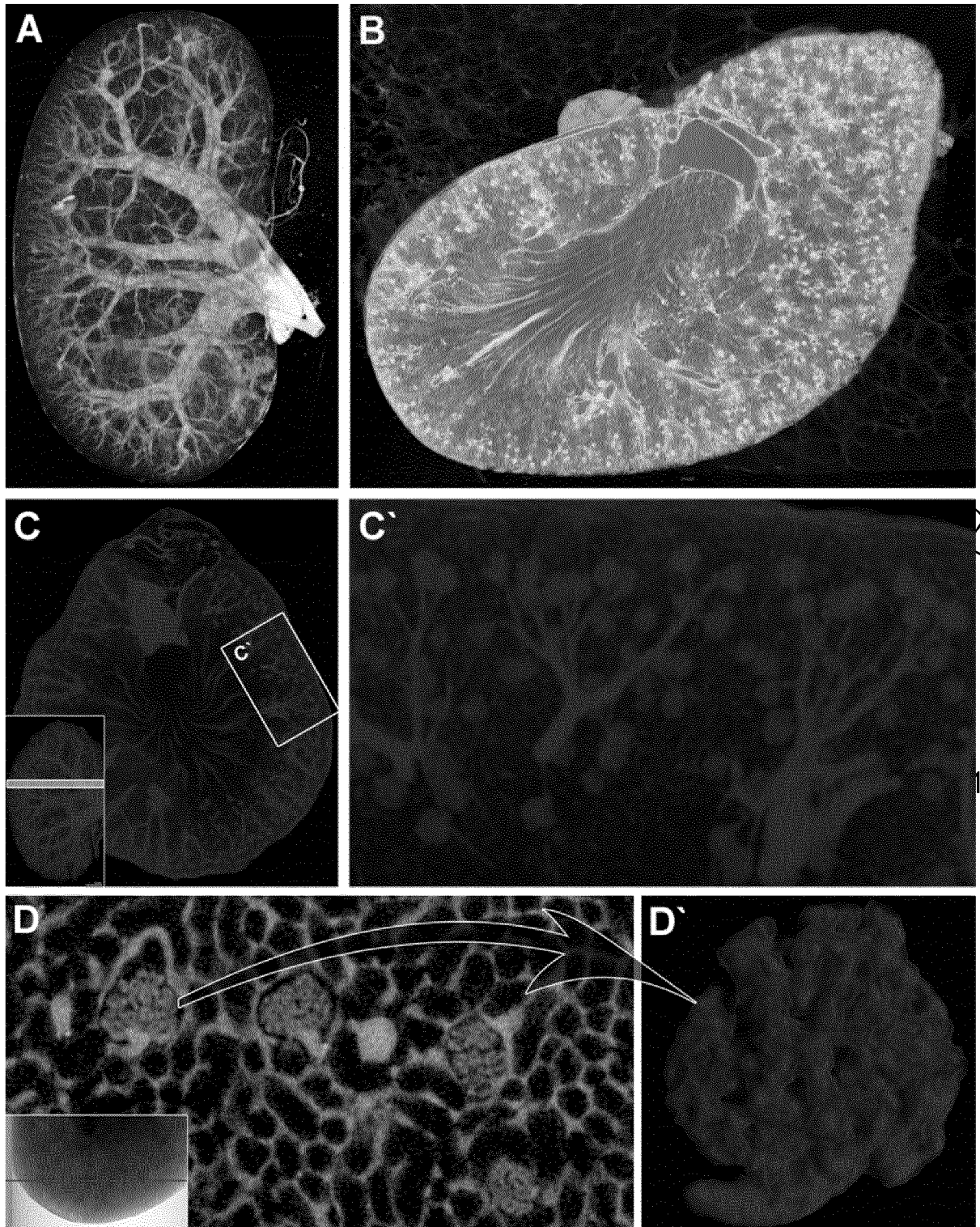


FIG. 2

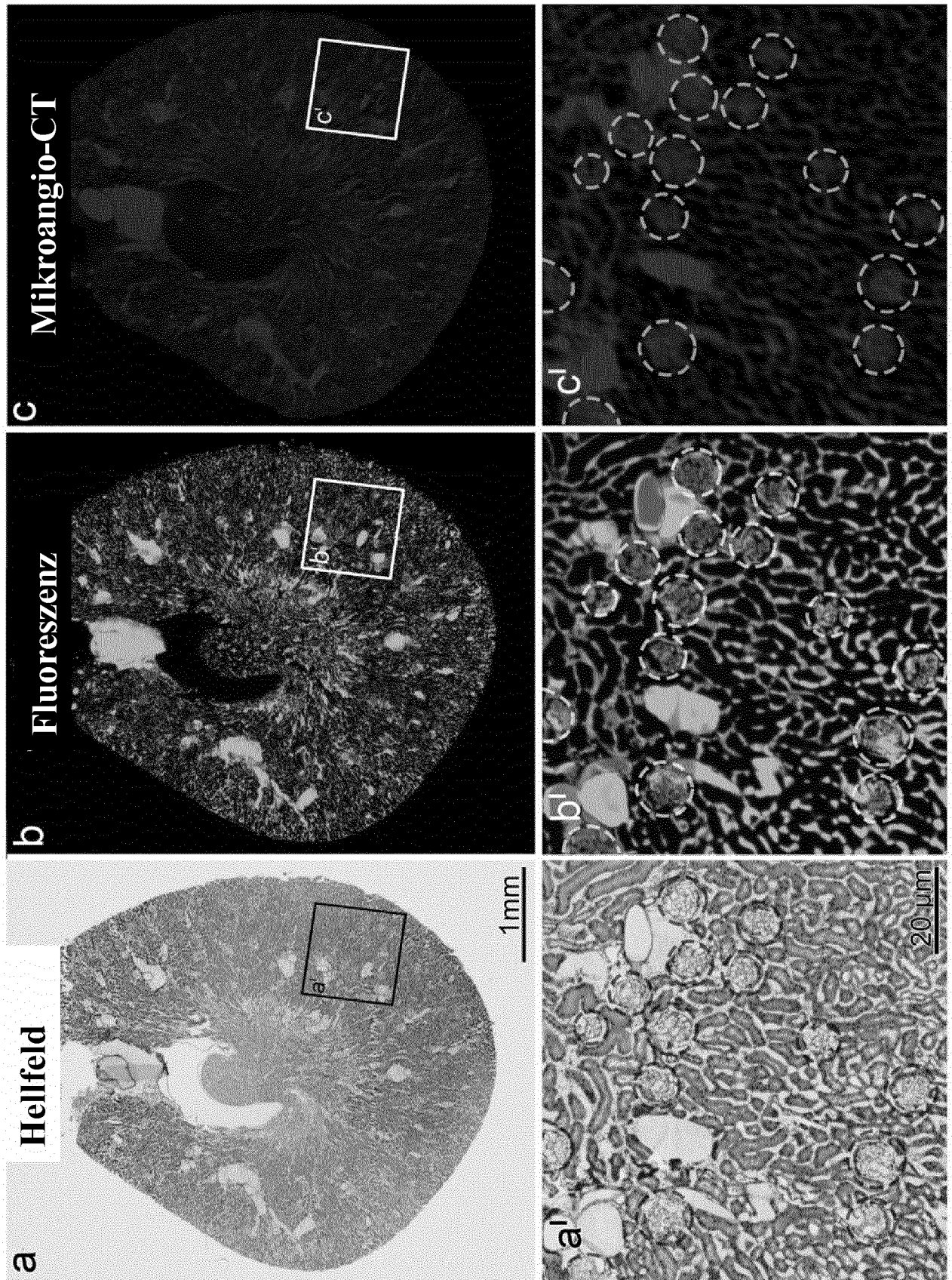


FIG. 3

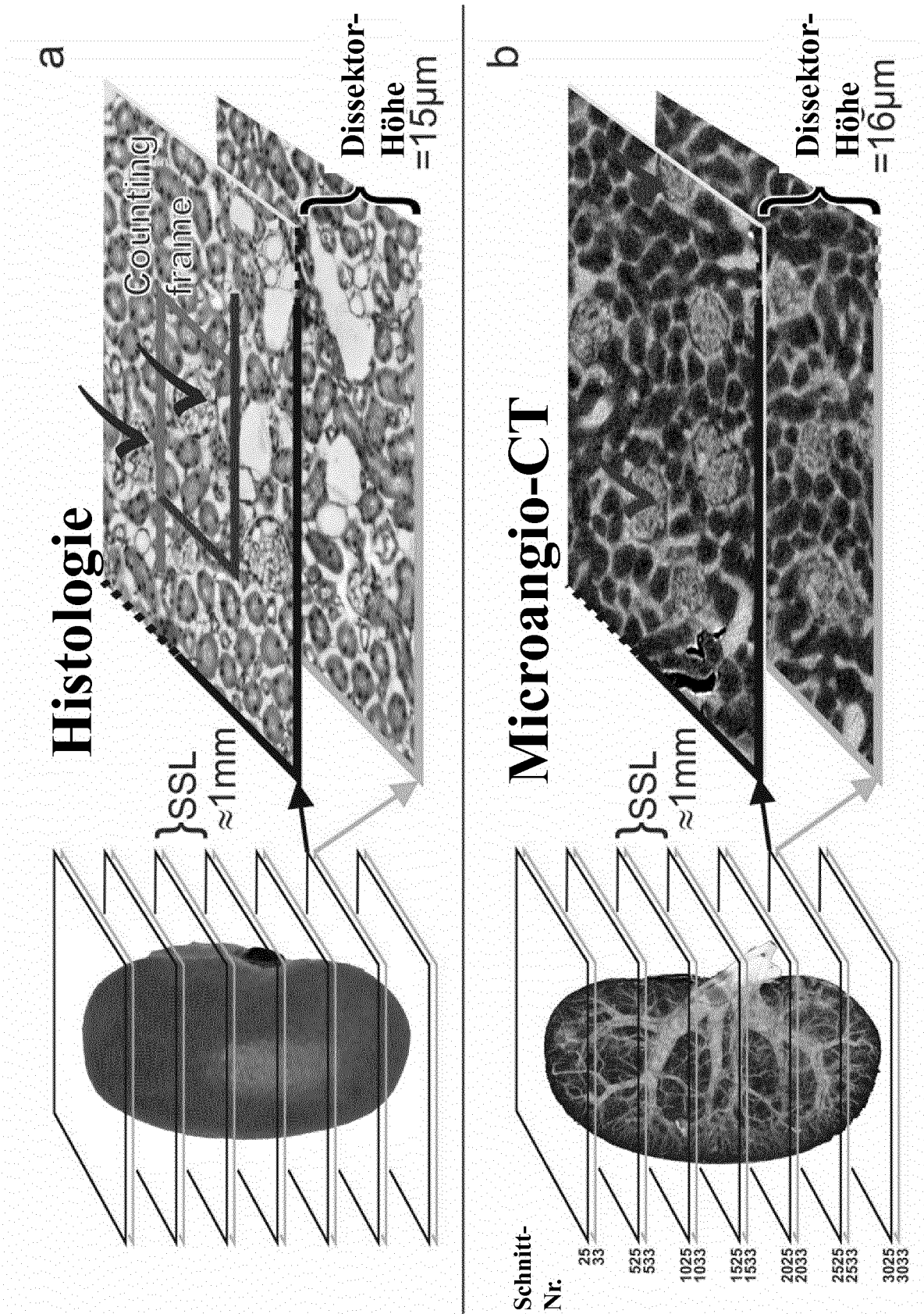


FIG. 4

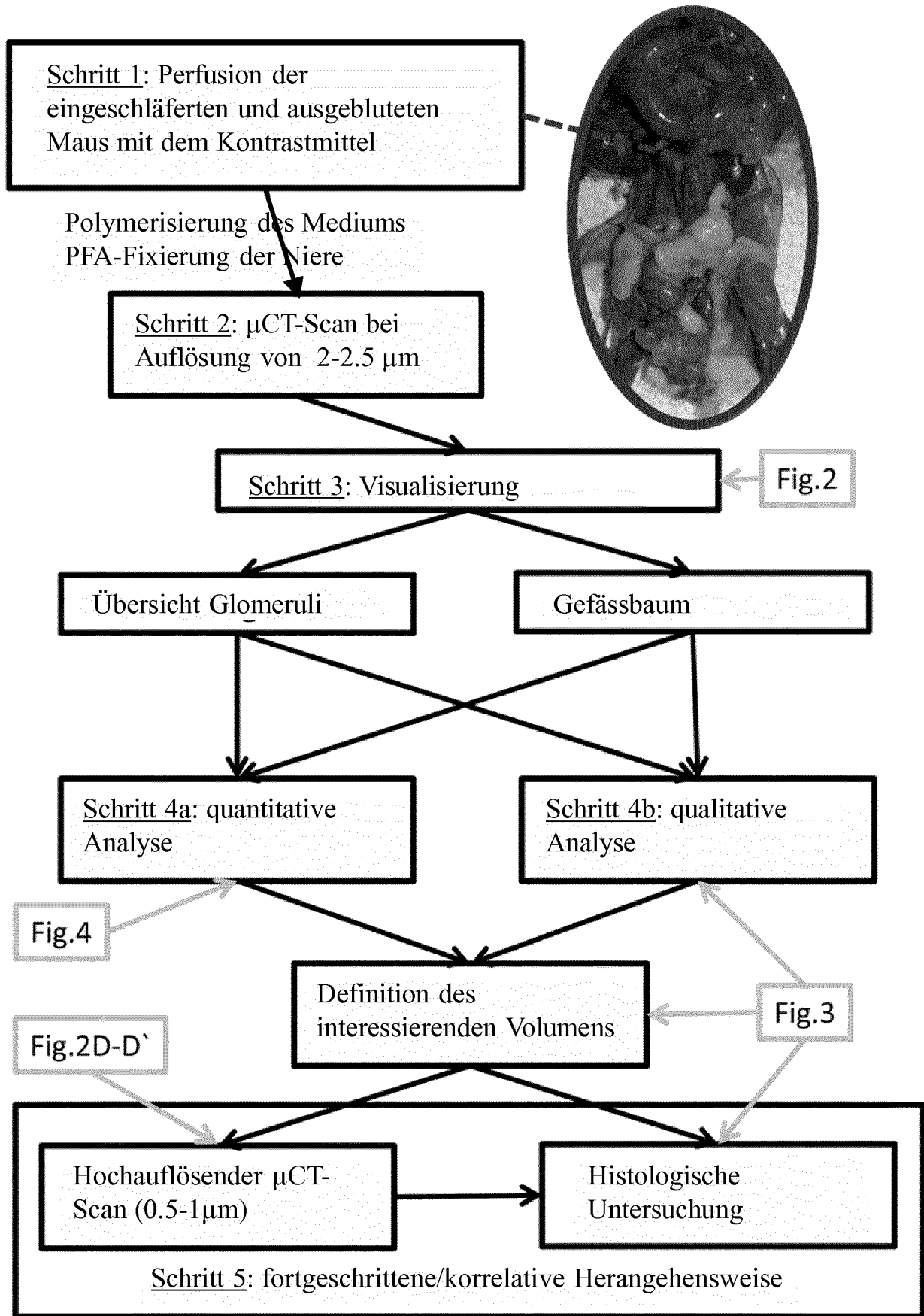


FIG. 5

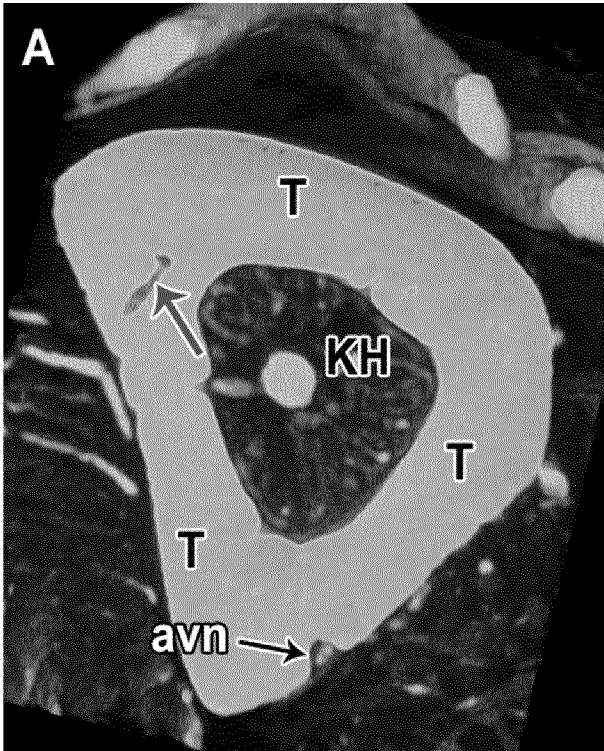


FIG. 6a

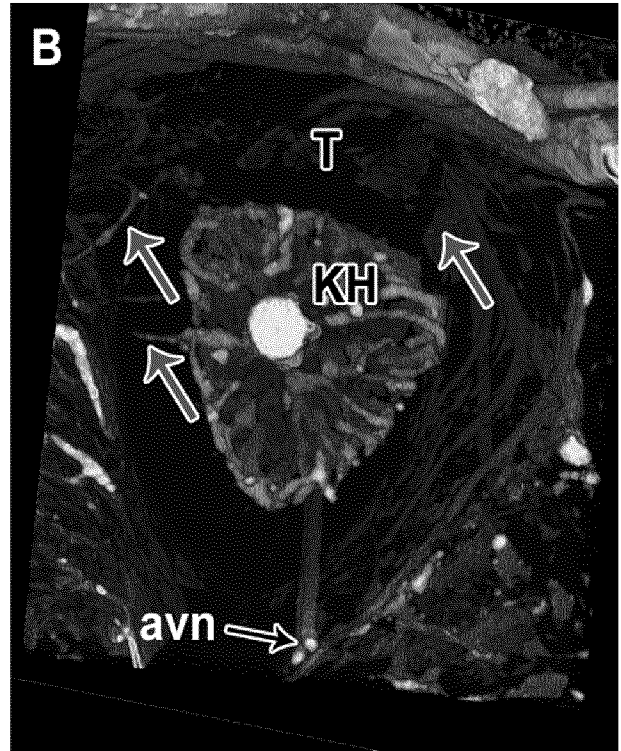


FIG. 6b

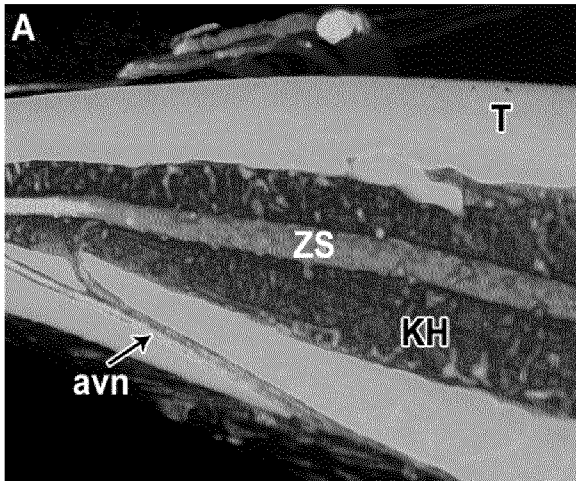


FIG. 7a

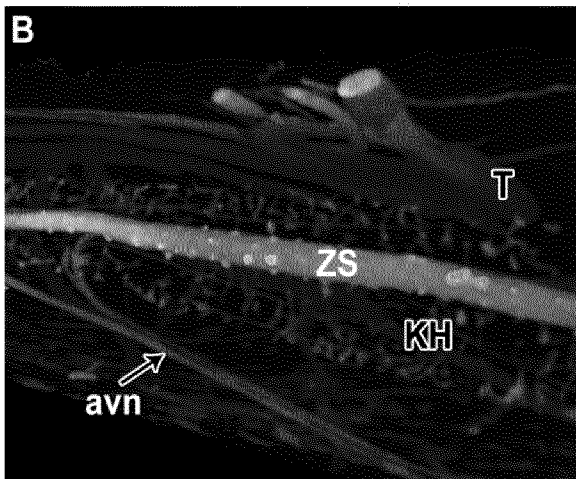


FIG. 7b

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2018/055463

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K9/00 A61K49/04
ADD.
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)
A61K
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 practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | WO 2008/034270 A2 (FORIM X AG [CH]; GRABHERR SILKE [CH]) 27 March 2008 (2008-03-27) abstract; claims 1,7 page 17, last paragraph - page 18, paragraph 1 | 1-18 |
| A | WO 2009/081169 A2 (IOPHARMA TECHNOLOGIES AB [SE]; WANG JIAN SHENG [SE]; KIDD SARA [GB]; A) 2 July 2009 (2009-07-02) claims 1,3,9,15 page 19, paragraph 2 | 1-18 |
| | ----- -/-- | |

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

| | |
|---|---|
| <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> | <p>"T" 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</p> <p>"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</p> <p>"Y" 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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> |
|---|---|

| | |
|--|--|
| Date of the actual completion of the international search 16 March 2018 | Date of mailing of the international search report 26/03/2018 |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016 | Authorized officer Gundlach, Björn |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2018/055463

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | ZAGORCHEV LYUBOMIR ET AL: "Micro computed tomography for vascular exploration", JOURNAL OF ANGIOGENESIS RESEARCH, BIOMED CENTRAL LTD, vol. 2, no. 1, 5 March 2010 (2010-03-05), page 7, XP021070689, ISSN: 2040-2384 abstract ----- | 1-18 |
| A | GRABHERR S ET AL: "POSTMORTEM ANGIOGRAPHY: REVIEW OF FORMER AND CURRENT METHODS", AMERICAN JOURNAL OF ROENTGENO, AMERICAN ROENTGEN RAY SOCIETY, US, vol. 188, no. 3, 1 March 2007 (2007-03-01), pages 832-838, XP008078071, ISSN: 0361-803X, DOI: 10.2214/AJR.06.0787 page 833, paragraph 2 - page 834, column 1, paragraph 1; table 1 ----- | 1-18 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2018/055463

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|-----------------------------|
| WO 2008034270 | A2 | 27-03-2008 | DK 2063916 T3 23-02-2015 |
| | | | EP 2063916 A2 03-06-2009 |
| | | | EP 2526973 A2 28-11-2012 |
| | | | ES 2530718 T3 04-03-2015 |
| | | | ES 2640456 T3 03-11-2017 |
| | | | PT 2063916 E 25-02-2015 |
| | | | US 2010021389 A1 28-01-2010 |
| | | | US 2013045168 A1 21-02-2013 |
| | | | WO 2008034270 A2 27-03-2008 |
| | | | ----- |
| WO 2009081169 | A2 | 02-07-2009 | CN 101945672 A 12-01-2011 |
| | | | EP 2237800 A2 13-10-2010 |
| | | | US 2011052503 A1 03-03-2011 |
| | | | WO 2009081169 A2 02-07-2009 |
| ----- | | | |

| A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. A61K9/00 A61K49/04 ADD. | | |
|---|---|--------------------|
| Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC | | |
| B. RECHERCHIERTE GEBIETE | | |
| Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) A61K | | |
| Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen | | |
| Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data | | |
| C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| A | WO 2008/034270 A2 (FORIM X AG [CH]; GRABHERR SILKE [CH]) 27. März 2008 (2008-03-27) Zusammenfassung; Ansprüche 1,7 Seite 17, letzter Absatz - Seite 18, Absatz 1 | 1-18 |
| A | WO 2009/081169 A2 (IOPHARMA TECHNOLOGIES AB [SE]; WANG JIAN SHENG [SE]; KIDD SARA [GB]; A) 2. Juli 2009 (2009-07-02) Ansprüche 1,3,9,15 Seite 19, Absatz 2 | 1-18 |
| | ----- -/-- | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie | | |
| * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist | | |
| Datum des Abschlusses der internationalen Recherche | Absendedatum des internationalen Recherchenberichts | |
| 16. März 2018 | 26/03/2018 | |
| Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016 | Bevollmächtigter Bediensteter Gundlach, Björn | |

| C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|---|---|--------------------|
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| A | ZAGORCHEV LYUBOMIR ET AL: "Micro computed tomography for vascular exploration", JOURNAL OF ANGIOGENESIS RESEARCH, BIOMED CENTRAL LTD, Bd. 2, Nr. 1, 5. März 2010 (2010-03-05), Seite 7, XP021070689, ISSN: 2040-2384 Zusammenfassung ----- | 1-18 |
| A | GRABHERR S ET AL: "POSTMORTEM ANGIOGRAPHY: REVIEW OF FORMER AND CURRENT METHODS", AMERICAN JOURNAL OF ROENTGENO, AMERICAN ROENTGEN RAY SOCIETY, US, Bd. 188, Nr. 3, 1. März 2007 (2007-03-01), Seiten 832-838, XP008078071, ISSN: 0361-803X, DOI: 10.2214/AJR.06.0787 Seite 833, Absatz 2 - Seite 834, Spalte 1, Absatz 1; Tabelle 1 ----- | 1-18 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2018/055463

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| WO 2008034270 A2 | 27-03-2008 | DK 2063916 T3 | 23-02-2015 |
| | | EP 2063916 A2 | 03-06-2009 |
| | | EP 2526973 A2 | 28-11-2012 |
| | | ES 2530718 T3 | 04-03-2015 |
| | | ES 2640456 T3 | 03-11-2017 |
| | | PT 2063916 E | 25-02-2015 |
| | | US 2010021389 A1 | 28-01-2010 |
| | | US 2013045168 A1 | 21-02-2013 |
| | | WO 2008034270 A2 | 27-03-2008 |
| ----- | | | |
| WO 2009081169 A2 | 02-07-2009 | CN 101945672 A | 12-01-2011 |
| | | EP 2237800 A2 | 13-10-2010 |
| | | US 2011052503 A1 | 03-03-2011 |
| | | WO 2009081169 A2 | 02-07-2009 |
| ----- | | | |