

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

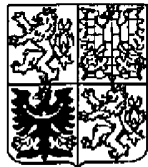
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

1409-99

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **21. 10. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **21.10.96, 23.04.97**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/9621884, 97/9708239**

(33) Země priority: **GB, GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15. 09. 99**
(Věstník č. 9/99)

(86) PCT číslo: **PCT/GB97/02898**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 98/17324**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

A 61 K 49/00

(71) Přihlášovatel:

NYCOMED IMAGING AS, Oslo, NO;

(72) Původce:

Ostensen Jonny, Oslo, NO;

Eriksen Morten, Oslo, NO;

Frigstad Sigmund, Trondheim, NO;

Rongved Pal, Oslo, NO;

(74) Zástupce:

**Korejzová Zdenka JUDr., Spálená 29, Praha
1, 11000;**

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Směsný prostředek pro použití jako
kontrastní činidlo**

(57) Anotace:

Směsný prostředek se složkami, vhodnými pro současné, oddělené nebo následné použití jako kontrastní činidlo při zobrazování ultrazvukem. Prostředek je tvořen 1/ injekčním vodným prostředím, v němž je dispergován plyn a 11/ prostředkem, obsahujícím složku, schopnou difuze in vivo do dispergovaného plynu za alespoň přechodného zvětšení jeho objemu.

CZ 1409-99 A3

Směsný prostředek pro použití jako kontrastní činidlo

Oblast techniky

Vynález se týká směsného prostředku pro použití jako kontrastní činidlo při zobrazování ultrazvukem, zejména při perfusi tkání.

Dosavadní stav techniky

Je dobře známo, že kontrastní činidla, tvořená disperzí mikrobublinek plynu jsou zvláště účinné, pokud jde o zobrazování ultrazvukem vzhledem k malé hustotě a snadné stlačitelnosti mikrobublinek. Takové disperze mikrobublinek při příslušné stabilizaci mohou umožnit velmi kvalitní zobrazení pomocí ultrazvuku, například v případě cévního systému, a to obvykle při nízkých dávkách.

Použití ultrazvukového zobrazení při měření prokrvení tkání, to znamená průtoku krve na jednotku hmoty tkáně je cenné například při detekci nádorů vzhledem k tomu, že nádorová tkáň má typicky cévní zásobení odlišné od zdravých tkání a také při sledování srdečního svalu, například pro zjištění infarktu. Problémem, spojeným s použitím známých kontrastních látek pro sledování prokrvené srdečního svalu je skutečnost, že informace, získaná obsahem obrazu je degradována snížením kontrastu, způsobeným přítomností kontrastního činidla v srdečních komorách.

Vynález je založen na zjištění, že při zobrazování ultrazvukem, zejména v případě srdečního svalu a dalších tkání je možno dosáhnout podstatného zlepšení při použití kontrastních prostředků s obsahem plynu, které vyvolávají zvětšení

obsahu tohoto plynu po určitou dobu po podání in vivo. Je například možno použít takové kontrastní prostředky k vyvolání kontrolovatelné a dočasné retence plynné fáze například ve formě mikrobublínek v malých cévách tkání a tím zvýšit koncentraci plynu v takové tkáni a současně zvýšit kontrast této tkáně.

Je zřejmé, že takové použití plynu ve formě dočasně uloženého prostředku pro zjištění prokrvení se význačně liší od existujících návrhů, podle nichž se nitrožilně podává kontrastní látka pro zobrazování ultrazvukem ve formě mikrobublínek. V těchto případech se považuje za nutné vyvarovat se zvětšování bublínek vzhledem k tomu, že v případě, že tento růst není řízen, může potenciálně vést k embolizaci tkání. Může pak být nezbytné omezit podávanou dávku a/nebo použít plynné směsi s takovým složením, aby nebezpečí zvětšování bublínek in vivo bylo co nejmenší inhibicí difuze krevních plynů do mikrobublínek, tak jak bylo popsáno například v mezinárodních přihláškách WO 95/03835 a WO 95/16467.

Vynález navrhuje prostředek, tvořený dispergovanou plynnou fází, podávaný současně s prostředkem, obsahujícím nejméně jednu látku, která obsahuje nebo je schopná vytvořit in vivo plyn nebo páru s dostatečným tlakem pro vyvolávání řízeného růstu dispergované plynné fáze difuzí molekul plynu nebo páry z uvedeného prostředku do této fáze, tato fáze bude dále pro jednoduchost označována jako "složka, schopná difuze", přestože je zřejmé, že je možno využít i jiný transportní mechanismus, jak bude dále podrobněji uvedeno.

Toto společné podávání prostředku s obsahem dispergované fáze a prostředku, obsahujícího složku, schopnou difuze s příslušným stupněm těkavosti může kontrastovat s dříve uvažovanými návrhy pro podávání těkavých látek jako takových,

například ve formě koloidů s posunem fáze, tak jak byly popsány v mezinárodní přihlášce WO 94/16739. Vynález si klade za úkol navrhnout možnost řízení některých faktorů, jako jsou pravděpodobnost a/nebo rychlost růstu dispergované fáze zvolením příslušných složek současně podávaného prostředku, jak bude dále podrobněji uvedeno, kdežto při podávání koloidů s posunem fáze jako takových, může dojít ke vzniku mikrobublinek s neřízeným a nerovnoměrným růstem, někdy v takovém rozsahu, že alespoň část mikrobublinek může představovat potenciální nebezpečí embolizace například v srdečním svalu nebo mozku, jak je popsáno v publikaci Schwarz, *Advances in Echo-Contrast*, 1994 (3), 48 až 49.

Bylo rovněž zjištěno, že podávání koloidů s posunem fáze jako takových nemusí vést in vivo k vytvoření dispergované fáze mikrobublinek s obsahem plynu nebo par, jak je popsáno v publikaci Grayburn a další, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 26 (5), 1955, 1340 až 1347. V této publikaci se také uvádí, že může být nezbytná předběžná aktivace emulzí perfluorpentanu k dosažení kontrastnosti srdečního svalu u psů při nízkých dávkách, při nichž ještě nedochází k hemodynamickým vedlejším účinkům. Aktivační postup pro takové kolodinné disperze včetně použití podtlaku je popsán v mezinárodní přihlášce WO 96/40282. Postupuje se tak, že se injekční stříkačka částečně naplní emulzí a pak se opakovaně stlačí a uvolní píst stříkačky k vyvolání tlakových změn, které vedou k vytvoření mikrobublinek plynu v emulzi. Jde však o postup, který nemusí vést k reprodukovatelné aktivaci.

V US 5 536 489 se uvádí, že je možno použít emulze ve vodě nerozpustných chemických látek, vytvářejících plyn, například perfluorpentan jako kontrastní látky pro zobrazení specifických částí organismu, přičemž emulze vytváří mikrobublínky plynu, zvyšujících kontrast obrazu až při působení ultrazvuku na specifické zobrazované místo v organismu. Dalšími

výzkumy však bylo prokázáno, že emulze těkavých sloučenin, například 2-methylbutanu nebo perfluorpentanu neposkytvaly prokazatelné zvýšení kontrastu obrazu při zobrazování ultrazvukem in vivo ani in vitro při použití energetické úrovně, která je dostatečná pro získání kontrastního obrazu v případě použití směsného prostředku podle vynálezu.

Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tvoří směsný prostředek se složkami, vhodnými pro současné, oddělené nebo následné použití jako kontrastní činidlo při zobrazování ultrazvukem, prostředek je tvořen

- i) injekčním vodným prostředím, v němž je dispergován plyn,
- ii) prostředkem, obsahující složku, schopnou difuze in vivo do dispergovaného plynu za alespoň přechodného zvětšení jeho objemu.

Prostředek je možno použít k získání kontrastnějších obrazů lidského nebo živočišného organismu. Postupuje se tak, že se

- i) do cévního systému injekčně podá fyziologicky přijatelné vodné prostředí s obsahem dispergovaného plynu,
- ii) před injekcí, v jejím průběhu nebo po ní se podá prostředek, obsahující složku, schopnou difuze in vivo do uvedeného dispergovaného plynu za alespoň přechodného zvětšení jeho objemu a
- iii) vytvoří se obraz alespoň části organismu při použití ultrazvuku.

Uvedeným způsobem je možno zjistit prokrvení tkání, přičemž vzestupu objemu dispergovaného plynu se užije k

obohacení nebo dočasné retence plynu v malých cévách těchto tkání, čímž současně dojde ke zvýšení echogenity.

V disperzi plynu může být použit jakýkoliv biologicky kompatibilní plyn, pod pojmem "plyn" se tedy rozumí jakákoliv látka včetně směsí látek, nacházejících se alespoň částečně, to znamená z části nebo úplně v plynné formě včetně par při normální teplotě lidského organismu 37 °C. Plyn může tedy například obsahovat vzduch, dusík, kyslík, oxid uhličitý, vodík, inertní plyn, jako helium, argon, xenon nebo krypton, fluoridy síry, jako hexafluorid nebo dekafluorid nebo pentafluorid trifluormethylsíry, fluorid selenový a popřípadě halogenované silany, jako methylsilan nebo dimethylsilan, uhlovodíky s nízkou molekulovou hmotností, například až do 7 atomů uhlíku, například alkany, jako methan, ethan, propan, butan nebo pentan, cykloalkany, jako cyklopropan, cyklobutan, nebo cyklopentan, alkeny, jako ethylen, propen, propadien nebo buten nebo alkiny, jako acetylen nebo propin, ethery, jako dimethylether, ketony, estery, halogenované uhlovodíky s nízkou molekulovou hmotností například až do 7 atomů uhlíku nebo směsi kterýchkoliv z uvedených složek. S výhodou se v případě halogenovaných plynů užije jako atomů halogenu alespoň z části atomu fluoru. Tyto biokompatibilní uhlovodíky je možno volit například ze skupiny bromchlordifluormethan, chlordisfluormethan, dichlordifluormethan, bromtrifluormethan, chlortrifluormethan, chlorpentafluorethan, dichlortetrafluorethan, chlortrifluorethylen, fluorethylen, ethylfluorid, 1,1-difluorethan a perfluorované uhlovodíky. Z perfluorovaných uhlovodíků je možno uvést například perfluoralkany, jako perfluormethan, perfluorethan, perfluorpropany, perfluorbutany, jako perfluor-n-butan, popřípadě ve směsi s dalšími isomery, například s perfluorisobutanem, perfluor-pentany, perfluorhexany nebo perfluorheptany, perfluoralkeny, jako perfluorpropen, perfluorbuteny, jako perfluorbut-2-en, perfluorbutadien, perfluorpenteny, jako perfluorpent-

-1-en nebo perfluor-4-methylpent-2-en, perfluoralkiny, jako perfluorbut-2-in a perfluorcykloalkany, jako perfluorcyklobutan, perfluormethylcyklobutan, perfluordimethylcyklobutany, perfluortrimethylcyklobutany, perfluorcyklopentan, perfluormethylcyklopentan, perfluordimethylcyklopentany, perfluorcyklohexan, perfluormethylcyklohexan nebo perfluorcykloheptan. Další halogenované plyny zahrnují methylchlorid, fluorované a perfluorované ketony, například perfluoracetony a fluorované, například perfluorované ethery, jako perfluordiethylether. Použití perfluorovaných plynů, například fluoridu sírového a perfluorovaných uhlovodíků, jako perfluorpropanu, perfluorbutanů, perfluorpentanů a perfluorhexanů může být zvláště výhodné vzhledem ke známé stálosti mikrobublinek s obsahem těchto plynů v krevním proudu. Použity mohou být také další plyny, které mají fyzikálně-chemické vlastnosti, dovolující tvorbu vysoce stálých mikrobublinek v krevním proudu.

Dispergovaný plyn může být podán v jakékoliv vhodné formě, například při použití jakéhokoliv vhodného kontrastního prostředku pro zobrazování ultrazvukem s obsahem plynu. Jako příklad takových prostředků je možno uvést mikrobubliny plynu, stabilizované, například alespoň z části zapouzdřené membránou, odolnou proti spojování bublinek, například z želatiny podle WO 80/02365, bílkoviny, vytvářející plyn, například albuminu, jako lidského sérového albuminu, membrány tohoto typu byly popsány například v US 4 718 433, US 4 774 958, US 4 844 882, EP 359 246, WO 91/12823, WO 92/05806, WO 92/17213, WO 94/06477 nebo WO 95/01187. Dále je možno použít polymerní materiály, například syntetický biologicky degradovatelný polymer podle EP 398 935, elastickou membránu ze syntetického polymeru podle EP 458 745, biologicky degradovatelný polyaldehyd ve formě mikročástic podle EP 441 468, derivát N-dikarboxylové kyseliny a polyaminokyseliny

nebo polycyklického imidu ve formě mikročástic podle EP 458 079, biologicky degradovatelný polymer, popsáný ve WO 96/07434 nebo WO 93/17718, nepolymerní a nepolymerovatelný materiál, vytvářející stěny bublinek, například podle WO 95/21631 nebo může jít o membrány ze smáčedla, například typu sledového kopolymeru polyoxyethylenů a polyoxypropylenů, jako je Pluronic, polymerní smáčedla podle WO 95/06518 nebo smáčedla, vytvářející filmy, jako fosfolipidy, popsané například ve WO 92/11873, WO 92/17212, WO 92/22247, WO 94/28780, WO 95/03835 nebo WO 97/29783.

Dalšími použitelnými prostředky typu kontrastních činidel s obsahem plynu mohou být pevné systémy, obsahující plyn, například mikročástice, zvláště shluky mikročástic s obsahem plynu nebo může být plyn obsažen spojením s těmito částicemi, například adsorpcí na jejich povrchu a/nebo v dutinách nebo pórech těchto látek, prostředky tohoto typu byly popsány například v EP 122 624, EP 123 235, EP 365 457, WO 92/21382, WO 93/00930, WO 93/13802, WO 93/13808 nebo WO 93/13809. Je zřejmé, že echogenita takových kontrastních prostředků s obsahem mikročástic může být odvozena přímo od obsaženého plynu a/nebo od plynu, uvolněného z pevného materiálu například ve formě mikrobublinek, například po rozpouštění mikročástic.

Mikrobublínky plynu a další materiály, obsahující plyn, například mikročástice, mají s výhodou počáteční střední průměr nepřevyšující 10 mikrometrů, například 7 mikrometrů nebo nižší tak, aby mohly projít po podání například nitrožilní injekcí plicním systémem. Větší mikrobublínky je možno použít v případech, že tyto mikrobublínky obsahují ve směsi plyny, poměrně rozpustné v krvi nebo schopné difuze, jako vzduch, kyslík, dusík nebo oxid uhličitý spolu s v podstatě nerozpustnými a difuze neschopnými plyny, jako jsou perfluorované uhlovodíky. Difuze rozpustné nebo difuze schopné

části plynu vyvolá po podání rychlé zmenšení mikrobublínek na průměr, který bude určen množstvím nerozpustného nebo difuze neschopného plynu, toto množství je možno volit tak, aby výsledné mikrobublínky mohly projít plicními kapilárami.

Vzhledem k tomu, že dispergovaný plyn podle vynálezu in vivo zvětšuje svůj objem interakcí s difuze schopnými složkami, může být nejmenší průměr mikrobublínek při podání nižší než průměr, který se obvykle považuje za potřebný k dosažení interakce s ultrazvukem, což je typicky 1 až 5 mikrometrů při běžně užívaných frekvencích. Bublínky dispergovaného plynu tedy mohou mít průměr například 1 nm nebo ještě nižší. Podle vynálezu je tedy možno využít prostředky s obsahem plynu, které až dosud nebyly navrhovány pro použití při zobrazování ultrazvukem vzhledem k malému rozměru částic dispergovaného plynu.

V případě, že se podle vynálezu užívají prostředky s obsahem fosfolipidů, například ve formě mikrobublínek plynu, stabilizovaných fosfolipidem, je jako příklady použitelných fosfolipidů možno uvést lecithiny, například fosfatidylcholin, jako přírodní lecithiny, například lecithin z vaječného žloutku nebo ze sojových bobů, polosyntetické lecithiny, například částečně nebo plně hydrogenované a také syntetické lecithiny, jako dimyristoyl-fosfatidylcholin, dipalmitoyl-fosfatidylcholin nebo distearoyl-fosfatidylcholin, fosfatidové kyseliny, fosfatidylethanolaminy, fosfatidylseriny, fosfatidylglyceroly, fosfatidylinositoly, kardiolipiny, sfingomyeliny, fluorované analogy kterékoli z uvedených látek, jejich směsi a směsi s jinými lipidy, například cholesterolem. Zvláště výhodné může být použití fosfolipidů, které převážně, například nejméně ze 75 % obsahují molekuly, nesoucí náboj, například negativní náboj, jako přírodně se vyskytující lecithiny, odvozené například ze sojových bobů.

nebo vaječného žloutku, polosyntetické lecithiny, například částečně nebo plně hydrogenované a také syntetické fosfatidylseriny, fosfatidylglyceroly, fosfatidylinositoly, fosfatidové kyseliny a/nebo kardiolipiny, tak jak byly popsány například ve WO 97/29783.

Jako příklad materiálu ve formě mikročástic s obsahem plynu pro použití podle vynálezu je možno uvést uhlohydráty, například hexosy, jako jsou glukosa, fruktosa nebo galaktosa, disacharidy, jako jsou sacharosa, laktosa nebo maltosa, pentosy, jako jsou arabinosa, xylosa nebo ribosa, alfa-, beta- a gamma-cykloextriny, polysacharidy, například škrob, hydroxyethylovaný derivát škrobu, amylosa, amylopektin, glycogen, inulin, pulullan, dextrans, káboxymethyldextran, dextransfosfát, ketodextran, aminoethyldextran, algináty, chitin, chitosan, kyselina hyaluronová nebo heparin a také alkoholy, odvozené od cukrů, například alditoly, jako mannitol nebo sorbitol, anorganické soli, jako chlorid sodný, organické soli, jako citronan sodný, octan sodný nebo vinan sodný, kontrastní prostředky pro zobrazování pomocí rtg-záření, může jít například o běžně dodávané kontrastní prostředky s obsahem karboxylové kyseliny a neiontového amidu; typicky s obsahem nejméně jedné 2,4,6-trijodfenylové skupiny s různými substituenty, jako jsou karboxylová, karbamoylová, N-alkylkarbamoylová nebo N-hydroxyalkylkarbamoylová skupina, acylaminoskupina, N-alkylacylaminoskupina nebo acyl-aminomethyl v poloze 3 a/nebo 5, může tedy jít o kyselinu metrizoovou, diatrizoovou, iothalamovou, ioxaglovou, iohexol, iopentol, iopamidol, iodixanol, iopromid, metrizamid, iodiopamid, megluminiodipamid, megluminacetризоát a meglumindiatrizoát, mimoto je možno použít také polypeptidy a bílkoviny, například želatinu nebo arginin, jako lidský sérový albumin.

Další materiály s obsahem plynu, použitelné podle vynálezu zahrnují materiály, stabilizované kovy a popsané například v US 3 674 461 nebo US 3 528 809, materiály s obsahem plynů, stabilizované syntetickými polymery a popsané například v US 3 975 194 nebo v publikaci Farnand, Powder Technology, 22, 1979, 11 až 16, běžně dodávané mikrokuličky typu Expancel^R, jako Expancel 551 DE, popsány například v publikaci Eur. Plast. News, 9(5), 1982, str. 39, Nonwovens Industry 1981, str. 21 a Mat. Plast. Elast, 10, 1980, str. 468. Běžně dodávané mikrokuličky typu Ropaque^R, popsané například v publikaci J. Coatings Technol., 55(707), 1983, str. 79, mikro- a nanostruktury s obsahem plynu, jako jsou zeolity, anorganické nebo organické aerogely, chemické nanostruktury s dutinami, jako fullereny, clathráty a podobně, popsané například v publikaci G. E. Gadd, Science, 277, (5328), 1997, 933 až 936 a také přírodní disperze mikrobublinek, stabilizované smáčedlem a pospané například v publikaci d'Arrigo, Stable Gas-in-Liquid Emulsions, Studies in physical and theoretical chemistry, 40, Elsevier, Amsterdam, 1986.

V souvislosti s vynálezem je možno použít širokou škálu složek, schopných difuze včetně plynů a par, těkavých kapalin, těkavých pevných látek a prekursorů, z nichž se může uvolnit plyn například po jejich podání, přičemž základním požadavkem je, aby složka obsahovala nebo byla schopná uvolnit in vivo dostatečné množství plynu nebo par pod dostatečným tlakem, například nejméně 1,3 kPa tak, aby mohlo dojít k difuzi molekul plynu nebo par do dispergovaného plynu. Je zřejmé, že v případě potřeby je možno použít směs dvou nebo většího počtu složek, schopných difuze. Pojem "složka, schopná difuze" tedy zahrnuje i tyto směsi. Rovněž údaje, týkající se podání takové složky zahrnují i podání svrchu uvedených směsí takových složek.

Prostředek s obsahem složky, schopné difuze může být zpracován na příslušnou formu a podán příslušným způsobem, přičemž způsob podání z části závisí na části organismu, která má být zobrazena. Například perorální podání složky s obsahem plynu, schopného difuze je možno použít v případě, že se požaduje dočasné zadržení plynu ve stěnách zažívací soustavy. Dalším možným způsobem podání je nitrožilní podání v dávkách, podobných těm, které se běžně užívají při zobrazování ultrazvukem, prostředek může být také zpracován na emulzi, vhodnou pro perorální podání, například emulzi perfluorovaného uhlovodíku ve vodě, jak bude dále podrobněji popsáno, například určené pro použití v dávce 0,2 až 1,0 mikrolitrů perfluorovaného uhlovodíku/kg. Po podání a distribuci obou prostředků může růst částic dispergovaného plynu v krevních kapilárách stěny žaludku a střev zvýraznit obraz, získaný z těchto oblastí. Je zřejmé, že je možno použít i obrácenou kombinaci perorálně podaného dispergovaného plynu a nitrožilně podané složky, schopné difuze k získání kontrastního obrysu vnitřní stěny sliznice zažívací soustavy.

Při použití perorálně podané disperze plynu nebo složky, schopné difuze, může být výhodné zařadit chemické skupiny nebo látky, která podporuje přilnutí ke stěně zažívací soustavy, například spojením s některou ze složek této stěny, může jít například o smáčedlo nebo jinou stabilizační skupinu, která může podporovat růst dispergované plynné fáze podporou styku této fáze se složkou, schopnou difuze. Příklady takových skupin nebo látek, podporujících adhesi již byly uvedeny dříve například v případě kontrastních látek pro zobrazování zažívací soustavy pomocí rtg-záření, jde například o estery kyseliny akrylové, popsané ve WO 97/22365, jodfenolsulfonátové estery podle US 5 468 466 a jodované fenylestery podle US 5 260 049.

Inhalaci vhodné těkavé složky schopné difuze je možno užít například při podání disperze plynu bezprostředně po průchodu plicními kapilárami, například tak, aby pak byl plyn dočasně zadržen v kapilárách srdečního svalu. V provedeníh tohoto typu je možno růst částic dispergovaného plynu dále zvětšit zvýšením tlaku složky, schopné difuze v plicích, například na hodnotu vyšší než 0,05 MPa, například použitím respiračního přístroje nebo tak, že se vyšetřovaná osoba nechá dýchat proti odporu.

V případě, že je žádoucí specificky omezit účinek složky, schopné difuze na určitou cílovou oblast v organismu, může být výhodné použít nitrosvalovou nebo podkožní injekci příslušně zpracované složky, schopné difuze, například použitím fyziologicky přijatelného kapalného nosiče. Jako příklad prostředku pro podání podkožní injekcí je možno uvést prostředek ve formě nanočástic, tak jak je užíván pro lymfanagiografii. Podkožně vstříknutá složka schopná difuze se může dostat do lymfatického systému, kde může vyvolat růst částic nitrožilně podaného dispergovaného plynu a tak usnadnit zobrazení lymfatických uzlin. Obdobným způsobem je možno využít také obrácené podání kombinace tak, že se podkožně podá disperze plynu a nitrožilně se podá složka schopná difuze.

Nitrožilní podání příslušně zpracovaného prostředku s obsahem složky, schopné difuze, například při použití fyziologicky přijatelného kapalného nosiče dovoluje nejružnější kombinace podmínek při realizaci vynálezu, jak bude dále podrobněji uvedeno. Složky disperze plynu a prostředku s obsahem látky schopné difuze je možno volit tak, aby bylo možno řídit začátek a míru růstu částic dispergovaného plynu a také volit část organismu, jehož kontury mají být zvýrazněny dočasným zadržením plynů, například v kapilárních cévách.

Prostředky pro místní podání je možno nanášet na pokožku k vyvolání vstřebávání složky, schopné difuze pokožkou. Tento způsob podání je možno použít při zobrazování a/nebo léčení pokožky, podkožní tkáně a přilehlých oblastí a orgánů, například při sledování periferního oběhu v končetinách, například v dolních končetinách.

Složky, schopné difuze mohou být pro perorální nebo injekční podání zpracovány například na roztoky nebo směsi s vodou a/nebo nejméně jedním s vodou mísitelným a fyziologicky přijatelným organickým rozpouštědlem, jako je ethanol, glycerol nebo polyethylenglykol, dále může jít o disperze ve vodném prostředí, například ve formě olejové fáze nebo složky olejové fáze v emulzi typu olej ve vodě, o mikroemulze, to znamená systémy, v nichž je látka rozpuštěná v hydrofobním vnitřním prostoru mycel smáčedla ve vodném prostředí nebo je možno použít spojení s mikročásticemi nebo nanočásticemi, dispergovanými ve vhodném nosném kapalném prostředí, je například možno adsorbovat tuto složku na povrchy mikročástic nebo nanočástic a/nebo uložit do jejich dutin nebo pórů nebo zapouzdřit do vnitřního prostoru mikročástic nebo nanočástic.

V případě, že má být složka schopná difuze podána ve formě roztoku, bude záviset parciální tlak této složky in vivo na koncentraci uvedené složky například v krevním proudu a na odpovídajícím tlaku čistého materiálu složky, například podle Raoultova zákona v systému, který se blíží ideálním podmínkám. V případě, že složka má nízkou rozpustnost ve vodě, je žádoucí, aby měla dostatečně vysoký tlak par v čisté formě při běžné teplotě organismu, například nejméně 0,66 kPa, s výhodou nejméně 1,3 kPa. Příkladem složek, které jsou ve vodě poměrně nerozpustné, avšak mají vysoký tlak par, mohou být svrchu uvedené plyny, vhodné pro mikrobublínky.

Jako příklady ve vodě vysoce rozpustné nebo s vodou mísitelné složky, schopné difuze, která proto může mít nižší tlak par při teplotě organismu lze uvést alifatické ethery, jako ethylmethylether nebo methylpropylether, alifatické estery, jako methylacetát, methylmravenčan nebo ethylmravenčan, alifatické ketony, jako aceton, alifatické amidy, jako N,N-dimethylformamid nebo N,N-dimethylacetamid a alifatické nitrily, jako acetonitril.

V některých případech však může být výhodné použít s vodou v podstatě nemísitelnou složku, schopnou difuze a zpracovatelnou na emulzi, to znamená na stabilizovanou suspenzi v příslušném vodném prostředí vzhledem k tomu, že v takových systémech bude tlak par složky, schopné difuze ve vodné fázi v podstatě rovný tlaku čisté složky, a to i ve velmi zředěných emulzích. V takových provedeních je možno složku, schopnou difuze zpracovat například jako část běžné farmaceutické emulze, jakou je například Intralipid^R (Pharmacia).

Složka, schopná difuze je v emulzích tohoto typu s výhodou kapalná při teplotě zpracování a skladování, může při tom jít o nízkou teplotu, například -10°C v případě, že vodná fáze obsahuje příslušné látky, chránící proti zmrznutí. Při teplotě organismu se pak složka, schopná difuze, nachází ve formě plynu nebo splňuje požadavky na požadovaný tlak par. Příslušné sloučeniny je možno volit například ze seznamů emulgovatelných kapalin s nízkou teplotou tání, tak jak jsou uvedeny ve svrchu zmíněné přihlášce WO 94/16379. Jako specifické příklady emulgovatelných složek schopných difuze lze uvést alifatické ethery jako diethylether, polycyklické oleje nebo alkoholy, jako mentol, kafr nebo eukalyptol, heterocyklické látky, jako furan nebo dioxan, alifatické uhlovodíky s přímým nebo rozvětveným řetězcem, nasycené i nenasycené, jako n-butan, n-pentan, 2-methylpropan, 2-methylbutan, 2,2-dimethylpropan, 2,2-dimethylbutan, 2,3-dimethylbutan, 1-buten,

2-buten, 2-methylpropen, 1,2-butadien, 1,3-butadien, 2-methyl-1-buten, 2-methyl-2-buten, isopren, 1-penten, 1,3-pentadien, 1,4-pentadien, butenyn, 1-butin, 2-butin nebo 1,3-butadiin, cykloalifatické uhlovodíky, jako cyklobutan, cyklobuten, methylcyklopropan nebo cyklopentan a halogenované uhlovodíky s nízkou molekulovou hmotností, například s obsahem až 7 atomů uhlíku. Jako příklady halogenovaných uhlovodíků lze uvést dichlormethan, methylbromid, 1,2-dichlorethylen, 1,1-dichlorethan, 1-bromethylen, 1-chlorethylen, ethylbromid, ethylchlorid, 1-chlorpropen, 3-chlorpropen, 1-chlorpropan, 2-chlorpropan a terc.butylochlorid. S výhodou jsou atomy halogenu alespoň z části atomy fluoru a jde tedy o dichlorfluormethan, trichlorfluormethan, 1,2-dichlor-1,2-difluorethan, 1,2-dichlor-1,1,2,2-tetrafluorethan, 1,1,2-trichlor-1,2,2-difluorethan, 2-brom-2-chlor-1,1,1-trifluorethan, 2-chlor-1,1,2-trifluorethyldifluormethylether, 1-chlor-2,2,2-trifluorethyldifluormethylether, částečně fluorované alkany, například pentafluorpropany, jako 1H,1H,3H-pentafluorpropan, hexafluorbutany, nonafluorbutany, jako 2H-nonafluor-terc.-butan a dekafluorpentany, jako 2H,3H-dekafluorpentan, dále může jít o částečně fluorované alkeny, například heptafluorpentany, jako jsou 1H,1H,2H-heptafluorpent-1-en a nonafluorhexeny, jako 1H,1H,2H-nonafluorhex-1-en, o fluorované ethery, například 2,2,3,3,3-pentafluorpropylmethylether nebo 2,2,3,3,3-pentafluorpropyldifluormethylether, zvláště výhodné jsou však perfluorované uhlovodíky. Jako příklady perfluorovaných uhlovodíků je možno uvést perfluoralkany, například perfluorbutany, perfluorpentany, perfluorhexany, například perfluor-2-methylpentan, perfluorheptany, perfluoroktany, perfluoronany a perfluordekany, perfluorcykloalkany, například perfluorcyklobutan, perfluordimethylcyklobutany, perfluorcyklopentan a perfluormethylcyklopentan, dále perfluoralkeny, například perfluorbuteny, jako perfluorbut-2-en nebo perfluorbuta-1,3-dien, perfluorpenteny, jako perfluorpent-1-en,

a perfluorhexeny, například perfluor-2-methylpent-2-en nebo perfluor-4-methylpent-2-en a také perfluorcykloalkeny, například perfluorcyklopenten nebo perfluorcyklopentadien a perfluorované alkoholy, jako perfluor-terc.butanol.

Emulze tohoto typu mohou také obsahovat nejméně jedno smáčedlo ke stabilizaci disperze. Může jít o totéž smáčedlo, jaké je užito ke stabilizaci disperze plynu nebo o odlišné smáčedlo. Povaha jakéhokoli takového smáčedla může podstatně ovlivnit například rychlost růstu dispergované fáze plynu. Obecně je možno použít širokou škálu smáčedel, tak jak jsou uvedena například v EP 727 225. Reprezentativními příklady použitelných smáčedel mohou být mastné kyseliny, například nasycené nebo nenasycené mastné kyseliny s přímým řetězcem, obsahující například 10 až 20 atomů uhlíku a jejich estery s uhlohydráty a triglyceridové estery, dále fosfolipidy, například lecithin, fosfolipidy s obsahem fluoru, bílkoviny, například albuminy, jako lidský sérový albumin, polyethylen-glykoly a smáčedla na bázi sledových kopolymerů, například sledové kopolymery polyoxyethylenu a polyoxypropylenu, jako Pluronic, prodloužené polymery, například acyloxyacylpolyethylenglykoly, jako polyethylenglykolmethylether-16-hexadekanoyloxyhexadekanoát, například takové, v nichž polyethylenglykolová skupina má molekulovou hmotnost 2300, 5000 nebo 10 000 a také smáčedla s obsahem fluoru, která jsou běžně dodávána například pod obchodními názvy Zonyl a Fluorad nebo jaká byla popsána v mezinárodní přihlášce WO 96/39197. Zvláště vhodnými smáčedly jsou například fosfolipidy, obsahující molekuly, nesoucí negativní náboj. Jde například o přírodně se vyskytující fosfatidylseriny, například ze sojových bobů nebo z vaječného žloutku, semisyntetické, například částečně nebo plně hydrogenované fosfatidylseriny a také syntetické fosfatidylseriny, fosfatidylglyceroly, fosfatidylinositoly, fosfatidové kyseliny a/nebo kardiolipiny.

Rozměr kapek dispergované složky, schopné difuze v emulzích určených pro nitrožilní podání by s výhodou měl být nižší než 10, například nižší než 7 mikrometrů a větší než 0,1 mikrometru k dosažení volného průchodu kapek plicním systémem.

Jak již bylo svrchu uvedeno, s vodou nemísitelné složky, schopné difuze je také možno zpracovat na mikroemulze. Takové systémy jsou výhodné vzhledem k jejich termodynamické stabilitě a ke skutečnosti, že složka, schopná difuze je prakticky rovnoměrně rozdělena ve vodné fázi. Z tohoto důvodu mají mikroemulze vzhled roztoků, avšak mohou mít vlastnosti emulzí, pokud běží o parciální tlak dispergované fáze.

Prekursory plynů, které mohou být v rámci vynálezu použity zahrnují jakékoliv biokompatibilní složky, schopné vyvinout plyn in vivo, to znamená při teplotě organismu a fyziologickém pH. Jako příklady je možno uvést anorganické a organické uhličitany a hydrogenuhličitany a látky, uvolňující dusík, jako pyrazoliny, pyrazoly, triazoliny, diazoketony, diazoniové soli, tetrazoly a azidy. Je zřejmé, že v takových systémech je složkou, schopnou difuze ve skutečnosti vytvořený plyn.

Aby bylo možno zajistit co největší těkavost složky, schopné difuze po jejím podání, a k usnadnění růstu dispergované plynné fáze (v obou případech jde o endothermní pochody), může být výhodné měnit teplotu roztoku nebo suspenze složky, schopné difuze a/nebo disperze plynu před podáním a/nebo zařadit do těchto prostředků exothermně reaktivní složky. Použití složek, které reagují exothermně pod vlivem ultrazvukového záření může být v těchto případech zvláště výhodné.

Růst dispergované plynné fáze in vivo může být například doprovázen expanzí jakéhokoli zapouzdřujícího materiálu v případě, že je tento materiál dostatečně ohebný a/nebo přemístěním přebytku smáčedla z podaného materiálu na rozhraní mezi zvětšujícími se bublinkami plynu a kapalinou. Je však také možné, že smrštění zapouzdřujícího materiálu a/nebo interakce tohoto materiálu s ultrazvukem může podstatně zvýšit jeho poréznost. Až dosud bylo pozorováno, že rozrušení zapouzdřujícího materiálu vedlo v řadě případů k rychlé ztrátě echogenity difuzí a rozpuštěním plynu, v tomto případě však bylo prokázáno, že při použití kontrastních prostředků v souladu s požadavky vynálezu je takto uvolněný plyn v podstatě stálý. I když není zapotřebí se vázat na teoretické úvahy, je velmi pravděpodobné, že uvolněný plyn, například ve formě volných mikrobublinek může být stabilizován například proti kolapsu těchto mikrobublinek přesyceným okolním prostředím, vytvořeným v důsledku přítomnosti složky, schopné difuze, která zajistí vznik tlakového gradientu, působícího proti tendenci plynu pronikat difuzí ven z mikrobublinek. Uvolněný povrch plynu může vzhledem k nepřítomnosti zapouzdřujícího materiálu vyvolat výjimečně příznivé akustické vlastnosti takto pozměněného prostředku, jak je možno prokázat vysokým zpětným odrazem a nízkou absorpcí energie, což je možno vyjádřit poměrem zeslabení a vysokým odrazem. Tento echogenní účinek může být zachován po delší časové období, a to i v průběhu déle trvajícího působení ultrazvuku.

Stabilizační účinek současně podané složky schopné difuze může tedy znamenat velkou výhodu v tom smyslu, že příznivě ovlivní trvání i stupeň echogenity existujících kontrastních prostředků s obsahem plynu v případě, že hodnoty, získané při použití tohoto prostředku nejsou uspokojivé při samotném podání tohoto prostředku. Bylo například pozorováno,

že trvání účinku kontrastních prostředků na bazi albuminu je často závažně omezena kolapsem zapouzdřujícího albuminového materiálu, a to v důsledku změn systolického krevního tlaku v srdci nebo v žilním systému nebo v důsledku působení ultrazvuku, tento nedostatek je však možno z větší části vyrovnat současným podáním složky, schopné difuze podle vynálezu.

V jednom z výhodných provedení vynálezu je možno volit prostředek, tvořený disperzí plynu a prostředek, obsahující složku, schopnou difuze ve formě suspenze tak, že alespoň část dispergovaného plynu projde plicemi a pak se částice plynu po průchodu plicemi rychle zvětšují difuzí složky, schopné difuze do vnitřního prostoru částic, prostředek je pak zachycen v srdečním svaly a dovoluje jeho zobrazení ultrazvukem. V průběhu snižování koncentrace těkavé složky, schopné difuze v krevním proudu, například při odstranění této složky z krve například v plicích nebo vydechováním, metabolismem nebo redistribucí do jiných tkání dojde v typických případech k difuzi složky, schopné difuze ven z částic ven z dispergovaného plynu a tyto částice se tedy smršťují na svůj počáteční malý rozměr a pak jsou z krevního proudu odstraněny působením retikuloendoteliálního systému. Toto přechodné podstatné zvýšení echogenity s následným vymizením tohoto kontrastního účinku je zcela odlišné od echogenních vlastností, které je možno pozorovat v případě, že je jedna z obou složek podána samostatně. Z toho, co bylo uvedeno je zřejmé, že je možno řídit trvání retence dispergovaného plynu úpravou dávky a/nebo složení složky, schopné difuze.

Podobně je možno zobrazit i další kapilární systémy, například v ledvinách, játrech, slezině, štítné žláze, kosterních svalech, mléčné žláze a penisu.

Je zřejmé, že určité faktory, jako rychlost a/nebo rozsah růstu částic dispergovaného plynu je obecně možno řídit příslušným výběrem plynu a zapouzdřujícího stabilizačního materiálu a zvláště volbou povahy složky, schopné difuze a způsobu jejího zpracování včetně povahy jakéhokoli použitého smáčedla a rozměrů kapiček dispergované fáze v případě, že je složka zpracována na emulzi. V tomto posledním případě při daném množství emulgované složky, schopné difuze může snížení průměru kapiček zvýšit rychlost přenosu složky, schopné difuze ve srovnání s větším rozměrem kapiček vzhledem k tomu, že k rychlejšímu uvolnění dojde z malých kapiček, které mají vyšší poměry povrchové plochy k objemu. Dalšími parametry, které je možno využít k řízení celého postupu jsou relativní množství obou podaných prostředků a v případě, že jsou tyto prostředky podávány odděleně také pořadí jejich podání, časový interval mezi podáním obou prostředků a popřípadě i vzdálenost místa podání těchto dvou prostředků v organismu. Je zřejmé, že schopnost difuze v případě složky, schopné difuze může dovolit podání této složky v různých částech organismu různým způsobem, například pomocí inhalace, vstřebáváním pokožkou, může také jít o podání podkožní, nitrožilní, nitrosvalové nebo perorální. Formy prostředku s dispergováním plynem jsou již omezené různými parametry.

Zvláště důležitými parametry v případě složky, schopné difuze, je rozpustnost této složky ve vodě a/nebo v krvi a její schopnost difuze (vyjádřená například konstantami difuze), která bude určovat rychlost transportu v nosné kapalině nebo krvi a také permeabilita jakoukoliv membránou, zapouzdřující dispergovaný plyn. Tlak, vytvářený složkou, schopnou difuze in vivo, je dalším faktorem, který může ovlivnit rychlost difuze do dispergovaného plynu, stejně jako koncentrace uvedené složky. To znamená, že v souladu s Fickovým zákonem bude koncentrační gradient složky, schopné

difuze relativně například ke vzdálenosti mezi jednotlivými bublinkami plynu a kapičkami emulze spolu s koeficientem difuze složky, schopné difuze v okolním kapalném prostředí určovat rychlost přenosu jednoduchou difuzí. Koncentrační gradient je určován rozpustností složky, schopné difuze v okolním prostředí a vzdáleností mezi jednotlivými mikrobublinkami plynu a kapičkami emulze.

Účinná rychlost transportu složky, schopné difuze může být v případě potřeby řízena úpravou viskozity prostředku s dispergovanou plynnou fází a/nebo složením složky, schopné difuze, například přidáním jedné nebo většího počtu biologicky kompatibilních látek, zvyšujících viskozitu, například kontrastních látek pro zobrazování rtg-zářením, polyethylen-glykolů, uhlohydrátů, bílkovin, polymerů nebo alkoholů. Může být například výhodné současně vstříknout oba prostředky v relativně velkém objemu (například v objemu nejméně 20 ml v případě člověka s hmotností 70 kg) vzhledem k tomu, že v tomto případě dojde k oddálení úplného promísení složek s krví a tím i k oddálení nástupu růstu částic dispergovaného plynu až do vstupu do pravé srdeční komory a do plicních kapilár. Toto zpoždění růstu částic dispergovaného plynu je možno zvětšit použitím nosné kapaliny, která není dostatečně nasycena plyny a jinými složkami, schopnými difuze, například v důsledku svého předchozího zchlazení.

Jak již bylo svrchu uvedeno, může se jevit, které byly svrchu popsány, účastnit i jiný mechanismus transportu než difuze. Transport může například vzniknout v důsledku hydrodynamického proudu v obklopujícím kapalném prostředí. Tento způsob může být důležitý v cévách a kapilárách, v nichž může docházet k vysokému stříhovému proudění. K transportu složky, schopné difuze do dispergovaného plynu může dojít také v důsledku kolize mezi mikrobublinkami plynu a kapičkami emulze, což například může vést k adsorpci složky,

schopné difuze na povrch mikrobublinek a/nebo průnik složky, schopné difuze do mikrobublinek formou spojování. V takových případech mají koeficient difuze a rozpustnost složky, schopné difuze minimální vliv na rychlost přenosu, na velikost částic složky, schopné difuze, například na rozměr kapiček v případě emulze a na frekvenci kolize mezi mikrobublínkami a kapkami emulze, které jsou základními faktory, řídícími rychlost a rozsah růstu mikrobublinek. Například pro dané množství emulgované složky, schopné difuze povede snížení průměru kapiček ke zvětšení celkového počtu kapiček a může tak zvýšit i rychlost přenosu snížením střední vzdálenosti mezi mikrobublínkami plynu a kapičkami emulze, čímž dochází ke zvýšení pravděpodobnosti kolize a/nebo splývání obou útvarů. Je zřejmé, že rychlost přenosu v průběhu kolize může být značně zvýšena dalším oscilačním pohybem mikrobublinek plynu a kapiček emulze složky, schopné difuze, například působením energie ultrazvuku. Kinetika postupu, při němž dochází ke kolizi, vyvolané energií ultrazvuku se může lišit od kinetiky transportu složky, schopné difuze v nosné kapalině a/nebo krvi například v tom smyslu, že může být zapotřebí specifické úrovně energie k zahájení kolize nebo splývání mikrobublinek plynu a kapiček emulze složky, schopné difuze. Z toho vyplývá, že může být výhodné zvolit rozměr a hmotnost kapiček emulze tak, aby se v průběhu kolize vytvářela dostatečná síla při oscilaci mikrobublinek a mohlo dojít ke splývání mikrobublinek s kapičkami emulze.

Jak již bylo svrchu uvedeno, je permeabilita jakéhokoliv materiálu, použitého k zapouzdření dispergované fáze plynu parametrem, který může ovlivnit rychlost růstu částic plynné fáze a z tohoto důvodu může být žádoucí zvolit složku, schopnou difuze, která snadno prochází do zapouzdřujícího materiálu, kterým může být například membrána, vytvořená z polymeru nebo smáčedla, například jednoduchá vrstva

nebo jedna nebo větší počet dvouvrstev smáčedla, tvořícího membránu, například fosfolipidu. Bylo však zjištěno, že je také možno použít v podstatě nepermeabilní zapouzdřující materiál vzhledem k tomu, že růst částic dispergovaného plynu může být vyvolán nebo podporován také působením ultrazvuku včetně ultrazvuku s nižšími nebo vyššími frekvencemi, než jaké se běžně užívají v lékařství při zobrazování ultrazvukem (například v rozsahu 10 Hz až 1 GHz, s výhodou v rozmezí 1 kHz až 10 MHz), přičemž ultrazvuk může být použit kontinuálně nebo ve formě pulsů, nebo mohou růst částic dispergovaného plynu vyvolat kombinace prostředků, podaných podle vynálezu. Růst částic plynu tedy může být například vyvolán působením ultrazvuku, použitého k zobrazování nebo předběžným ozářením, sloužícím například k dosažení dočasné retence plynu v kapilárních cévách specifického cílového orgánu. Další možností aktivace růstu částic dispergovaného plynu je aplikace dostatečného množství jiných forem energie, například protřepáváním, vibrací, působením elektrického pole, ozářením nebo bombardováním proudem určitých částic, například proudem neutrálních částic, iontů nebo elektronů.

I když není zapotřebí se vázat na jakékoliv teoretické úvahy, je pravděpodobné, že v průběhu ozáření ultrazvukem dochází k alespoň přechodné modifikaci permeability zapouzdřujícího materiálu a také schopnosti difuze složky, schopné difuze v obklopující kapalně fázi a/nebo k modifikaci frekvence kolizí mezi kapičkami emulze a zapouzdřenými mikrobublínkami. Vzhledem k tomu, že tento účinek je možno pozorovat při použití velmi krátkých pulzů ultrazvuku (například s trváním 0,3 mikrosekund při zobrazování způsobem B nebo 2 mikrosekundy při zobrazování podle Dopplera nebo pomocí druhé harmonické), nejde pravděpodobně o příklad rektifikované difuze, v níž by ozáření ultrazvukem vyvolalo

rovnoměrný vzestup poloměru plynových bublinek (viz publikaci Leighton E. G., The Acoustic Bubble, Academic Press, 1994, str. 379) a je pravděpodobné, že pulzy ultrazvuku rozruší zapouzdřující membránu a tak usnadní růst částic dispergované fáze plynu difuzí složky, schopné difuze do vnitřního prostoru plynné fáze.

V případě potřeby může být buď dispergovaná fáze plynu nebo složka, schopná difuze tvořená azeotropní směsí nebo je možno tyto prostředky volit tak, že se azeotropní směs tvoří in vivo v průběhu smísení složky, schopné difuze s dispergovaným plynem. Taková tvorba azeotropní směsi může být například využita ke zvýšení těkavosti sloučenin s poměrně vysokou molekulovou hmotností, například halogenovaných uhlovodíků, jako fluorovaných uhlovodíků, včetně perfluorovaných uhlovodíků, které jsou za běžných podmínek při teplotě lidského organismu 37 °C kapalné tak, aby bylo možno je podávat při této teplotě v plynném stavu. Tento postup má velké výhody vzhledem k tomu, že prodlužuje životnost kontrastního prostředku in vivo v důsledku přítomnosti azeotropní směsi, protože je známo, že některé parametry, jako rozpustnost ve vodě, rozpustnost v tucích, schopnost difuze a odolnost proti tlaku se u sloučenin typu fluorovaných uhlovodíků snižuje se zvyšující se molekulovou hmotností.

Obecně je tedy možno uvést, že známá přirozená odolnost azeotropních směsí k oddělení jejich složek bude přispívat ke stálosti kontrastního prostředku v průběhu přípravy, skladování i následného podávání.

Azeotropní směsi pro toto použití je možno vybírat z literatury na základě předběžných pokusů a/nebo teoretických předpovědí. Jde například o publikace Tanaka, Fluid Phase Equilibria 24, 1985, 187 až 203, Kittel C. a Kroemer H., kapitola 10, publikace Thermal Physics (W. H. Freeman and

and Co., New York, USA, 1980) nebo Hemmer P. C., kapitoly 16 až 22, Statistisk Mekanikk, Tapir, Trondheim, Norsko, 1970.

Jedním z literatury známým příkladem azeotropní směsi, která účinně snižuje teplotu varu složky s vyšší molekulovou hmotností na hodnotu pod teplotou organismu je směs, obsahující v hmotnostním poměru 50 : 43 dvě složky, 1,1,2-trichlor-1,2,2-trifluormethan s teplotou varu 47,6 °C a 1,2-difluormethan s teplotou varu 29,6 °C, popsaná v US 4 055 049, směs má azeotropní teplotu varu 24,9 °C. Další příklady azeotropních směsí s obsahem halogenovaných uhlovodíků jsou uvedeny v EP 783017, US 5 599 783, US 5 605 647, US 5 605 882, US 5 607 616, US 5 607 912, US 5 611 210, US 5 614 565 a US 5 616 821.

V publikaci Simons a další, J. Chem. Phys., 18(3), 1950, 335 až 346 se uvádí, že směs perfluor-n-pentanu s teplotou varu 29 °C a n-pentanu s teplotou varu 36 °C má velkou kladnou odchylku od Raoultova zákona. Tento účinek je nejvyjádřenější pro přibližně ekvimolární směs, praktická teplota varu směsi je přibližně 22 °C nebo nižší. Směsi perfluorovaných uhlovodíků a nesubstituovaných uhlovodíků mají obecně užitečné azeotropní vlastnosti. Zvláště silné azeotropní účinky byly pozorovány u směsí, jejichž složky mají blízké teploty varu. Příkladem dalších azeotropních směsí perfluorovaných uhlovodíků a uhlovodíků může být směs perfluor-n-hexanu s teplotou varu 59 °C a n-pentanu, kde azeotropní směs má teplotu varu mezi teplotou místnosti a 35 °C a směs perfluor-4-methylpent-2-enu s teplotou varu 49 °C a n-pentanu, která má teplotu varu přibližně 25 °C.

Další použitelné azeotropní směsi jsou směs haloethanu a diethyletheru a směsi dvou nebo většího počtu fluorovaných plynů, jako perfluorpropanu a fluorethanu, perfluor-

propanu a 1,1,1-trifluorethanu nebo také perfluorethanu a difluormethanu.

Je známo, že fluorované plyny, například perfluorethan mohou tvořit azeotropní směsi s oxidem uhličitým, jak bylo popsáno například ve WO 95/02652. V důsledku toho vede podání kontrastních prostředků s obsahem takových plynů in vivo ke tvorbě ternárních nebo vyšších azeotropních směsí s krevními plyny, například oxidem uhličitým, čímž se dále zvyšuje stabilita dispergovaného plynu.

V případě, že oba prostředky, tvořící kombinovanou kontrastní látku podle vynálezu mají být podány současně, například ve formě injekce z oddělených injekčních stříkaček spojovacím vedením nebo po předběžném smísení, dochází k tomu za řízených podmínek, tak, aby nedošlo k předčasnému růstu mikrobublinek.

Prostředky, které jsou určeny ke smísení před současným podáním mohou být s výhodou skladovány v příslušném balení se dvěma nebo větším počtem oddílů. Disperze plynu nebo sušeného prekurzoru, například obsahující lyofilizovaný zbytek suspenze mikrobublinek plynu ve vodném prostředí s obsahem amfifilního materiálu, zvláště v případě, že je amfifilní materiál tvořen v podstatě fosfolipidem, převážně, to znamená nejméně ze 75 % obsahujícím molekuly s celkovým, například negativním nábojem mohou být uloženy do prvního oddílu, například lahvičky, s níž je spojena injekční stříkačka, obsahující složku, schopnou difuze. Výstup z injekční stříkačky je uzavřen například membránou nebo zátkou k zábraně předběžného smísení. Působením pístu stříkačky se membrána rozruší a složka, schopná difuze se smísí se složkou, tvořenou disperzí plynu nebo s jejím prekurzorem, načež se po případném protřepání a/nebo ředění směs injekční stříkačkou podává.

Je také možno oba prostředky skladovat oddělené membránou nebo zátkou v téže lahvičce nebo injekční stříkačce. Jeden nebo oba z těchto prostředků mohou být pod tlakem plynu nebo par. Rozrušením membrány nebo zátky, například pomocí injekční jehly je možno smísit oba prostředky. Toto mísení může být urychleno ručním protřepáváním, po němž se směs vyjme z lahvičky a podává. Podle dalšího odlišného provedení může například lahvička obsahovat sušený prekurzor prostředku s dispergovaným plynem a je opatřena první injekční stříkačkou, obsahující kapalinu pro opětnou disperzi prekurzoru, ~~ve druhé stříkačce je uložen prostředek, obsahující složku,~~

schopnou difuze. Podle dalšího možného provedení se do lahvičky uloží při oddělení membránou prostředek s obsahem složky, schopné difuze a sušený prekurzor pro prostředek s dispergovaným plynem a lahvička je opatřena injekční stříkačkou, obsahující kapalinu pro redispergování tohoto sušeného prekurzoru.

V provedeních vynálezu, při nichž se prostředek s dispergovaným plynem a prostředek, obsahující složku, schopnou difuze mísí před podáním, bude v průběhu výroby a při skladování směs typicky udržována za zvýšeného tlaku nebo při nižší teplotě tak, aby tlak složky, schopné difuze, nebyl dostatečný k růstu částic dispergovaného plynu. Aktivaci růstu částic dispergovaného plynu je pak možno jednoduchým způsobem vyvolat uvolněním zvýšeného tlaku nebo zahřátím na tělesnou teplotu, k němuž dochází podáním směsi nebo je možno směs přehřát těsně před podáváním.

V těch provedeních vynálezu, při nichž se prostředek s dispergovaným plynem a prostředek, obsahující složku, schopnou difuze, podávají odděleně, je možno použít časového intervalu mezi podáním obou prostředků k ovlivnění části organismu, v níž převážně dojde k růstu částic prostředku

s dispergovanou fází plynu. Složku, schopnou difuze je například možno podat injekčně a nechat koncentrovat v játrech, čímž se dosáhne výraznějšího zobrazení tohoto orgánu po následném injekčním podání prostředku s dispergovaným plynem. Tam, kde to stálost prostředku s dispergovaným plynem dovolí je také možno nejprve injekčně podat tento prostředek a nechat jej koncentrovat v játrech a pak teprve podat prostředek, obsahující složku, schopnou difuze ke zvýraznění obrazu.

Zařízení, která je možno použít pro zobrazování zahrnují dvojrozměrné i trojrozměrné postupy; například běžný B-postup (například s použitím amplitudy signálu, vytvořeného v zařízení a měnící se s časem, od subharmonických až do vyšších harmonických nebo je možno využít součet nebo rozdíl frekvencí, odvozených od vyslaného pulzu a takových harmonických, dále je možno využít zobrazení, vytvořeného při použití základní frekvence nebo s výhodou její druhé harmonické), dále je možno využít zobrazování pomocí Dopplerovy amplitudy nebo Dopplerova barevného zobrazování a kombinace těchto dvou postupů s kterýmkoliv ze svrchu uvedených způsobů. Pro danou dávku dispergovaného plynu a složky, schopné difuze je možno při použití Dopplerova barevného zobrazení pomocí ultrazvuku k vyvolání růstu částic dispergovaného plynu získat silnější kontrast při následném zobrazování běžných B-způsobem, pravděpodobně v důsledku vyšší intenzity použitého ultrazvuku. Aby bylo možno snížit vliv pohybů, je možno vytvořit postup na obrazy tkáně, například srdce nebo ledviny při použití vhodné synchronizační techniky, například spojením s ECG nebo s respiračními pohyby vyšetřované osoby. K detekci kontrastního prostředku může být vhodné také měření změn rezonanční frekvence nebo měření absorpce, těmito jevy je doprovázen růst částic dispergovaného plynu.

Je zřejmé, že dispergovaný plyn z kombinovaných kontrastních prostředků podle vynálezu bude dočasně zachycen

ve tkáni v koncentraci, která je úměrná prokrvení tkáně. Při použití běžného zobrazování, které je přímo závislé na intenzitě odraženého signálu je možno obrazy takových tkání interpretovat jako mapy prokrvení, v nichž je pozorovaná intenzita signálu funkcí místního prokrvení. Tato skutečnost znamená podstatný rozdíl ve srovnání s obrazy, získanými při použití kontrastních látek, volně unášených krevním proudem, kde místní koncentrace kontrastního prostředku a odpovídající intenzita odraženého signálu odpovídá na okamžitém obsahu krve spíše než na prokrvení příslušné tkáně.

V případě srdečního svalu, v němž mapa prokrvení je odvozena od intenzity odraženého signálu, může být výhodné podrobit vyšetřovanou osobu fyzickému nebo farmakologickému stresu ke zvýraznění rozdílů prokrvení a tím i v kontrastu zobrazení mezi normálně prokrvenými částmi srdečního svalu a částmi, které jsou zásobeny zúženými tepnami. Jak je známo ze zobrazování srdce pomocí radioaktivních látek, takový stres vyvolá rozšíření cév a zvýšené prokrvení zdravé srdeční tkáně, kdežto průtok krve v nedostatečně zásobené tkáni, zásobené zúženou tepnou zůstává beze změny, protože kapacita pro rozšíření cév je již vyčerpána autoregulací, snažící se zvýšit nedostatečný průtok krve.

Použití stresu, jako tělesného svičení nebo farmakologicky podáním adrenergických látek může vyvolat u některých vyšetřovaných osob, potenciálně trpících srdečním onemocněním bolest na hrudníku a je tedy výhodnější zvýšit prokrvení zdravé tkáně podáním látek, rozšiřujících cévy, například ze skupiny adenosin, dipyridamol, nitroglycerin, isosorbidmononitrát, prazosin, doxazosin, dihydralazin, hydralazin, nitroprussid sodný, pentoxyfyllin, amelodipin, felodipin, isradipin, nifedipin, nimodipin, verapamil, diltiazem a oxid dusný. V případě adenosinu může dojít až ke čtyřnásobnému vzestupu průtoku koronárními cévami ve zdravém srdečním

svalu, čímž podstatně zvýší příjem a dočasná retence kontrastních prostředků a tím se zvýší i rozdíl v intenzitě odraženého signálu mezi normální a nedostatečně zásobenou tkání srdečního svalu. Vzhledem k tomu, že zachycení kontrastního prostředku v místě zobrazení je v podstatě fyzikální postup, je tento postup vysoce účinný, zejména ve srovnání s příjmem radioaktivních látek, například thalia nebo technecia, který je omezen malou dobou kontaktu mezi radioaktivním prvkem a tkání, takže může být zapotřebí udržovat vasodilataci po celou dobu vyšetření, například 4 až 6 minut při scintigrafii s použitím thalia, aby bylo dosaženo optimálního výsledku. Kontrastní prostředky podle vynálezu netrpí takovým omezením difuze nebo transportu a vzhledem k tomu, že jejich retenci v srdeční tkáni je také možno rychle ukončit, například vypnutím ultrazvuku, použitého k vyvolání růstu částic, je potřebné období vasodilatace k dosažení prokrvení srdečního svalu velmi krátké, například méně než 1 minuta. Tímto způsobem je možno zkrátit nepříjemné vedlejší účinky, které může u vyšetřovaných osob vyvolat podání vasodilatačních látek.

Vzhledem k tomu, že požadovaná vasodilatace může být pouze krátkodobá, je adenosin zvláště vhodnou vasodilatační látkou vzhledem k tomu, že běží o endogenní sloučeninu s velmi krátkým účinkem, jak je možno prokázat poločasem v krevním oběhu, který má hodnotu pouze 2 sekundy. K nejintenzivnější vasodilataci dojde v srdečním svalu vzhledem k tomu, že do vzdálenějších tkání se sloučenina dostane již v koncentraci nižší, než je účinná koncentrace. Je zřejmé, že vzhledem ke krátkému poločasu může být zapotřebí injekci opakovat nebo v průběhu vyšetření srdce použít infuzi adenosinu. Jako příklad je možno uvést počáteční podání 150 mikrogramů/kg adenosinu v podstatě současně s kontrastními prostředky a po 10 sekundách ještě pomalou injekci téže dávky adenosinu, například v průběhu 20 sekund.

Kombinace kontrastních prostředků podle vynálezu může být s výhodou užita také pro aplikaci biologicky aktivních látek, například některých léčiv do cílených tkání. To může být výhodné zejména u některých specifických onemocnění člověka i jiných živočichů. Látky s biologickým účinkem mohou být přítomny například v dispergovaném plynu, mohou být vázány na část zapouzdřující stěny nebo matrice například kovalentními nebo iontovými vazbami, v případě potřeby delšími vaznými řetězci, nebo mohou být tyto látky fyzikálně smíseny se zapouzdřujícím materiálem nebo s materiálem matrice. Tato poslední možnost je zvláště vhodná v případě, že účinná látka a zapouzdřující materiál nebo materiál matrice mají podobnou polaritu nebo rozpustnost.

Řiditelný růst částic dispergovaného plynu je možno využít k jeho dočasné retenci v kapilárách cílové oblasti. Použití ultrazvuku k vyvolání růstu částic a tím zadržení plynu a s ním spojené účinné látky v cílové struktuře je zvláště výhodné. Ke koncentraci částic dispergovaného plynu v cílové oblasti je možno použít místní injekce prostředku s dispergovaným plynem nebo s výhodou prostředku, který obsahuje složku, schopnou difuze.

Biologicky účinná látka, která může být vázána na specifický vektor s afinitou pro specifické buňky, struktury nebo patologicky změněné tkáně může být uvolněna například v důsledku smrštění nebo rozrušení materiálu, vytvářejícího zapouzdřující stěny nebo materiálu matrice v důsledku růstu částic dispergovaného plynu, rozpouštění zapouzdřujícího materiálu nebo materiálu matrice nebo rozpadu mikrobublinek nebo mikročástic, například působením ultrazvuku nebo obrácením koncentračního gradientu složky, schopné difuze, v cílové tkáni. V případě, že látka s biologickým účinkem je

chemicky vázána na zapouzdřující stěnu nebo na matrici, může spojení nebo jakýkoliv spojovací řetězec s výhodou obsahovat jednu nebo větší počet labilních skupin, které je možno odštěpit k uvolnění účinné látky. Jako příklad odštěpitelných skupin je možno uvést amidové, imidové, iminové, esterové, anhydridové, acetalové, karbamátové, karbonátové a disulfidové skupiny, které jsou biologicky degradovatelné in vivo například v důsledku hydrolýzy a/nebo působením enzymů.

Jako příklady látek s biologickým účinkem, vhodných pro použití v kombinovaných prostředcích podle vynálezu je možno uvést látky s protinádorovým účinkem, jako jsou vincristin, vinblastin, vindesin, busulfan, chlorambucil, spiriplatin, cisplatin, carboplatin, methotrexat, adriamycin, mitomycin, belomycin, cytosinarabinosid, arabinosyladenin, merkaptopurin, mitotan, prokarbazin, dactinomycin (antimycin D), daunorubicin, doxorubicinhydrochlorid, taxol, plimycin, aminoglutethimid, estramustin, flutamid, leuprolid, megestrolacetát, tamoxifen, testolakton, trilostan, amsacrin (m-AMSA), asparagináza (L-asparagináza), etoposid, interferon alfa-2alfa a 2beta, krevní deriváty, například hemoporphyriny nebo jejich deriváty, látky, modifikující biologickou odpověď, například muramylpeptidy, antifungální látky, například ketoconazol, nystatin, griseofulvin, flucytosin, miconazol nebo amfotericin B, hormony nebo analogy hormonů, jako jsou růstový hormon, hormon, stimulující melanocyty, estradiol, beclomethasondipropionát, betamethason, kortisonacetát, dexamethason, flunisolid, hydrokortison, methylprednisolon, paramethasonacetát, prednisolon, prednison, triamcinolon, nebo fludrokortisonacetát, vitamíny, jako kyanokobalamin nebo retionidy, enzymy, jako alkalická fosfatáze nebo dismutáza superoxidu manganu, antialergické látky, jako amalexanox, antikoagulační látky, jako warfarin, phenprocoumon nebo heparin, antithrombotické látky, látky pro léčení

poruch oběhu, jako propranolol, metabolické potenciátory, jako glutathion, antituberkulotika, jako kyselina p-amino-salicylová, isoniazid, capreomycinsulfát, cyklosexin, ethambutol, ethionamid, pyrazinamid, rifampin nebo streptomycinsulfát, protivirové látky, jako acyclovir, amantadin, azidothymidin, ribavirin nebo vidarabin, látky, rozšiřující cévy, jako diltiazem, nifedipin, verapamil, erythritoltetranitrát, isosorbiddinitrát, nitroglycerin nebo pentaerythritoltetranitrát, antibiotika, jako dapson, chloramfenokol, neomycin, cefaclor, cefadroxil, cephalixin, cephradine, erythromycin, clindamycin, lincomycin, amoxicillin, ampicillin, bacampicillin, karbenicillin, dicloxacillin, cyclacillin, picloxacillin, hetacillin, methicillin, nafcillin, penicillin nebo tetracyklin, látky s protizánětlivým účinkem, jako diflunisal, ibuprofen, indomethacin, meclizemine, kyselina mefenamová, naproxen, fenylbutazon, piroxicam, tolmetin, aspirin nebo salicyláty, látky s účinností proti prvokům, například chlorochin, metronidazol, chinin nebo megluminantimonát, látky s antirevmatickým účinkem, například penicillamin, narkotika, opiáty, jako kodein, morfin nebo opium, srdeční glykosidy, například deslanesid, digitoxin, digoxin, digitalin nebo digitalis, blokátory nervosvalového přenosu, jako atracuriummesylát, gallamintriethiodid, hecafluoreniumbromid, metocurinjodid, pancuroniumbromid, sukcynylcholinchlorid, tubokurarinchlorid nebo vecuroniumbromid, sedativa, jako amobarbital, sodná sůl amobarbitalu, aprobarbital, sodná sůl butobarbitalu, chloralhydrát, ethchlorvynol, ethinamát, flurazepamhydrochlorid, glutethimid, methotrimeprazinehydrochlorid, methyprylon, midazepamhydrochlorid, paraldehyd, pentobarbital, sodná sůl secobarbitalu, talbutal, temazepam nebo triazolam, místní anestetika, například bupivacain, chlorprocain, etidocain, lidocain, mepivacain, procain nebo tetracain, celková anestetika, například droperidol, etomidat, fentanylcitrat s propetidolem, ketaminhydrochlorid, sodná sůl methohexitalu nebo thiopental a

farmaceuticky přijatelné soli těchto látek, například adiční soli s kysleiny, jako hydrochloridy nebo hydrobromidy nebo soli s bazemi, například soli sodné, vápenaté nebo hořečnaté nebo deriváty těchto látek, například acetáty a také radiochemické látky, například beta-zářiče. Zvláštní význam mají antithrombotické sloučeniny, například látky, antagonizující vitamin K; hepatin a látky s heparinovým účinkem, například antithrombin III, dalteparin a enoxaparin, inhibitory shlukování krevních destiček, například ticlopirin, aspirin, dipyridamol, iloprost a abciximab a také thrombolytické enzymy, například streprokináza a aktivátor plasminogenu. Dalšími příklady mohou být genetické materiály, jako nukleové kyseliny, RNA a DNA přírodního nebo syntetického původu včetně rekombinantní RNA a DNA. Kódovou DNA pro určité bílkoviny je možno využít pro léčení řady různých onemocnění. Například v případě pokročilých zhoubných nádorů je možno použít faktor nekrosy nádoru nebo interleukin-2. K léčení nádorů vaječníku a mozkových nádorů je možno použít thymidinkinázu, k léčení neuroblastomu, zhoubného melanomu nebo nádoru ledvin je možno použít interleukin-2 a obecně k léčení nádorových onemocnění je možno použít interleukin-4.

Kombinace kontrastních prostředků podle vynálezu je možno využít také jako nosných prostředků pro zvýšení kontrastu pomocí určitých skupin pro zobrazování, odlišné od zobrazování ultrazvukem, například pomocí trg-záření, světla, magnetické rezonance a s výhodou scintigrafie. Řízeného růstu částic dispergovaného plynu je možno využít k uložení kontrastních prostředků do požadovaných tkání, například využitím působení ultrazvuku na cílový orgán k vyvolání růstu částic plynu a jejich dočasného zadržení pro zlepšení kontrastu, pak je možno vytvořit obraz na základě principu, odlišného od ultrazvuku.

Kontrastní prostředky podle vynálezu je také možno použít jako nosné prostředky pro účinné látky, které nemusí být nezbytně z prostředku uvolněny k dosažení léčebného účinku. Může jít například o radioaktivní látky, jako beta-zářiče, u nichž dochází k emisi záření po dočasném zadržení prostředku v cílové tkáni. Je zřejmé, že takové prostředky by s výhodou měly být konstruovány tak, aby nedocházelo ke smrštění bublinek s přerušením retence plynu, pokud není dosaženo požadované dávky záření.

Kontrastní prostředky podle vynálezu také mohou mít léčebný účinek jako takové. Je například možno uložit dispergovaný plyn do kapilár, které zásobují krví nádory a tak blokovat tyto kapiláry. Je tedy možno aplikovat ultrazvukovou energii místně k získání řízené lokalizované embolizace určitých cév. To může být důležité zejména v kombinaci s dalšími léčebnými zákroky. Koncentrace dispergovaného plynu v kapilárách může rovněž zvýšit absorpci ultrazvukové energie při hypertermní terapii. Toho je možno využít například v případě léčení nádorů jater. V takových případech se užívá záření s poměrně vysokou energií, například 5 W, zaměřené na určité místo, například ultrazvuku s frekvencí 1,5 MHz.

Je zřejmé, že do oboru vynálezu spadají prostředky, tvořené vodným nosným prostředím s dispergovaným plynem a prostředky, obsahující složku, schopnou difúze obecně i použití těchto prostředků pro jiné účely než pro zobrazování určitých tkání.

Praktické provedení vynálezu bude osvětleno následujícími příklady, které však nemají sloužit k omezení rozsahu vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1 - Přípravy

a) Disperze plynného perfluorbutanu

100 mg hydrogenovaného fosfatidylserinu ve 2% roztoku propylenglykolu ve 20 ml čištěné vody se zahřeje na 5 minut na teplotu 80 °C a výsledná disperze se nechá zchladnout přes noc na teplotu místnosti. Pak se podíly po 1 ml přene-

~~sou do lahvíček s objemem 2 ml a zbývajícím prostorem se pro-~~

pláchne perfluorbutanem, načež se lahvíčky protřepávají 45 sekund v mísícím zařízení pro zubolékařské účely, Espe CapMix^R, čímž vznikne mléčně bílá disperze mikrobublinek se středním objemovým průměrem 5,0 mikrometrů, měřeno zařízením Coulter Counter. Všechna měření zařízením Coulter Counter byla provedena při teplotě místnosti při použití přístroje s otvorem 50 mikrometrů a s rozsahem měření 1 až 30 mikrometrů, jako elektrolyt byl užit Isoton II.

b) Dispergování lyofilizované disperze plynného perfluorbutanu

Vzorek mléčně bílé disperze z příkladu 1a) byl 3x pro-
myt vždy s odstředěním vzorku a odstraněním infranatantu,
načež byl přidán stejný objem 10% roztoku sacharosy. Výsled-
ná disperze byla lyofilizována a pak znovu dispergována v
destilované vodě, čímž byla získána mléčně bílá disperze
mikrobublinek s objemovým středním průměrem 3,5 mikrometrů,
měřeno zařízením Coulter Counter.

c) Emulze 2-methylbutanu

100 mg hydrogenovaného fosfatidylserinu ve 20 ml čištěné vody se zahřeje na 5 minut na teplotu 80 °C a výsledná

disperze se chladí přes noc na 0°C . Pak se 1 ml disperze přenesse do nádoby s objemem 2 ml a s obsahem 200 mikrolitrů 2-methylbutanu s teplotou varu 28°C . Pak se lahvička 45 sekund protřepává při použití mísícího zařízení CapMix^R k získání emulze složky, schopné difuze, která se pak do použití uloží při teplotě 0°C . Střední objemový průměr emulgovaných kapiček byl 1,9 mikrometrů, měřeno přístrojem Coulter Counter.

d) ~~Emulze perfluorpentanu~~

Opakuje se postup podle příkladu lc) s tím rozdílem, že se 2-methylbutan nahradí perfluorpentanem s teplotou varu 29°C . Takto získaná emulze složky, schopné difuze se do použití uloží při teplotě 0°C .

e) Emulze 2-chlor-1,1,2-trifluorethyldifluormethyletheru

Opakuje se způsob podle příkladu lc) s tím rozdílem, že se 2-methylbutan nahradí 2-chlor-1,1,2-trifluorethyldifluormethyletherem s teplotou varu 55 až 57°C . Takto získaná emulze složky, schopné difuze byla do použití uložena při teplotě 0°C .

f) Emulze 2-brom-2-chlor-1,1,1-trifluorethanu

Opakuje se způsob podle příkladu lc) s tím rozdílem, že se 2-methylbutan nahradí 2-brom-2-chlor-1,1,1-trifluorethanem s teplotou varu 49°C . Takto získaná emulze složky, schopné difuze se až do použití uloží při teplotě 0°C .

- g) Emulze 1-chlor-2,2,2-trifluorethyldifluormethyletheru

Opakuje se způsob podle příkladu 1c) s tím rozdílem, že se 2-methylbutan nahradí 1-chlor-2,2,2-trifluorethyldifluormethyletherem s teplotou varu 49°C . Takto získaná emulze složky, schopné difuze se až do použití uloží při teplotě 0°C .

- h) Disperze polymeru s obsahem plynu/částic lidského sérového albuminu

Částice polymeru s obsahem plynu, opatřené povlakem lidského sérového albuminu a připravené z ethylidenbis(16-hydroxyhexadekanoátu) a adipoylchloridu způsobem podle příkladu 3a) přihlášky WO 96/07434 se v množství 100 mg rozruší v hmoždíři a disperguje v 10 ml 0,9% vodného roztoku chloridu sodného protřepáváním po dobu 24 hodin na laboratorním třepacím zařízení.

- i) Disperze polymeru s obsahem plynu/částic želatiny

100 mg částic polymeru s obsahem plynu, opatřených povlakem želatiny a připravených z ethylidenbis(16-hydroxyhexadekanoátu) a adipoylchloridu způsobem podle příkladu 3e) přihlášky WO 96/07434 se rozruší ve hmoždíři a disperguje v 10 ml 0,9% vodného roztoku chloridu sodného protřepáváním 24 hodin na laboratorním třepacím zařízení.

- j) Emulze 2-methylbutanu

Opakuje se postup podle příkladu 1c) s tím rozdílem, že se emulze 10x zředí před použitím a skladuje se v ledové lázni.

k) Emulze perfluorpentanu

Opakuje se způsob podle příkladu 1d) s tím rozdílem, že se emulze před použitím 10x zředí a skladuje se v ledové lázni.

l) Emulze perfluorpentanu

100 mg hydrogenovaného fosfatidylserinu ve 20 ml čištěné vody se zahřeje na 5 minut na teplotu 80 °C a vzniklá disperze se přes noc chladí na 0 °C. Podíl 1 ml disperze se přenese do lahvičky s objemem 2 ml s obsahem 100 mikrolitrů perfluor-n-pentanu s teplotou varu 29 °C. Pak se lahvička protřepává 75 sekund při použití zařízení CapMix^R za vzniku emulze složky, schopné difuze, která se do použití uloží při teplotě 0 °C. Objemový střední průměr kapiček emulze byl 2,9 mikrometrů, měřeno přístrojem Coulter Counter.

m) Emulze perfluorbutanu

Opakuje se způsob podle příkladu 1l) s tím rozdílem, že se perfluorpentan nahradí perfluorbutanem s teplotou varu -2 °C. Takto získaná emulze složky, schopné difuze se do použití uloží při teplotě 0 °C.

n) Emulze perfluorpentanu, připravené s použitím ultrazvuku

500 mg hydrogenovaného fosfatidylserinu ve 100 ml čištěné vody se zahřeje na 5 minut na 80 °C a výsledná disperze se chladí přes noc na teplotu místnosti. Pak se 10 ml disperze přenese do lahvičky s objemem 30 ml a s obsahem 1 ml perfluorpentanu. Vzniklá směs se 2 minuty zpracovává ultrazvukem za vzniku disperze složky, schopné difuze se středním průměrem kapiček menším než 1 mikrometr.

o) Emulze perfluorpentanu

Opakuje se způsob podle příkladu 11) s tím tozdílem, že se objem použitého perfluorpentanu sníží na 60 mikrolitrů. Takto připravená emulze složky, schopné difuze se do použití uloží při teplotě 0 °C.

p) Emulze perfluorpentanu

Opakuje se způsob podle příkladu 11) s tím tozdílem, že se objem použitého perfluorpentanu sníží na 20 mikrolitrů. Takto připravenou emulzi složky, schopné difuze se do použití uloží při teplotě 0 °C.

q) Emulze směsi perfluorpentanu a perfluor-4-methylpent-2-enu v poměru 1 : 1

Opakuje se způsob podle příkladu 11) s tím rozdílem, že se perfluorpentan nahradí směsí 50 mikrolitrů perfluorpentanu s teplotou varu 29 °C a 50 mikrolitrů perfluor-4-methylpent-2-enu s teplotou varu 49 °C. Takto připravená emulze složky, schopné difuze byla až do použití uložena při teplotě 0 °C. Střední objemový průměr kapiček emulze byl 2,8 mikrometrů, měřeno přístrojem Coulter Counter.

r) Emulze směsi perfluorpentanu a 1H,1H,2H-heptafluor-pent-1-enu v poměru 1 : 1

Opakuje se způsob podle příkladu 11) s tím rozdílem, že se perfluorpentan nahradí směsí 50 mikrolitrů perfluorpentanu s teplotou varu 29 °C a 50 mikrolitrů 1H,1H,2H-heptafluor-pent-1-enu s teplotou varu 30 až 31 °C. Takto připravená emulze složky, schopné difuze se až do použití uloží při teplotě 0 °C.

- s) Emulze perfluorpentanu, stabilizovaná směsí distearoyl-fosfatidylcholinu a distearoylfosfatidylserinu 1 : 1

Opakuje se způsob podle příkladu 11) s tím rozdílem, že se hydrogenovaný fosfatidylserin nahradí směsí 50 mg distearoylfosfatidylcholinu a 50 mg sodné soli distearoylfosfatidylserinu. Takto získaná emulze složky, schopné difuze se až do použití uloží při teplotě 0 °C.

- t) Emulze perfluorpentanu, stabilizovaná směsí distearoylfosfatidylcholinu a distearoylfosfatidylserinu v poměru 3 : 1

Opakuje se způsob podle příkladu 11) s tím rozdílem, že se hydrogenovaný fosfatidylserin nahradí směsí 75 mg distearoylfosfatidylcholinu a 25 mg sodné soli distearoylfosfatidylserinu. Takto získaná emulze složky, schopné difuze se až do použití uloží při teplotě 0 °C.

- u) Emulze perfluorpentanu, stabilizovaná směsí distearoyl-fosfatidylcholinu a distearoylfosfatidylglycerolu v poměru 3 : 1

Opakuje se způsob podle příkladu 11) s tím rozdílem, že se hydrogenovaný fosfatidylserin nahradí směsí 75 mg distearoylfosfatidylcholinu a 25 mg sodné soli distearoylfosfatidylglycerolu. Takto připravená emulze složky, schopné difuze se až do použití uloží při teplotě 0 °C.

- v) Emulze perfluorpentanu, stabilizovaná směsí hydrogenovaného fosfatidylcholinu a hydrogenovaného fosfatidylserinu v poměru 11 : 1

Opakuje se způsob podle příkladu 11) s tím rozdílem, že se hydrogenovaný fosfatidylserin nahradí 100 mg směsí

hydrogenovaného fosfatidylcholinu a hydrogenovaného fosfatidylserinu v poměru 11 : 1. Takto získaná emulze složky, schopné difuze se až do použití uloží při teplotě 0 °C.

- w) Emulze perfluor-4-methylpent-2-enu, stabilizované směsí distearoylfosfatidylcholinu a distearoylfosfatidylserinu v poměru 3 : 1

Opakuje se způsob podle příkladu 11) s tím tozdílem, že se hydrogenovaný fosfatidylserin nahradí směsí 75 mg di-stearoylfosfatidylcholinu a 25 mg sodné soli distearoylfos-
fatidylserinu a perfluorpentan se nahradí perfluor-4-methyl-
pent-2-enem. Takto získaná suspenze složky, schopné difuze se až do použití uloží při teplotě 0 °C.

- x) Emulze směsí perfluorpentanu a perfluor-4-methylpent-2-enu v poměru 1 : 1, stabilizovaná směsí distearoylfosfatidylcholinu a distearoylfosfatidylserinu 1 : 1

Opakuje se způsob podle příkladu 1w) s tím rozdílem, že se perfluor-4-methylpent-2-en nahradí směsí 50 mikrolitrů perfluoropentanu a 50 mikrolitrů perfluor-4-methylpent-2-enu. Takto získaná emulze složky, schopné difuze se až do použití uloží při teplotě 0 °C.

- y) Emulze směsi perfluorpentanu a perfluor-4-methylpent-2-enu v poměru 1 : 1, stabilizovaná směsí distearoyl-fosfatidylcholinu a distearoylfosfatidylglycerolu v poměru 3 : 1

Opakuje se způsob podle příkladu 1x) s tím rozdílem, že se sodná sůl distearoyl-fosfatidylserinu nahradí distearoyl-fosfatidylglycerolem ve formě sodné soli. Takto získaná emulze složky, schopné difuze se až do použití uloží při teplotě 0 °C.

z) Emulze směsi perfluordekalinu a perfluorbutanu

100 mg hydrogenovaného fosfatidylserinu ve 20 ml vodného roztoku s obsahem 5,11 % glycerolu a 1,5 % propylenglykolu se zahřeje na 5 minut na teplotu 80 °C a výsledná disperze se chladí přes noc na 0 °C. Pak se 1 ml této disperze přenese do lahvičky s objemem 2 ml, která obsahuje 100 mikrolitrů perfluordekalinu s teplotou varu 141 až 143 °C, nasyceného perfluorbutanem s teplotou varu -2 °C. Lahvička se 60 sekund protřepává při použití zařízení CapMix^R, čímž se získá emulze složky, schopné difuze, která se až do použití uloží při teplotě 0 °C.

aa) Emulze směsi perfluordekalinu a perfluorpropanu

Opakuje se způsob podle příkladu lz) s tím rozdílem, že se perfluordekalín, nasycený perfluorbutanem nahradí perfluordekalinem, nasyceným perfluorpropanem s teplotou varu -39 °C. Takto vytvořená emulze složky, schopné difuze se až do použití uloží při teplotě 0 °C.

ab) Emulze směsi perfluordekalinu a fluoridu sírového

Opakuje se způsob podle příkladu lz) s tím rozdílem, že se perfluordekalín, nasycený perfluorbutanem nahradí perfluordekalinem, nasyceným fluoridemsírovým s teplotou varu -64 °C. Takto připravená emulze složky, schopné difuze se až do použití uloží při teplotě 0 °C.

ac) Emulze perfluorpentanu, stabilizované prostředkem Fluorad FC-170C

1 ml disperze 200 mg prostředku Fluorad FC-170C ve 20 ml čištěné vody se přenese do lahvičky s objemem 2 ml,

obsahující 100 mikrolitrů perfluor-n-pentenu. Lahvička se pak protřepává 75 sekund při použití zařízení CapMix^R za vzniku emulze složky, schopné difuze, která se až do použití uloží při teplotě 0 °C.

ad) Emulze perfluorpentanu, stabilizovaná směsí prostředků Pluronic F68 a Fluorad FC-170C

100 mikrolitrů 10% roztoku Pluronic F68 se přidá ke 200 mikrolitrům 1% roztoků Fluorad FC170C a 700 mikrolitrům čištěné vody. Výsledná směs se přeneš do lahvičky s obsahem 2 ml, do níž se předem vloží 100 mikrolitrů perfluor-n-pentanu. Pak se lahvička protřepává 75 sekund při použití zařízení CapMix^R, čímž se získá emulze složky, schopné difuze, která se až do použití uloží při teplotě 0 °C. Vzorek této emulze se přeneš do lahvičky z plastické hmoty se šroubovacím uzávěrem s objemem 2,8 ml, lahvička se pak zpracovává 2 minuty ve vodní lázni ultrazvukem při použití jednoho pulzu za sekundu. Střední objemový průměr kapek emulze po zpracování ultrazvukem byl 0,99 mikrometrů při měření přístrojem Coulter Counter.

ae) Emulze perfluorpentanu, stabilizovaná směsí prostředků Pluronic F68 a Fluorad FC-170C, připravená homogenizací

1 ml 10% roztoku Pluronic F68 se přidá ke 2 ml 1% roztoku Fluorad FC170C a 7 ml čištěné vody, načež se ke směsi přidá 1 ml perfluor-n-pentanu. Takto připravená disperze se pak homogenizuje s použitím kombinace rotoru a statoru 2 minuty při 23 000 ot/min. Výsledná emulze se přeneš do lahvičky z plastické hmoty s objemem 10 ml, opatřené šroubovacím uzávěrem a zpracovává ultrazvukem ve vodní lázni 2 minuty při použití jednoho pulsu za sekundu.

af) Emulze perfluorpentanu

250 mg hydrogenovaného fosfatidylserinu ve 100 ml čištěné vody se 5 minut zahřívá na 80 °C a výsledná disperze se chladí přes noc na 0 °C. Pak se 1 ml disperze přenesse do lahvičky s objemem 2 ml a přidá se 100 mikrolitrů perfluorpentanu. Lahvička se 75 sekund protřepává při použití zařízení CapMix, čímž vznikne emulze složky, schopné difuze, která se až do použití uloží při 0 °C.

ag) Dispergování lyofilizované disperze plynného perfluorbutanu

Vzorek mléčně bílé disperze z příkladu la) se třikrát promyje vždy s odstředěním a odstraněním infranatantu a pak se přidá stejný objem 10% roztoku sacharosy. Výsledná disperze se lyofilizuje a pak se znovu disperguje v destilované vodě, čímž se získá mléčně bílá disperze mikrobublinek s objemovým středním průměrem 2,6 mikrometrů, měřeno pomocí zařízení Coulter Counter.

ah) Disperze plynného perfluorpropanu

Opakuje se způsob podle příkladu lh) s tím rozdílem, že se plynný perfluorbutan nahradí plynným perfluorpropanem. Výsledná mléčně bílá disperze mikrobublinek má střední objemový průměr bublinek 2,6 mikrometrů, měřeno pomocí zařízení Coulter Counter.

ai) Emulze perfluorpentanu

100 mg hydrogenovaného fosfatidylserinu ve 100 ml čištěné vody se 5 minut zahřívá na 80 °C a výsledná disperze se chladí přes noc na 0 °C. Pak se 1 ml disperze přenesse

do lahvičky s objemem 2 ml, načež se přidá 100 mikrolitrů perfluorpentanu. Lahvička se protřepává 75 sekund při použití přístroje CapMix, čímž vznikne emulze složky, schopné difuze, která se až do použití uloží při 0 °C.

- aj) Emulze perfluorpentanu, připravená protřepáváním a stabilizovaná směsí Brij 58 a Fluorad FC-170C

400 mg prostředku Brij 58 se přidá k 10 ml 0,1% roztoku Fluorad FC-170C a směs se 1 hodinu míchá při teplotě místnosti. Pak se 1 ml výsledného roztoku přenesé do lahvičky s objemem 2 ml, do níž se přidá 100 mikrolitrů perfluorpentanu. Lahvička se pak 75 sekund protřepává při použití přístroje CapMix, čímž se získá emulze složky, schopné difuze, která se až do použití uloží při 0 °C.

- ak) Emulze perfluorpentanu, připravená s použitím ultrazvuku a stabilizovaná směsí Brij 58 a Fluorad FC-170C.

400 mg prostředku Brij 58 se přidá k 10 ml 0,1% roztoku Fluorad FC-170C a směs se 1 hodinu míchá při teplotě místnosti. Pak se přidá 1 ml perfluorpentanu a výsledná směs se 2 minuty zpracovává ultrazvukem, čímž se získá emulze malých kapiček složky, schopné difuze. Tato emulze se až do použití uloží při 0 °C.

- al) Emulze perfluor-4-methylpent-2-enu

Opakuje se způsob podle příkladu 11) s tím rozdílem, že se perfluorpentan nahradí perfluor-4-methylpent-2-enem s teplotou varu 49 °C. Vzniklá emulze složky, schopné difuze se až do použití uloží při 0 °C.

am) Emulze 1H,1H,2H-heptafluorpent-1-enu

Opakuje se způsob podle příkladu 11) s tím rozdílem, že se perfluorpentan nahradí 1H,1H,2H-heptafluorpent-1-enem s teplotou varu 30 až 31 °C. Vzniklá emulze složky, schopné difuze se až do použití uloží při 0 °C.

an) Emulze perfluorcyklopentenu

Opakuje se způsob podle příkladu 11) s tím rozdílem, že se perfluorpentan nahradí perfluorcyklopentenem s teplotou varu 27 °C. Vzniklá emulze složky, schopné difuze se až do použití uloží při 0 °C.

ao) Emulze perfluordimethylcyklobutanu

Opakuje se způsob podle příkladu 11) s tím rozdílem, že se perfluorpentan nahradí perfluordimethylcyklobutanem (užije se směs 1,2- a 1,3-isomerů s teplotou varu 45 °C). Takto získaná emulze složky, schopné difuze se až do použití uloží při 0 °C.

ap) Emulze azeotropní směsi perfluorhexanu a n-pentanu

4,71 g, 0,014 mol perfluor-n-hexanu s teplotou varu 59 °C (Fluorochem Ltd.) a 0,89 g, 0,012 mol n-pentanu s teplotou varu 36 °C (Fluka AG) se smísí na azeotropní směs, která vře při teplotě 35 °C. V jiné halvičce se 100 mg hydrogenovaného fosfatidylserinu ve 20 ml čištěné vody zahřeje na 5 minut na 80 °C a výsledná disperze se zchladí na teplotu místnosti. Pak se 1 ml disperze fosfolipidu přenesse do lahvičky s objemem 2 ml, do níž se přidá 100 mikrolitrů azeotropní směsi. Pak se lahvička 45 sekund protřepává při použití přístroje CapMix za vzniku emulze složky, schopné difuze, která se až do použití uloží při 0 °C.

aq) Emulze perfluordimethylcyklobutanu

Opakuje se způsob podle příkladu 11) s tím rozdílem, že se perfluorpentan nahradí perfluordimethylcyklobutanem (s obsahem více než 97 % 1,1-isomeru, zbytek tvoří 1,2- a 1,3-isomery). Takto získaná emulze složky, schopné difuze se až do použití uloží při 0 °C.

ar) Emulze perfluorhexanu

Opakuje se způsob podle příkladu 11) s tím rozdílem, že se perfluorpentan nahradí perfluorhexanem s teplotou varu 57 °C. Takto získaná emulze složky, schopné difuze se až do použití uloží při 0 °C.

as) Emulze perfluordimethylcyklobutanu, stabilizovaná fluorovaným smáčedlem

Opakuje se způsob podle příkladu 1q) s tím rozdílem, že se hydrogenovaný fosfatidylserin nahradí perfluorovaným distearoylfosfatidylcholinu v množství 5 mg/ml nebo směsí perfluorovaného distearoylfosfatidylcholinu a hydrogenovaného fosfatidylserinu v poměru 3 : 1 při celkové koncentraci lipidů 5 mg/ml. Takto připravená emulze složky, schopné difuze se až do použití uloží při teplotě 0 °C.

at) Emulze 2,2,3,3,3-pentafluorpropylmethyletheru

Opakuje se způsob podle příkladu 11) s tím rozdílem, že se perfluorpentan nahradí 2,2,3,3,3-pentafluorpropylmethyletherem s teplotou varu 46 °C. Takto připravená emulze složky, schopné difuze se uloží až do použití při 0 °C.

au) Emulze 2H,3H-dekafluorpentanu.

Opakuje se způsob podle příkladu 11) s tím rozdílem, že se perfluorpentan nahradí 2H,3H-dekafluorpentan s teplotou varu 54°C . Takto připravená emulze složky, schopné difuze se až do použití uloží při 0°C .

av) Emulze perfluordimethylcyklobutanu, stabilizovaná lysofosfatidylcholinem

Opakuje se způsob podle příkladu 1aq) s tím rozdílem, že se hydrogenovaný fosfatidylserin nahradí lysofosfatidylcholinem. Takto připravené emulze složky, schopné difuze se až do použití uloží při 0°C .

aw) Emulze perfluordimethylcyklobutanu, stabilizovaná směsí hydrogenovaného fosfatidylserinu a lysofosfatidylcholinu v poměru 1 : 1

Opakuje se způsob podle příkladu 1aq) s tím rozdílem, že se hydrogenovaný fosfatidylserin nahradí směsí hydrogenovaného fosfatidylserinu a lysofosfatidylcholinu v poměru 1 : 1. Takto připravená emulze složky, schopné difuze se až do použití uloží při 0°C .

ax) Emulze perfluordimethylcyklobutanu, stabilizovaná smáčedlem na bazi polyethylenglykolu 10 000

Opakuje se způsob podle příkladu 1qa) s tím rozdílem, že se disperze hydrogenovaného fosfatidylserinu nahradí roztokem alfa-(hexadekanoyloxyhexadekanoyl)-omega-methoxypolyethylenglykolu 10 000 ve vodě v množství 10 mg/ml. Vzniklá emulze složky, schopné difuze se až do použití uloží při 0°C .

- ay) Emulze perfluordimethylcyklobutanu, stabilizovaná smáčedlem na bázi polyethylenglykolu 10 000

Opakuje se způsob podle příkladu laq) s tím rozdílem, že se disperze hydrogenovaného fosfatidylserinu nahradí roztokem alfa-(16-hexadekanoyloxyhexadekanoyl)omega-methoxypolyethylenglykolu 10 000 ve vodě v množství 20 mg/ml. Takto připravená emulze složky, schopné difuze se až do použití uloží při teplotě 0 °C.

- az) Mikrobublínky, plněné perfluorbutanem, zapouzdrěné fosfatidylserinem a RGDC-Mal-polyethylenglykol 2000-distearoylfosfatidylethanolaminem

Ke směsi 4,5 mg fosfatidylserinu a 0,5 mg Mal-polyethylenglykol 2000-distearoylfosfatidylethanolaminu v lahvičce se přidá 1 ml roztoku s obsahem 1,4 % propylenglykolu a 2,4 % glycerolu ve vodě. Disperze se zahřívá 5 minut na 80 °C, zchladí se na teplotu místnosti a propláchne plynným perfluorbutanem. Pak se lahvička protřepává 45 sekund při použití přístroje CapMix, načež se uloží na rotační třepačku. Po odstředění se infranatant nahradí roztokem RGDC v pufru s fosfátem sodným o pH 7,5, načež se lahvička opět uloží na několik hodin na rotační třepačku.

- ba) Mikrobublínky, plněné perfluorbutanem a zapouzdrěné fosfatidylserinem a dipalmitoylfosfatidylethanolamin-polyethylenglykolem 2000

Do lahvičky s obsahem fosfatidylserinu a dipalmitoylfosfatidylethanolaminpolyethylenglykolu 2000 v poměru 10 : 1 se přidá 2% roztok propylenglykolu ve vodě až do koncentrace lipidu 5 mg/ml. Disperze se 5 minut zahřívá na 80 °C a pak

se směs zchladí na teplotu místnosti a prázdný prostor v lahvičce se propláchne plynným perfluorbutanem. Lahvička se 45 sekund protřepává při použití přístroje CapMix a pak se uloží na rotační třepačku. Po promytí odstředěním a odstraněním infranatantu se přidá stejný objem vody s obsahem 10 % sacharosy. Výsledná disperze se lyofilizuje a v případě potřeby redisperguje přidáním vody za vzniku mléčně bílé disperze mikrobublinek.

- bb) Mikrobublinky, naplněné perfluorbutanem a zapouzdřené fosfatidylserinem a distearoylfosfatidylethanolaminpolyethylenglykolem 5000

Do lahvičky, obsahující směs fosfatidylserinu a distearoylfosfatidylethanolaminpolyethylenglykolu 5000 v poměru 10 : 1 se přidá 2% roztok propylenglykolu ve vodě až do koncentrace lipidu 5 mg/ml. Disperze se 5 minut zahřívá na 80 °C a pak se zchladí na teplotu místnosti, načež se prázdný prostor v lahvičce propláchne plynným perfluorbutanem. Lahvička se 45 sekund protřepává s použitím přístroje CapMix a pak se uloží na rotační třepačku. Po promytí odstředěním a odstranění infranatantu se přidá stejný objem vody s obsahem 10 % polyethylenglykolu. Výsledná disperze se lyofilizuje a v případě potřeby redisperguje, čímž se získá mléčně bílá disperze mikrobublinek.

- bc) Mikrobublinky, naplněné perfluorbutanem a zapouzdřené směsí fosfatidylserinu a dipalmitoylfosfatidylethanolaminpolyethylenglykolu 2000

Do lahvičky, obsahující směs fosfatidylserinu a dipalmitoylfosfatidylethanolaminpolyethylenglykolu 2000 v poměru 10 : 1 se přidá 2% roztok propylenglykolu ve vodě až do koncentrace lipidu 5 mg/ml. Disperze se 5 minut zahřívá

Opakuje se způsob podle příkladu 1a) s tím rozdílem, že se hydrogenovaný fosfatidylserin nahradí směsí hydrogenovaného fosfatidylserinu a distearylfosfatidylethanolamin-polyethylenglykolu 5000 v poměru 10 : 1. Takto připravená emulze složky, schopné difuze se až do použití uloží při 0 °C.

bg) Lyofilizované mikrobublínky, naplněné perfluorbutanem a redispergované v emulzi

Podíl mléčně bílé disperze, připravené podle příkladu 1b) se třikrát promyje odstředěním a odstraněním infranatan-tu, načež se přidá stejný objem 10% roztoku sacharosy. Výsledná disperze se lyofilizuje a pak se redisperguje těsně před použitím v emulzi, připravené způsobem podle příkladu 1a).

bh) Kapičky emulze avidinylovaného perfluordimethylcyklobutanu

4,5 mg distearylfosfatidylserinu a 0,5 mg biotindipalmitoylfosfatidylethanolaminu se uloží do čisté lahvičky a přidá se 1,0 ml 2% roztoku propylenglykolu. Směs se zahřeje na 80 °C a pak se zchladí na teplotu místnosti. Pak se přidá ještě 100 mikrolitrů perfluordimethylcyklobutanu a lahvička se 75 sekund protřepává v přístroji CapMix za vzniku emulze složky, schopné difuze. Zředěný vzorek 100 mikrolitrů emulze v 1 ml vody se inkubuje s přebytkem avidinu a uloží na rotační třepačku. Pak se emulze důkladně promyje vodou a zahustí odstředěním.

bi) Emulze 1H-tridekafluorhexanu

Opakuje se způsob podle příkladu 11) s tím rozdílem, že se perfluorpentan nahradí 1H-tridekafluorhexanem s teplotou varu 71 °C. Získaná emulze složky, schopné difuze se až do použití uloží při 0 °C.

bj) Emulze perfluorheptanu

Opakuje se způsob podle příkladu 11) s tím rozdílem, že se perfluorpentan nahradí perfluorheptanem s teplotou varu 80 až 85 °C. Takto získaná emulze složky, schopné difuze se až do použití uloží při 0 °C.

bk) Emulze perfluordimethylcyklobutanu s fosfatidylserinem a fluorescenčním streptavidinem

4,5 mg distearoylfosfatidylserinu a 0,5 mg biotindipalmitoylfosfatidyldiethanolaminu se uloží do čisté lahvičky a přidá se 1,0 ml 2% roztoku propylenglykolu. Směs se zahřeje na 80 °C a pak se zchladí na teplotu místnosti. Přidá se 100 mikrolitrů perfluordimethylcyklobutanu a lahvička se protřepává 75 sekund při použití zařízení CapMix za vzniku emulze složky, schopné difuze. Zředěný vzorek 100 mikrolitrů emulze v 1 ml vody se inkubuje s přebytkem fluorescenčního streptavidinu ve fosfátovém pufru a uloží se na rotační třepačce. Pak se zředěná emulze důkladně promyje vodou a zahustí se odstředěním.

bl) Dispergování lyofilizované disperze plynného perfluorbutanu

Vzorek mléčně bílé disperze, připravené podle příkladu 1a) se třikrát promyje odstředěním a odstraněním infranatanu a pak se přidá stejný objem 10% roztoku sacharosy. Výsledná disperze se lyofilizuje a těsně před použitím redisperguje v destilované vodě.

- bm) Emulze perfluordimethylcyklobutanu, stabilizovaná sterilizovaným fosfatidylserinem

Opakuje se způsob podle příkladu laq) s tím rozdílem, že se hydrogenovaný fosfatidylserin nahradí sterilizovaným roztokem hydrogenovaného fosfatidylserinu. Takto získaná emulze složky, schopné difuze se až do použití uloží při 0 °C.

- bn) Disperze plynného perfluorpropanu

Opakuje se způsob podle příkladu la) s tím rozdílem, že se plynný perfluorbutan nahradí plynným perfluorpropanem.

- bo) Dispergovaný prostředek Echovist

0,25 g. prostředku Echovist ve formě granulátu (Schering AG) se disperguje v 1,15 ml emulze, připravené způsobem podle příkladu laq).

- bp) Disperze plynného perfluorbutanu

500 mg hydrogenovaného fosfatidylserinu se přidá ke 100 ml roztoku 1,5 % propylenglykolu a 5,11 % glycerolu ve vodě a směs se 5 minut zahřívá na 80 °C, načež se nechá zchladnout na teplotu místnosti. Pak se podíly po 1 ml přenesou do lahvíček s objemem 2 ml, prázdné prostory lahvíček se propláchnou plynným perfluorbutanem, lahvíčky se protřepávají 45 sekund na přístroji CapMix a pak se uloží na rotační třepačku.

- bg) Příprava mikrobublinek, obsahujících biotinylovaný perfluorbutan

4,5 mg distearoylfosfatidylserinu a 0,5 mg biotin-dipalmitoylfosfatidylethanolaminu se uloží do čisté lahvičky a přidá se 1,0 ml roztoku s obsahem 1,4 % propylenglykolu a 2,4 % glycerolu. Směs se zahřeje na 78 °C, pak se zchladí na teplotu místnosti a prázdný prostor v lahvičce se propláchne perfluorbutanem. Lahvička se protřepává 45 sekund při použití přístroje CapMix a pak se uloží na 16 hodin na rotační třepačku. Výsledné bublinky se důkladně promyjí deionizovanou vodou.

br) Aerogely

Pyrolyzované částice aerogelu resorcinolu a formaldehydu (Dr. Pekala, Lawrence, Livermore National Laboratory) se smísí s 300 mikrolitry vody, jednou kapkou pufru o pH 9 a 5 až 10 kapkami 1% Pluronic F68. Částice aerogelu se rychle usazují, avšak nedochází k jejich shlukování.

bs) Malé bublinky

Pryžová trubice s vnitřním průměrem 8 mm a přibližnou délkou 20 cm se vertikálně uloží do stojanu, uzavřeném na spodním konci a naplní disperzí mikrobublinek z příkladu la) s tím rozdílem, že se k přípravě disperze mikrobublinek užije homogenizátor Ystral s rotorem a statorem. Po dvou hodinách se do spodní části pryžové trubice zavede injekční stříkačka, spojená s kanylou a odebere se 1 ml frakce mikrobublinek, frakcionovaných podle velikosti. Přístrojem Coulter Counter bylo prokázáno, že střední průměr mikrobublinek byl 1,2 mikrometru.

bt) Disperze plynného perfluorbutanu, stabilizovaná směsí 5% albuminu a 5% destrosy 1 : 3

20% lidské sérum se zředí až na koncentraci 5 % čištěnou vodou. Vzorek 5 ml zředěného albuminu se dále zředí 15 ml 5% glukózy a výsledná směs se přenesse do lahvičky. Prázdný prostor lahvičky se propláchne plynným perfluorbutanem a obsah lahvičky se 80 sekund zpracovává ultrazvukem, čímž se získá mléčně bílá disperze mikrobublinek.

bu) Disperze Buckminsterfullerenu C_{60}

Buckminsterfulleren C_{60} se přidá k 1 ml 2,5% lidského sérového albuminu v lahvičce s objemem 2 ml a lahvička se 75 sekund protřepává v přístroji CapMix.

by) Disperze plynného fluoridu sírového

Stabilizované mikrobublínky byly připraveny s použitím směsi distearoylfosfatidylcholinu a dipalmitoylfosfatidylglycerolu v poměru 10 : 1 způsobem podle příkladu 5 přihlášky WO 94/09829. Postupuje se tak, že se 50 mg distearoylfosfatidylcholinu, 5 mg dipalmitoylfosfatidylglycerolu a 2,2 g polyethylenglykolu 4000 rozpustí ve 22 ml terc.butanolu při teplotě 60 °C, načež se roztok rychle ochladí na -77 °C a přes noc se lyofilizuje. 100 g výsledného prášku se vloží do lahvičky, prázdný prostor se vyčerpá a pak naplní fluoridem sírovým. Těsně před použitím se přidá 1 ml čištěné vody za vzniku disperze mikrobublinek.

bw) Emulze 2-methylbutanu

100 mg hydrogenovaného fosfatidylserinu ve 20 ml čištěné vody se 5 minut zahřívá na 80 °C a výsledná disperze se přes noc chladí v lednici. Pak se 1 ml disperze přenesse do lahvičky s objemem 2 ml a přidá se 100 mikrolitrů 2-methylbutanu. Lahvička se 75 sekund protřepává při použití přístroje

CapMix za vzniku emulze složky, schopné difuze, která se až do použití uloží při 0 °C.

bx) Disperze lyofilizovaného plynného perfluorbutanu ve vodném hydrogenuhličitanu sodném

Vzorek mléčně bílé disperze, získané podle příkladu la) se třikrát promyje odstředěním a odstraněním infranatanu, načež se přidá stejný objem 10% roztoku sacharosy. Výsledná disperze se lyofilizuje a pak redisperguje v 0,1 M roztoku hydrogenuhličitanu sodného.

by) Disperze plynného perfluorbutanu

Disperze perfluorbutanu se připraví podle příkladu la). Disperze se třikrát promyje čištěnou vodou s odstředěním a odstraněním infranatanu, čímž se získá mléčně bílá disperze mikrobublinek.

bz) Disperze plynného perfluorbutanu s částicemi oxidu železitého

K 1 ml disperze plynného perfluorbutanu z příkladu lby) se přidá 1 ml čištěné vody. Hodnota pH se zvýší na 11,2 přidáním hydroxidu amonného a disperze se na 5 minut zahřeje na 60 °C. Přidá se 0,3 ml nepovlečených částic oxidu železitého, 4,8 mg Fe/ml a disperze se nechá stát 5 minut. Pak se pH upraví kyselinou chlorovodíkovou na 5,9, čímž vznikne hnědá disperze, která se v krátké době rozdělí na horní vrstvu s hnědými částicemi a čirou nezbarvenou spodní vrstvu, sraženina se nevytvoří.

- ca) Disperze plynného perfluorbutanu s částicemi oxidu železitého

K 1 ml disperze plynného perfluorbutanu podle příkladu lby) se přidá 0,3 ml nepovlečených částic oxidu železitého s obsahem 4,8 mg Fe/ml při pH 7, čímž se získá hnědá disperze, která se stáním dělí na horní vrstvu s hnědými mikrobublinkami, čirý infranatant, sraženina se netvoří.

- cb) Srovnávací příklad

K 1 ml roztoku hydrogenovaného fosfatidylserinu v čištěné vodě (obsah lipidu 5 mg/ml) se přidá 0,3 ml nepovlečených částic oxidu železitého (4 mg Fe/ml) za vzniku hnědé disperze, z níž se stáním vyloučí hnědá sraženina.

- cc) Disperze plynného perfluorbutanu s částicemi oxidu železitého, povlékanými kyselinou olejovou

0,259 g, 1,3 mmol $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ a 0,703 g, 2,6 mmol $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ se rozpustí v 10 ml čištěné vody a přidá se 1,5 ml hydroxidu amonného. Výsledné částice oxidu železa se pětkrát promyjí 25 ml čištěné vody. K částicím se přidá zředěný hydroxid amonný a suspenze se zahřeje na 80 °C. Přidá se 0,15 g kyseliny olejové a disperze se nechá stát 5 minut při teplotě místnosti. Pak se přidá 10 ml čištěné vody a pH se upraví na 5,4 kyselinou chlorovodíkovou. Disperze se 15 minut zpracovává působením ultrazvuku, načež se infranatant odstraní a částice se uvedou do suspenze v 5 ml 2-methylbutanu, čímž se získá černě zbarvená disperze.

25 mg distearoylfosfatidylcholinu a 2,5 mg dimyristoylfosfatidylglycerolu se rozpustí při teplotě 60 °C v 11 ml terc.butanolu a přidá se 0,1 ml svrchu získaných částic

oxidu železitého a 1,1 g polyethylneglykolu 4000. Disperze se 10 minut zahřívá na 60°C , načež se rychle zchladí na -77°C a lyofilizuje. Podíl 100 mg lyofilizovaného materiálu se vloží do lahvičky s objemem 2 ml, která se pak vyčerpá a dvakrát propláchne plynným perfluorbutanem. Lyofilizovaný materiál se pak disperguje v 1 ml čištěné vody a dvakrát se promyje čištěnou vodou odstředěním a odstraněním infranatanu a sraženiny. Stáním se disperze rozdělí na světle šedou spodní a plovoucí horní vrstvu.

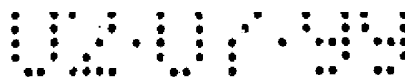
Příklad 2

Charakteristika růstu mikrobublinek in vitro při pozorování mikroskopem

a) Jedna kapka disperze plynného perfluorbutanu z příkladu 1a) se při teplotě 4°C zředí jednou kapkou čištěné vody, přesycené vzduchem, rovněž při teplotě přibližně 4°C na podložním skle mikroskopu, zchlazeném na 4°C a pak se disperze pozoruje při zvětšení 400x. Bylo pozorováno, že se velikost mikrobublinek mění v rozmezí 2 až 5 mikrometrů. Pak byla teplota zvýšena přibližně na 40°C , čímž bylo možno pozorovat podstatné zvětšení mikrobublinek, přičemž nejvíce se zvětšily největší bublinky. Po 5 minutách byl počet mikrobublinek podstatně snížen.

b) Srovnávací příklad

Jedna kapka emulze 2-methylbutanu z příkladu 1c), zchlazené v ledové lázni na přibližně 0°C byla uložena na podložní sklo mikroskopu, zchlazeném na 0°C a pozorována při zvětšení 400x. Bylo pozorováno, že kapičky olejové fáze měly velikost 2 až 6 mikrometrů. Po zvýšení teploty na 40°C nebylo možno pozorovat tvorbu žádných bublinek.



c) Vzorek 0,5 ml disperze perfluorbutanu z příkladu 1a) se zředí 50 ml čištěné vody a zchladí na 0 °C. Část 1 ml této zředěné disperze se smísí s podílem 100 mikrolitrů emulze 2-methylbutanu z příkladu 1c). Pak se jedna kapka výsledné směsi uloží na podložní sklo mikroskopu, udržované na 0 °C a překryje se krycím sklíčkem, rovněž zchlazeným na 0 °C. Teplota podložního skla se postupně zvýší na 40 °C. V průběhu zahřívání je možno pozorovat rychlé a podstatné zvětšování mikrobublinek, tento jev byl potvrzen měřením při použití zařízení Malvern Mastersizer.

d) Srovnávací příklad

Vzorek 0,5 ml disperze perfluorbutanu z příkladu 1a) se zředí 50 ml čištěné vody a zchladí v ledové lázni na 0 °C. Podíl 1 ml této zředěné disperze se smísí se 100 mikrolitry disperze hydrogenovaného fosfatidylserinu s obsahem 5 mg lipidu/ml čištěné vody, rovněž při 0 °C. Pak se jedna kapka směsi uloží na podložní sklo mikroskopu, zchlazené na 0 °C a pozoruje při zvětšení 400x. Mikrobublínky měly průměr 2 až 5 mikrometrů. Při zvýšení teploty na 40 °C bylo pozorováno zvýšení průměru mikrobublinek, bylo však méně výrazné a méně rychlé než v příkladu 2c).

e) Vzorek disperze perfluorbutanu z příkladu 1a) se zředí čištěnou vodou v poměru 1 : 1 a zchladí na 0 °C. Ke zředěné disperzi se na podložním skle mikroskopu, zchlazeném na 0 °C přidá jedna kapka emulze 2-chlor-1,1,2-trifluorethyl-difluormethyletheru z příkladu 1e) a překryje se krycím sklem, rovněž zchlazeným na 0 °C. Teplota podložního skla se postupně zvyšuje na 40 °C, přičemž je možno pozorovat rychlý a podstatný vzestup velikosti mikrobublinek.

f) Vzorek disperze perfluorbutanu z příkladu la) se zředí čištěnou vodou v poměru 1 : 1 a zchladí na 0 °C. Na podložním skle, udržovaném na 0 °C se přidá ke zředěné disperzi mikrobublinek jedna kapka emulze 2-brom-2-chlor-1,1,1-trifluorethanu z příkladu lf) a směs se překryje krycím sklem, rovněž s teplotou 0 °C. Teplota podložního skla se postupně zvyšuje na 40 °C, přičemž je možno pozorovat rychlé a podstatné zvětšení mikrobublinek.

g) Vzorek disperze perfluorbutanu z příkladu la) se zředí čištěnou vodou v poměru 1 : 1 a zchladí na 0 °C. Ke zředěné disperzi mikrobublinek se na podložním skle mikroskopu, udržovaném na 0 °C přidá jedna kapka emulze 1-chlor-2,2,2-trifluorethyldifluormethyletheru z příkladu lg) a směs se překryje krycím sklem rovněž s teplotou 0 °C. Teplota podložního skla se postupně zvyšuje na 40 °C, přičemž je možno pozorovat rychlé a podstatné zvětšení mikrobublinek.

h) Na podložní sklo mikroskopu, zahřáté na 50 °C se uloží jedna kapka disperze mikročástic polymeru a lidského sérového albuminu z příkladu lh) a jedna kapka emulze perfluorpentanu z příkladu lk) a mikrobublínky se pozorují při zvětšení 400x. Po smísení kapek lze pozorovat podstatné zvětšování mikrobublinek.

i) Na podložním skle mikroskopu, zahřáté na 40 °C se smísí jedna kapka disperze mikročástic polymeru a lidského sérového albuminu z příkladu lh) a jedna kapka emulze 2-methylbutanu z příkladu lj) a směs se pozoruje ve zvětšení 400x. Po smísení lze pozorovat významné a velmi rychlé zvětšování mikrobublinek.

j) Na podložní sklo mikroskopu, zahřáté na 50 °C se uloží jedna kapka disperze mikročástic polymeru a želatiny z příkladu

li) a jedna kapka emulze perfluoropentanu z příkladu lk) a směs se sleduje ve zvětšení 400x. Po smísení kapek je možno pozorovat podstatné zvětšení mikrobublinek.

k) Na podložním skle mikroskopu, zahřátém na 40 °C se smísí jedna kapka disperze mikročástic polymeru a želatiny z příkladu li) a jedna kapka emulze 2-methylbutanu z příkladu lj) a směs se pozoruje při zvětšení 400x. Po smísení lze pozorovat rychlé a podstatné zvětšení mikrobublinek.

l) Srovnávací příklad

Jedna kapka emulze perfluoropentanu z příkladu lk) se uloží na podložní sklo mikroskopu, zahřáté na 50 °C a sleduje se při zvětšení 400x. Není možno pozorovat mikrobublínky.

m) Srovnávací příklad

Jedna kapka emulze 2-methylbutanu z příkladu lj) se uloží na podložní sklo mikroskopu s teplotou 40 °C a sleduje se při zvětšení 400x. Mikrobublínky se nevytvoří.

n) Srovnávací příklad

Jedna kapka disperze mikročástic polymeru a lidského sérového albuminu z příkladu lh) se uloží na podložní sklo mikroskopu, zahřáté na 40 °C a sleduje se při zvětšení 400x. Není možno pozorovat žádnou změnu.

o) Srovnávací příklad

Jedna kapka disperze mikročástic polymeru a želatiny z příkladu li) se uloží na podložní sklo mikroskopu s teplotou

50 °C a sleduje se při zvětšení 400x. Není možno pozorovat žádnou změnu.

p) Jedna kapka disperze mikrobublinek vzduchu, stabilizovaných lidským sérovým albuminem podle US 4 718 433 a jedna kapka emulze 2-methylbutanu z příkladu 1j) se uloží na podložní sklo mikroskopu s teplotou 20 °C a směs se sleduje při zvětšení 400x. Po smísení je možno pozorovat podstatné zvětšení mikrobublinek.

q) Vzorek disperze perfluorbutanu z příkladu 1a) se zředí čištěnou vodou v poměru 1 : 1 a zchladí na 0 °C. Jedna kapka emulze směsi perfluordekalínu a perfluorbutanu z příkladu 1z) se k disperzi přidá na podložním skle mikroskopu s teplotou 0 °C a překryje se krycím sklem, rovněž s teplotou 0 °C. Pak se teploty podložního skla postupně zvýší na 40 °C. Je možno pozorovat rychlé a podstatné zvětšování mikrobublinek.

r) Vzorek disperze perfluorbutanu z příkladu 1a) se zředí čištěnou vodou v poměru 1 : 1 a zchladí na 0 °C. Ke zředěné disperzi se na podložním skle mikroskopu s teplotou 0 °C přidá jedna kapka emulze směsi perfluordekalínu a perfluorpropanu z příkladu 1aa) a směs se překryje krycím sklem, rovněž s teplotou 0 °C. Teplota podložního skla se postupně zvýší na 40 °C, přičemž je možno pozorovat rychlé a podstatné zvětšení mikrobublinek.

s) Vzorek disperze perfluorbutanu z příkladu 1a) se zředí čištěnou vodou v poměru 1 : 1 a zchladí na 0 °C. Jedna kapka emulze směsi perfluordekalínu a fluoridu sírového z příkladu 1ab) se ke zředěné disperzi přidá na podložním skle mikroskopu s teplotou 0 °C a směs se překryje krycím sklem, rovněž s teplotou 0 °C. Pak se teplota podložního skla postupně

zvýší na 40 °C, v průběhu zahřívání lze pozorovat po 4 až 5 minutách zvětšování bublinek, které je však méně podstatné a méně rychlé než v příkladech 2q) a 2r).

t) Vzorek disperze perfluorbutanu z příkladu la) se zředí čištěnou vodou v poměru 1 : 1 a zchladí na 0 °C. Ke zředěné disperzi mikrobublinek se na podložním skle mikroskopu s teplotou 0 °C přidá jedna kapka emulze perfluorpentanu z příkladu lad), stabilizované Pluronic F68 a směs se překryje krycím sklem s teplotou 0 °C. Pak se teplota podložního skla postupně zvyšuje na 40 °C, přičemž je možno pozorovat rychlý a podstatný růst mikrobublinek.

u) Jedna kapka disperze perfluorbutanu z příkladu la) a jedna kapka emulze perfluorpentanu, stabilizované směsí Brij 58 a Fluorad FC-170C z příkladu laj) se uloží na podložní sklo mikroskopu, zahřáté na 40 °C a směs se sleduje při zvětšení 400x. Po krátkém časovém intervalu je možno pozorovat pomalý růst mikrobublinek.

v) Jedna kapka disperze perfluorbutanu z příkladu la) a jedna kapka emulze perfluorpentanu, stabilizované směsí Brij 58 a Fluorad FC-170C z příkladu lak) se uloží na podložní sklo mikroskopu, zahřáté na 40 °C a směs se sleduje při zvětšení 400x. Po chvíli lze pozorovat růst mikrobublinek.

w) Jedna kapka disperze perfluorbutanu z příkladu la) a jedna kapka emulze perfluor-4-methylpent-2-enu z příkladu lal) se uloží na podložní sklo mikroskopu, zahřátého na 40 °C a směs se sleduje při zvětšení 400x. Po krátkém časovém intervalu lze pozorovat pomalý růst mikrobublinek.

x) Jedna kapka disperze perfluorbutanu z příkladu la) a jedna kapka emulze 1H, 1H, 2H-heptafluorpent-1-enu z příkladu

lam) se uloží na podložní sklo mikroskopu, zahřáté na 40 °C a směs se pozoruje při zvětšení 400x. Po smísení kapek je možno pozorovat významné a rychlé zvětšování mikrobublinek.

y) Jedna kapka disperze plynného perfluorbutanu z příkladu la) a jedna kapka emulze perfluorcyklopentanu z příkladu lan) se uloží na podložní sklo mikroskopu, zahřáté na 40 °C a směs se sleduje při zvětšení 400x. Po smísení kapek je možno pozorovat rychlé a významné zvětšování mikrobublinek.

z) 400 mikrolitrů disperze plynného perfluorbutanu z příkladu lb) se přenese do lahvičky s objemem 2 ml při teplotě místnosti a přidá se 100 mikrolitrů azeotropní emulze z příkladu lap). Jedna kapka směsi se pak uloží na podložní sklo mikroskopu, udržované na 20 °C. Pak se teplota podložního skla rychle zvýší na 37 °C. Bylo možno pozorovat významné a rychlé zvětšování mikrobublinek.

aa) Jedna kápka biotinylovaných mikrobublinek z příkladu lbq) se přidá k jedné kapce emulze z příkladu lbh) na podložním skle mikroskopu, zahřátém na 60 °C a směs se pozoruje při zvětšení 400x. Po smísení kapek je možno pozorovat významné zvětšení mikrobublinek a hromadění mikrobublinek na shlucích kapiček emulze.

ab) Mikrobublínky, připravené podle příkladu lbq) je možno analyzovat průtokovou cytometrií, například při použití emulze fluorescenčního streptavidinu, připravené podle příkladu lbk), čímž je možno prokázat vazbu streptavidinu na biotinylované mikrobublínky.

ac) Jedna kapka disperze prostředku Echovist, připravené podle příkladu lbo) se uloží na podložní sklo mikroskopu a udržuje na teplotě 37 °C. Vzorek se překryje krycím sklem

a pozoruje pod mikroskopem. Je možno pozorovat významný růst mikrobublinek.

ad) Jedna kapka disperze aerogelu z příkladu lbr) se uloží na podložní sklo mikroskopu a udržuje na teplotě 37°C . Vzorek se překryje krycím sklem a uloží pod mikroskop. Ke hraně podložního skla se přidá kapka emulze 2-methylbutanu (z příkladu lc) s tím rozdílem, že se užije 100 mikrolitrů 2-methylbutanu místo 200 mikrolitrů) tak, že emulze pronikne do disperze aerogelu. Při zvýšení teploty na přibližně 60°C dojde v částicích aerogelu ke vzniku mikrobublinek.

ae) srovnávací: Jedna kapka disperze aerogelu z příkladu lbr) se uloží na podložní sklo mikroskopu a udržuje na teplotě 20°C . Vzorek se překryje krycím sklem a pozoruje pod mikroskopem, přičemž teplota se zvýší na 60°C . Nebylo možno pozorovat tvorbu žádných mikrobublinek.

af) Jedna kapka disperze mikrobublinek z příkladu lbs) se uloží na podložní sklo mikroskopu. Vzorek se překryje krycím sklem a uloží do mikroskopu, přičemž teplota vzorku se udržuje na 20°C . Pak se k hraně krycího skla přidá jedna kapka emulze 2-methylbutanu z příkladu lc) tak, že emulze pronikne do disperze mikrobublinek. V průběhu mísení není možno pozorovat zvětšování mikrobublinek. Po zvýšení teploty na 40°C však dochází k významnému zvětšování mikrobublinek.

ag) srovnávací: Jedna kapka disperze mikrobublinek z příkladu lbs) se uloží na podložní sklo mikroskopu. Vzorek se překryje krycím sklem a uloží do mikroskopu, přičemž teplota vzorku se udržuje na 20°C . Po zvýšení teploty na 40°C není možno pozorovat žádné zvětšování mikrobublinek.

ah) Ke granulátu Echovist (Schering AG) na podložním skle mikroskopu se přidá jedna kapka rozpouštědla pro granulát

Echovist při teplotě místnosti. Pak se přidá ještě jedna kapka emulze 2-methylbutanu z příkladu lbw) a směs se pozoruje při zvětšení 100x. Po smísení kapek je možno pozorovat podstatné zvětšování mikrobublinek.

ai) Jedna kapka prostředku Levovist^R pro injekční podání a jedna kapka emulze 2-methylbutanu z příkladu lbw) se uloží na podložní sklo mikroskopu při teplotě místnosti a pozoruje se při zvětšení 400x. Po smísení kapek je možno pozorovat rychlé a významné zvětšování mikrobublinek.

aj) Jedna kapka disperze plynného perfluorbutanu z příkladu l br) a jedna kapka emulze 2-methylbutanu z příkladu lbw) se uloží na podložní sklo mikroskopu při teplotě místnosti a pozoruje se při zvětšení 400x. Po smísení kapek je možno pozorovat rychlé a významné zvětšování mikrobublinek.

ak) Jedna kapka emulze 2-methylbutanu z příkladu lby) se přidá k jedné kapce disperze Buckminsterfullerenu C_{60} z příkladu lbu) na podložním skle mikroskopu při teplotě 40 °C. Po smísení kapek dochází k významnému a rychlému zvětšování mikrobublinek.

al) Jedna kapka emulze 2-methylbutanu z příkladu lbw) se přidá k jedné kapce disperze plynného fluoridu sírového z příkladu lbv) na podložním skle mikroskopu při teplotě 40 °C. Po smísení kapek dojde k významnému a rychlému zvětšování mikrobublinek.

am) Jedna kapka 0,5 M kyseliny chlorovodíkové se přidá k jedné kapce disperze plynného perfluobutanu ve vodném roztoku hydrogenuhličitanu sodného z příkladu lbx) na podložním skle mikroskopu při teplotě místnosti. Po smísení kapek dojde k rychlému a významnému zvětšování mikrobublinek s krátkou životností.

an) Jedna kapka emulze 2-methylbutanu, připravené podle příkladu lbw) se přidá k jedné kapce disperze plynného perfluorbutanu s částicemi oxidu železa z příkladu lbz) na podložním skle mikroskopu při teplotě místnosti. Po smísení kapek je možno pozorovat rychlé a významné zvětšování mikrobublinek.

ao) Jedna kapka emulze 2-methylbutanu, připravené podle příkladu lbw) se přidá k jedné kapce disperze plynného perfluorbutanu s částicemi oxidu železitého z příkladu lca) na podložním skle mikroskopu při teplotě místnosti. Po smísení kapek dochází k rychlému a významnému zvětšení mikrobublinek.

ap) srovnávací: Jedna kapka emulze 2-methylbutanu z příkladu lbw) se přidá k jedné kapce disperze částic oxidu železa z příkladu lcb) na podložním skle mikroskopu při teplotě místnosti. Nevzniknou žádné mikrobublinky.

aq) Jedna kapka emulze 2-methylbutanu z příkladu lbw) se přidá k jedné kapce disperze plynného perfluorbutanu s částicemi oxidu železa, opatřenými povlakem kyseliny olejové z příkladu lcc) na podložním skle mikroskopu při teplotě místnosti. Po smísení kapek dochází k rychlému a významnému zvětšování mikrobublinek.

ar) 1 ml disperze mikrobublinek, připravené podle příkladu lbp) se zředí 50 ml vody. Pak se jedna kapka zředěné disperze přidá k jedné kapce sodové vody na podložním skle mikroskopu při teplotě místnosti. Po smísení kapek se možno pozorovat spontánní zvětšování mikrobublinek.

as) 0,4 mikrolitrů biotinylované disperze mikrobublinek, připravené podle příkladu lbq) a 0,02 ml emulze perfluordimethylcyklobutanu, připravené podle příkladu lbh) se postupně přidá do nádoby, obsahující 200 ml prostředku Isoton s

teplotou 37°C za kontinuálního míchání. Směs se inkubuje 20 sekund. Pak se nechá roztokem procházet po jednotlivých pulsech ultrazvuk (10 kHz frekvence, 100 mikroJ v každém pulsu) při trvalém průchodu 2,5 MHz roztokem, směs se pozoruje v ostrém postranním světle proti tmavému pozadí. V dráze paprsku je okamžitě možno pozorovat jasný pás větších bublinek.

at) Jedna kapka disperze mikrobublinek, připravené podle příkladu 1b1) se uloží na podložní sklo mikroskopu. Vzorek se překryje krycím sklem a uloží do mikroskopu, přičemž teplota se udržuje na 20°C . Pak se na hranu krycího skla přidá jedna kapka emulze perfluordimethylcyklobutanu, připravená podle příkladu 1a5) tak, aby emulze mohla proniknout do disperze mikrobublinek. Při zvyšování teploty na přibližně 60°C je možno pozorovat významné zvětšování mikrobublinek.

Příklad 3

Rozměr mikrobublinek in vitro a distribuce

a) Měření při použití přístroje Malvern Mastersizer

Růst mikrobublinek a změny v distribuci jejich velikosti po smísení se složkou, schopnou difuze se analyzuje pomocí přístroje Malvern Mastersizer 1002, opatřeného čočkou s průměrem 45 mm a rozsahem měření 0,1 až 80 mikrometrů. Komůrka přístroje obsahuje 150 ml prostředku Isoton II a je spojena s lázní termostatu s nastavitelnou teplotou v rozsahu 9 až 37°C . Do komůrky pro vzorek se vloží 110 mikrolitrů disperze plynného perfluorbutanu z příkladu 1a) a po dosažení rovnováhy se přidá podíl 500 mikrolitrů emulze 2-methylbutanu z příkladu 1c). Roztok Isotonu II se čerpá přístrojem Mastersizer s termostatickou lázní tak, aby

prošel měřicí buňkou každých 30 sekund. Toto opakované měření každých 30 sekund se provádí 3 minuty. Pak se teplota Isotonu II zvýší postupně na vyšší hodnoty a provádí se další měření. Za obdobných podmínek se odděleně analyzuje také disperze plynného perfluorbutanu a emulze 2-methylbutanu.

Analýza samotné disperze plynného perfluorbutanu ukázala, že při teplotě 9°C má 82 % mikrobublinek průměr menší než 9,9 mikrometrů. Tento podíl se snížil na 31 % při zvýšení teploty na 37°C . Tato teplotní změna byla doprovázena odpovídajícím zvýšením podílu mikrobublinek s průměrem 15 až 80 mikrometrů z 8 na 42 %.

Po smísení disperze plynného perfluorbutanu a emulze 2-methylbutanu při teplotě 9°C je možno pozorovat mírné zvýšení průměru mikrobublinek. Při zvýšení teploty na 25°C dochází k rychlému zvětšování mikrobublinek, takže přibližně 81 % mikrobublinek má průměr v rozmezí 15 až 80 mikrometrů. Další zvýšení teploty pak vede ke zvětšování mikrobublinek a na průměry, které se již nacházejí mimo rozsah měření použitého přístroje.

Smísení disperze plynného perfluorbutanu a emulze 2-methylbutanu při teplotě 37°C vede k rychlému zvětšování mikrobublinek. Po jednom měřicím cyklu po 30 sekundách mělo 97 % mikrobublinek průměr v rozmezí 15 až 80 mikrometrů.

b) Měření s použitím přístroje Coulter Multisizer

Zvětšování mikrobublinek a změny v distribuci jejich rozměru po smísení se složkou, schopnou difuze je možno analyzovat při použití přístroje Coulter Multisizer II, opatřeného otvorem s průměrem 50 mikrometrů a s rozsahem měření

1 až 30 mikrometrů. Obě složky každého vzorku se uloží do komůrky pro vzorek, obsahující 200 ml prostředku Isoton II, předehřátého na 37 °C a měření se provádějí při této teplotě. Distribuce průměru bublinek ve směsi se měří okamžitě a pak 1,5 minuty po vložení vzorku. Pak se na vzorek působí 1 minutu ultrazvukem při použití 2,25 MHz převaděče, spojeného s generátorem pulsů, použitá energie byla 100 mikroJ.

b)(i) Smísení disperze plynného perfluorbutanu z příkladu lag) a emulze perfluorbutanu z příkladu 11) vede k rychlému a podstatnému zvětšování mikrobublinek po expozici ultrazvuku. Celková objemová koncentrace se zvýšila z původních 3 % až na přibližně 16 %.

b)(ii) Smísení disperze plynného perfluorbutanu z příkladu lag) a emulze perfluorbutanu z příkladu 1m) vede k rychlému a významnému zvětšování mikrobublinek. Celková objemová koncentrace stoupla z jednoho procenta na přibližně 6 %.

b)(iii) Smísení disperze plynného perfluorbutanu z příkladu lag) a emulze perfluorpentanu z příkladu lp) vede k rychlému a podstatnému zvětšování mikrobublinek po působení ultrazvuku. Celková objemová koncentrace se zvýšila z původní hodnoty přibližně 1 % na přibližně 4 %.

b)(iv) Smísení disperze plynného perfluorbutanu z příkladu lag) a emulze perfluorpentanu z příkladu laf) vede k rychlému a významnému zvětšování mikrobublinek po působení ultrazvuku. Celková objemová koncentrace se zvýšila z hodnoty přibližně 2 % na přibližně 8 %.

b)(v) Smísení disperze plynného perfluorbutanu z příkladu lag) a emulze směsi perfluorpentanu a perfluor-4-methylpent-2-enu z příkladu lq) vede k rychlému a významnému zvětšení

mikrobublinek po působení ultrazvuku. Celková objemová koncentrace se zvýšila ze 2 % na přibližně 4 %.

b)(vi) Smísení disperze plynného perfluorbutanu z příkladu lag) a emulze směsi perfluorpentanu a 1H,1H,2H-heptafluor-pent-1-enu z příkladu lr) vede k rychlému a významnému zvětšení mikrobublinek. Celková objemová koncentrace se zvýšila ze 2 % na přibližně 4,5 %.

b)(vii) Smísení disperze plynného perfluorbutanu z příkladu lag) a emulze perfluorpentanu z příkladu ls) vede k rychlému a významnému zvětšování mikrobublinek po působení ultrazvuku. Celková objemová koncentrace se zvýší ze 2 % na přibližně 13 %.

b)(viii) Smísení disperze plynného perfluorbutanu z příkladu l ag) a emulze perfluorpentanu z příkladu lt) vede k rychlému a významnému růstu mikrobublinek po působení ultrazvuku. Celková objemová koncentrace mikrobublinek se zvýší ze 2 % na přibližně 13 %.

b)(ix) Smísení disperze plynného perfluorbutanu z příkladu lag) a emulze perfluorpentanu z příkladu lu) vede k rychlému a významnému růstu mikrobublinek po působení ultrazvuku. Celková objemová koncentrace mikrobublinek se zvýší ze 3 % na přibližně 15 %.

b)(x) Smísení disperze plynného perfluorbutanu z příkladu lag) a emulze perfluorpetanu z příkladu lv) vede k rychlému a významnému zvětšení mikrobublinek po působení ultrazvuku. Celková objemová koncentrace se zvýší ze 3 % na 22 %.

b)(xi) Smísení disperze plynného perfluorbutanu z příkladu lag) a emulze perfluorpentanu z příkladu lai) vede k rychlému a významnému zvětšení mikrobublinek po působení ultra-

zvuku. Celková objemová koncentrace mikrobublinek se zvýší ze 3 % na přibližně 8 %.

b)(xii) Smísení disperze plynného perfluorbutanu z příkladu lag) a emulze směsi perfluorpentanu a perfluor-4-methylpent-2-enu z příkladu lx) vede k rychlému a významnému zvětšení mikrobublinek po působení ultrazvuku. Celková objemová koncentrace se zvýší ze 2 % na přibližně 7,5 %.

b)(xiii) Smísení disperze plynného perfluorbutanu z příkladu lag) a směsi perfluorpentanu a perfluor-4-methylpent-2-enu z příkladu ly) vede k rychlému a významnému zvětšení mikrobublinek po působení ultrazvuku. Celková objemová koncentrace se zvýší ze 2,5 % na přibližně 7 %.

b)(xiv) Smísení disperze plynného perfluorbutanu z příkladu lag) a emulze perfluorpentanu z příkladu lac) vede k rychlému a významnému růstu mikrobublinek. Zvětšování mikrobublinek bylo rychlejší a významnější než jaké bylo pozorováno v příkladu 3b)(xv). Celková objemová koncentrace se zvýšila ze 3,5 % na přibližně 53 %.

b)(xv) Smísení disperze plynného perfluorbutanu z příkladu lag) a emulze perfluorpentanu z příkladu lae) vede k rychlému a významnému zvětšování mikrobublinek. Celková objemová koncentrace se zvýšila ze 7 % na přibližně 19 %. Při expozici ultrazvuku dojde k dalšímu zvětšování mikrobublinek, takže celková objemová koncentrace se zvýší na přibližně 54,5 %.

b)(xvi) Smísení disperze plynného perfluopropanu z příkladu lah) a emulze perfluorpentanu z příkladu ll) vede k rychlému zvětšení mikrobublinek, i když ne tak velkého jako v příkladu 3b)(i). Celková objemová koncentrace se zvýšila ze 3 % na přibližně 4,5 %.

b)(xvii) Smísení disperze plynného perfluorbutanu z příkladu 1ag) a emulze perfluorpentanu z příkladu 1o) vede k rychlému a významnému zvětšení mikrobublinek po působení ultrazvuku. Celková objemová koncentrace se zvýšila z 1 % na přibližně 8 %.

b)(xviii) Vzorek emulze perfluorhexanu, připravený podle příkladu 1ar) měl celkovou koncentraci kapek 8,6 % objemových při průměru kapek 2,6 mikrometrů.

b)(xix) Vzorek emulze 2,2,3,3,3-pentafluorpropylmethyletheru, připravený podle příkladu 1at) měl celkovou koncentraci kapek 4,3 % objemových a průměr kapek 1,5 mikrometrů.

b)(xx) Vzorek emulze 2H,3H-dekafluorpentanu, připravený podle příkladu 1au) měl celkovou koncentraci kapek 5,6 % objemových a průměr kapek 1,9 mikrometrů.

b)(xxi) Vzorek emulze perfluorheptanu, připravený podle příkladu 1bj) měl celkovou koncentraci kapek 8,5 % objemových a průměr kapek 2,2 mikrometru.

c) Měření s použitím přístroje Coulter Multisizer
(velikost otvoru 140 mikrometrů)

Zvětšování mikrobublinek a změny v distribuci jejich průměrů po smísení s emulzí složky, schopné difuze je možno analyzovat při použití přístroje Coulter Multisizer II, opatřeného otvorem velikosti 140 mikrometrů. Rozsah měření byl nastaven na 10 až 80 mikrometrů. Disperze bublinek a kapičky emulze byly uloženy do komůrky pro vzorek, obsahující 200 ml předeřátého Isotonu II. Měření byla prováděna při teplotě 37 °C. Pak byla měřena distribuce průměrů částic okamžitě a znovu po 3 minutách. Pak byl roztok vzorku vystaven působení

ultrazvuku na 1 minutu při použití 2,25 MHz převaděče, spojeného s generátorem pulsů, energie 100 mikroJ. 1 minutu a 3 minuty po působení ultrazvuku byla měřena distribuce průměrů částic směsi.

c)(i) Po přidání 182 mikrolitrů emulze heptafluorpent-1-enu, připravené podle příkladu lam) ke 400 mikrolitrům disperze plynného perfluorbutanu z příkladu lbl) došlo okamžitě ke zvětšení průměrů mikrobublinek a celková objemová koncentrace bublinek s průměrem 10 až 80 mikrometrů se zvýšila z nevýznamného podílu až na 60 % objemových v průběhu 1 minuty.

c)(ii) Po přidání 70 mikrolitrů emulze perfluordimethylcyklobutanu, připravené způsobem podle příkladu lav) ke 330 mikrolitrům disperze plynného perfluorbutanu, připravené způsobem podle příkladu lbl) došlo po působení ultrazvuku k podstatnému zvětšení mikrobublinek. Celková objemová koncentrace částic s průměrem 10 až 80 mikrometrů se zvýšila v průběhu 3 minut z nevýznamného podílu na 14 % objemových.

c)(iii) Po přidání 71 mikrolitrů emulze perfluordimethylcyklobutanu, připravené podle příkladu law) ke 330 mikrolitrům disperze plynného perfluorbutanu, připravené podle příkladu lbl) došlo k podstatnému zvýšení velikosti bublinek po působení ultrazvuku. Celková objemová koncentrace bublinek s průměrem 10 až 80 mikrometrů se zvýšila za 3 minuty od nevýznamného podílu na přibližně 8,6 % objemových.

c)(iv) Po přidání 105 mikrolitrů emulze perfluordimethylcyklobutanu, připravené podle příkladu lax) ke 300 mikrolitrům disperze plynného perfluorbutanu, připravené podle příkladu lbl) došlo po působení ultrazvuku ke zvětšení mikrobublinek. Celková objemová koncentrace bublinek s průměrem 10 až 80 mikrometrů se za 3 minuty zvýšila z 3,2 % objemových na přibližně 4,8 % objemových.

c)(v) Po přidání 105 mikrolitrů emulze perfluordimethylcyklobutanu, připravené způsobem podle příkladu la) ke 300 mikrolitrům disperze plynného perfluorbutanu, připravené podle příkladu lb1) došlo ke zvětšení průměru mikrobublinek po působení ultrazvuku. Celková objemová koncentrace bublinek s průměrem 10 až 80 mikrometrů se zvýšila z 1,5 % objemových v průběhu 3 minut na 2,2 % objemových.

c)(vi) Po redispergování lyofilizovaných mikrobublinek perfluorbutanu v emulzi perfluordimethylcyklobutanu způsobem podle příkladu lbg) došlo k okamžitému zvýšení průměru mikrobublinek. Celková objemová koncentrace mikrobublinek s průměrem 10 až 80 mikrometrů se zvýšila z nevýznamného podílu v průběhu 1 minuty až na 60 % objemových.

c)(vii) Po přidání 76 mikrolitrů emulze 1H-tridekafluorohexanu, připravené podle příkladu lb1) ke 400 mikrolitrům disperze plynného perfluorbutanu, připravené podle příkladu lb1) okamžitě došlo ke zvětšení objemu mikrobublinek a celková objemová koncentrace bublinek s průměrem 10 až 80 mikrometrů se zvýšila z nevýznamného podílu v průběhu 3 minut až na 20 % objemových.

c)(viii) Po přidání 63 mikrolitrů emulze perfluordimethylcyklobutanu, připravené způsobem podle příkladu lbm) k 741 mikrolitrům disperze plynného perfluorbutanu, připravené způsobem podle příkladu lb1) dojde k okamžitému zvýšení velikosti mikrobublinek, přičemž celková objemová koncentrace mikrobublinek s průměrem 10 až 80 mikrometrů se zvýší z nevýznamného podílu v průběhu 3 minut až na 2 % objemová.

c)(ix) Po přidání 67 mikrolitrů emulze perfluordimethylcyklobutanu, připravené způsobem podle příkladu laq) k 56 mikrolitrům disperze plynného perfluorpropanu, připravené

způsobem podle příkladu 1b) dojde po působení ultrazvuku ke zvětšení objemu mikrobublinek. Celková objemová koncentrace mikrobublinek s průměrem 10 až 80 mikrometrů se zvýšila z nevýznamného podílu v průběhu 1 minuty na 2,7 % objemových.

Příklad 4

Měření zeslabení akustického signálu in vitro

a) Vzorek 1 mikrolitr disperze plynného perfluorbutanu z příkladu 1a) se uvede do suspenze v 55 ml Isotonu II při teplotě 37 °C a měří se zeslabení akustického signálu v průběhu času při použití dvou převaděčů se střední frekvencí 3,5 MHz a 5,0 MHz při použití ultrazvukových pulsů. Po 20 sekundách se k suspenzi přidá složka, schopná difuze a měření se provádí ještě dalších 120 sekund.

a)(i) Po přidání 100 mikrolitrů emulze 2-methylbutanu podle příkladu 1c) okamžitě dojde ke zvýšenému zeslabení, které je více než čtyřnásobné. Přesné stanovení nebylo možné vzhledem k tomu, že zeslabení překročilo maximální hodnotu, měřitelnou použitým přístrojem. Tento účinek trval 50 sekund a byl doprovázen úplnou změnou tvaru spektra zeslabení, což je důkazem podstatného zvětšení objemu mikrobublinek.

a)(ii) Po přidání 20 mikrolitrů emulze 2-methylbutanu z příkladu 1c) dojde k postupnému zeslabení, které dosáhne maxima, které je trojnásobkem až čtyřnásobkem počáteční hodnoty po 40 sekundách, načež se zeslabení opět rychle vyrovnává. I v tomto případě dochází k úplné změně tvaru spektra zeslabení, což je průkazem podstatného zvětšení objemu mikrobublinek.

a)(iii) Po přidání 5 mikrolitrů emulze 2-methylbutanu z příkladu 1c) dojde k postupnému vzestupu zeslabení, které dosáhne po 30 sekundách maxima, 50 % původní hodnoty, načež opět pomalu odeznívá až do dosažení původní hodnoty. Současně dochází k posunu směrem k nižším frekvencím rezonance ve spektru pro zeslabení, což prokazuje mírné zvětšení velikosti mikrobublinek.

a)(iv) Po přidání 500 mikrolitrů emulze 2-chlor-1,1,2-trifluorethyldifluormethyletheru z příkladu 1e) dojde k postupnému vzestupu zeslabení, které dosáhne maxima přibližně 50 % původní hodnoty po 20 sekundách, načež se zeslabení opět vyrovnává až do dosažení původní hodnoty. Současně dojde k posunu směrem k nižším rezonančním frekvencím ve spektru pro zeslabení, což prokazuje mírné zvětšení mikrobublinek.

a)(v) Po přidání 500 mikrolitrů emulze perfluorpentanu podle příkladu 1d) dochází k mírnému vzestupu zeslabení. Posun směrem k nižším rezonančním frekvencím ve spektru pro zeslabení prokazuje malé zvětšení objemu mikrobublinek.

Při kontrolním pokusu nedošlo po přidání 500 mikrolitrů vody k žádné změně v zeslabení signálu.

b) Vzorek 100 mikrolitrů emulze 2-methylbutanu z příkladu 1c) se přidá k 55 ml prostředku Isoton II při teplotě 37 °C a měří se zeslabení akustického signálu stejným způsobem jako v příkladu 4a). Po 20 sekundách se k suspenzi přidá vzorek 1 mikrolitr disperze plynného perfluorbutanu z příkladu 1a) a měření se provádí ještě dalších 120 sekund. Dojde rychle k zesílení zeslabení akustického signálu, které dosáhne maximální naměřené hodnoty po 20 sekundách a po 50 sekundách se opět počne vyrovnávat. Spektrum zeslabení prokazuje přítomnost velkých mikrobublinek.

Při kontrolním pokusu, při němž bylo užito místo emulze 2-methylbutanu 100 mikrolitrů vody, došlo po přidání disperze plynu ke zvýšenému zeslabení signálu. Po 40 sekundách došlo k dosažení stálé hodnoty, která byla rovná čtvrtině hodnoty, naměřená s použitím emulze 2-methylbutanu. Na této úrovni zůstalo zeslabení celých 120 sekund měření. Spektrum pro zeslabení prokazovalo přítomnost malých bublinek.

Příklad 5

Zobrazování psího srdce in vivo při použití disperze
plynného perfluorbutanu (srovnávací příklad)

Byla připravena injekční stříkačka, obsahující množství disperze plynného perfluorbutanu z příkladu lb), odpovídající 2 mikrolitrům plynu a obsah byl vstříknut v otevřeném hrudníku psa s hmotností 20 kg při použití cévky, zavedené do žíly přední končetiny. Srdce bylo zobrazeno s použitím zařízení Vingmed CFM-750 s projekcí ve střední ose. Scanner byl nastaven tak, aby byl získán obraz na konci každého srdečního stahu propojením s ECG zvířete. V pravé komoře bylo možno několik sekund po injekci pozorovat jasný kontrast, po dalších 4 až 5 sekundách bylo možno pozorovat podobný kontrast v levé komoře, avšak s podstatným zeslabením, přechodně překrývajícím zadní částí srdce. Na základě získaných údajů byla provedena analýza intenzity odraženého ultrazvuku pomocí počítače. V reprezentativní oblasti přední části levé komory bylo možno pozorovat krátký, přechodný vrchol zesílení kontrastu, trvající přibližně 10 sekund a začínající 3 sekundy po zvýšení kontrastu.

Příklad 6

Zobrazení psího srdce in vivo při použití emulze 2-methylbutanu (srovnávací příklad)

Byla připravena injekční stříkačka, obsahující 1,0 ml emulze 2-methylbutanu z příkladu 1c) a obsah stříkačky byl zvířeti vstříknut stejným způsobem jako v příkladu 5. Také zobrazení srdce bylo provedeno stejným způsobem. Nebylo možno pozorovat žádné směny kontrastu.

Příklad 7

Zobrazení psího srdce in vivo při použití disperze plynného perfluorbutanu a emulze 2-methylbutanu

Stejně jako v příkladu 5 a 6 byly připraveny injekční stříkačky a obsah obou stříkaček byl současně zvířeti podán do cévky s použitím spojovacího kusu tvaru Y. Srdce bylo zobrazeno obdobným způsobem jako v příkladu 5. Došlo k zesílení kontrastu zobrazení srdečních komor obdobně jako v příkladu 5. V levé srdeční komoře bylo možno pozorovat stálý vzestup intenzity, který začínal 30 sekund po vstříknutí kontrastního prostředku do koronárního oběhu. Po 5 minutách došlo k úplnému vymizení tohoto účinku.

Příklad 8

Zobrazení psího srdce in vivo při použití emulze perfluor-pentanu (srovnávací příklad)

Byla připravena injekční stříkačka, obsahující 0,5 ml emulze perfluor-pentanu z příkladu 1d) a obsah byl zvířeti vstříknut stejným způsobem jako v příkladu 5. Také srdce bylo zobrazeno stejným způsobem jako v příkladu 5. V žádné části obrazu nebylo možno pozorovat zvýšení kontrastu.

Příklad 9

Zobrazení psího srdce in vivo při nízké intenzitě a při použití disperze plynného perfluorbutanu a emulze perfluorpentanu

Injekční stříkačky byly připraveny stejně jako v příkladech 5 a 8 a obsah obou stříkaček byl současně vstříknut v otevřeném hrudníku psu s hmotností 20 kg pomocí spojovacího kusu tvaru Y a cévky, zavedené do žíly přední končetiny. Zobrazení srdce bylo provedeno při použitém zařízení Vingmed CFM-750 při projekci s krátkou střední osou. Přístroj byl nastaven na minimální výstup akustické energie snížením této energie na hodnotu 1 na škále v rozsahu 0 až 7, obrazy byly získávány na konci každé systoly spojením s ECG zvířete. Pozorované zvýšení kontrastu bylo obdobné jako v příkladu 5 při mírně prodlouženém trvání.

Příklad 10

Zobrazení psího srdce in vivo při vysoké intenzitě a při použití disperze plynného perfluorbutanu a emulze perfluorpentanu

Opakuje se pokus z příkladu 9 s tím rozdílem, že se zvýší výstup energie až na nejvyšší možný výstup 7 na škále v rozsahu 0 až 7. Po podání injekce je možno pozorovat v obou srdečních komorách velké zvýšení kontrastu i jasnosti obrazu. Postupné zvýšení kontrastu obrazu je možno pozorovat ve všech oblastech srdečního svalu až do zvýšení, které se blíží maximální intenzivní bílé barvě na obrazovce. Trvání tohoto zvýšení kontrastu je přibližně 30 minut, načež se tento kontrast v průběhu 5 minut upravuje na původní hodnotu. Pokud jde o celkový krevní oběh, poklesne zvýšení kontrastu až na původní hodnotu do 5 minut po podání injekce a na obrazu je možno

jen obtížně rozeznat cévy, což kontrastuje s velmi dobrým zobrazením srdečního svalu. Kontrastní účinek v srdečním svalu není snížen ani v blízkosti převaděče přes kontinuální působení vysoké energie ultrazvuku.

Příklad 11

Zobrazení psího srdce in vivo při použití vysoké intenzity, disperze plynného perfluorbutanu a emulze perfluorpentanu

Byl opakován způsob podle příkladu 10 s tím rozdílem, že použitá emulze perfluorpentanu byla připravena zchlazením roztoku 200 mg polyethylenglykol 10 000, methylether-16-hexadekanoyloxyhexadekanoátu ve 20 ml vody (připraveného podle příkladu 2k) přihlášky WO-A-96/07434), přenesením podílu 1 ml tohoto roztoku do lahvičky s objemem 2 ml, přidáním 200 mikrolitrů perfluorpentanu, protřepáním lahvičky po dobu 45 sekund v přístroji CapMix a uložením emulze až do použití při teplotě 0 °C. Pozorované zesílení kontrastu v krevním oběhu a ve tkáni srdečního svalu bylo obdobné jako v příkladu 5.

Příklad 12

Zobrazení psí ledviny in vivo

Byly použity tytéž látky a tentýž způsob vstřikování jako v příkladu 9. Levá ledvina psa byla zobrazena přes neporušenou břišní stěnu při použití vysoké energie obdobným způsobem jako v příkladu 10. Obraz zahrnoval centrální strukturu ledviny s přívodními tepnami. 20 sekund po injekci bylo možno pozorovat zvyšování kontrastu v ledvinové tkáni, nejlepšího zobrazení bylo dosaženo po dalších 1 až 2 minutách. 4 minuty po injekci byl převaděč přemístěn k zobrazení.

pravé ledviny. Ze začátku měla ledvina normální vzhled bez zvýšení kontrastu. Avšak po aplikaci ultrazvuku s vysokou intenzitou došlo po několika minutách ke zvýraznění obrazu, i když nikoliv do úrovně, pozorované na levé ledvině.

Příklad 13

Zobrazení psího srdce in vivo při použití disperze plynného perfluorbutanu a sníženého množství emulze perfluorpentanu

Opakuje se způsob podle příkladu 10 s tím rozdílem, že se dávka emulze perfluorpentanu sníží na 1/3. Nejvyšší intenzita zesílení kontrastu v srdečním svalu byla srovnatelná s výsledkem z příkladu 10, avšak trvání tohoto jevu bylo zkráceno z 30 minut na méně než 10 minut.

Příklad 14

Zobrazení psího srdce in vivo při neporušeném hrudníku při použití disperze plynného perfluorbutanu a emulze perfluor-pentanu.

Způsob podle příkladu 10 byl opakován při uzavřeném neporušeném hrudníku. Výsledek byl srovnatelný s výsledkem, jehož bylo dosaženo v příkladu 10.

Příklad 15

Barevné zobrazení psího srdce in vivo podle Dopplera při použití disperze plynného perfluorbutanu a emulze perfluorpentanu

Byl opakován způsob podle příkladu 10 s tím rozdílem, že zařízení pro barevné zobrazování podle Dopplera bylo

použito v případě levé srdeční komory již v první minutě po injekci k vyvolání růstu mikrobublinek. Tímto způsobem bylo dosaženo v srdeční tkáni intenzivnějšího kontrastu než bylo možno pozorovat v příkladu 10.

Příklad 16

Zobrazení psího srdce in vivo při použití disperze plynného perfluorbutanu a emulze perfluor-4-methylpent-2-enu

0,5 ml isotonicky rekonstituované disperze plynného perfluorbutanu; připravené podle příkladu 1a) a 66 mikrolitrů emulze perfluor-4-methylpent-2-enu z příkladu 1a) se vstříkne způsobem podle příkladu 10. Výsledné zesílení kontrastu ve tkáni srdečního svalu bylo srovnatelné s výsledkem z příkladu 10, avšak trvalo 6 až 8 minut.

Příklad 17

Zobrazování hypermické oblasti psího srdce in vivo při použití disperze plynného perfluorbutanu a emulze perfluorpentanu

Větev koronární arterie circumflexa psa se dočasně podváže na 2 minuty a pak se vstříkne kontrastní prostředek jako v příkladu 10. Kontrastní zobrazení nyní překrvené oblasti srdečního svalu bylo podstatně intenzivnější než zobrazení normální okolní tkáně.

Příklad 18

Zobrazení psiho srdce in vivo při použití disperze plynného perfluorbutanu a emulze perfluordimethylcyklobutanu

0,5 ml isotonicky rekonstituované disperze plynného perfluorbutanu, připravené podle příkladu 1a) a 66 mikrolitrů emulze perfluordimethylcyklobutanu z příkladu 1a) se užije stejně jako v příkladu 10. Výsledný intenzivní kontrast ve tkáni srdečního svalu je srovnatelný s výsledkem z příkladu 16.

Příklad 19

Zobrazení psiho srdce in vivo při použití disperze plynného perfluorbutanu a emulze perfluordimethylcyklobutanu

0,6 ml isotonicky rekonstituované disperze plynného perfluorbutanu z příkladu 1b1) a 66 mikrolitrů emulze perfluordimethylcyklobutanu z příkladu 1a) se vstříkne stejně jako v příkladu 10. Výsledné značné zvýšení kontrastu srdeční tkáně je srovnatelné s výsledkem z příkladu 16.

Příklad 20

Zacílení částic in vivo

0,02 mikrolitrů/kg avidinylovaných mikrobublinek perfluorbutanu z příkladu 1bq) a 0,02 mikrolitrů/kg emulze perfluordimethylcyklobutanu z příkladu 1bh) se současně nitrožilně vstříkne anestetizovanému psu s hmotností 20 kg a srdce se zobrazí podle příkladu 10. Zesílení kontrastu je obdobné jako v příkladu 10 s tím rozdílem, že vrchol kontrastu pro levou komoru je méně vyjádřen.

Příklad 21

Zobrazení králičího srdce in vivo při použití disperze plynného perfluorbutanu a emulze perfluordimethylcyklobutanu

Připraví se injekční stříkačka s obsahem disperze mikrobublinek perfluorbutanu se středním objemovým průměrem 3,0 mikrometrů podle příkladu 1b1), množství odpovídá 1 mikrolitru obsaženého plynu, dále se připraví injekční stříkačka s obsahem 105 mikrolitrů emulze perfluordimethylcyklobutanu z příkladu 1a9). Obsah obou stříkaček se současně vstříkne králíkovi s hmotností 5 kg při použití cévky, zavedené do ušní žíly. Zobrazení srdce bylo provedeno při použití přístroje ATL HDI-3000 se sondou P5-3 při otevřeném hrudníku a parasternální projekcí krátké osy. Výsledek je srovnatelný s výsledkem z příkladu 18.

Příklad 22

Podávání účinných látek s použitím ultrazvuku

Anestetizovanému králíkovi New Zealand Black s hmotností 3 kg se nitrožilně podá 0,04 ml emulze perfluordimethylcyklobutanu podle příkladu 1a9) a současně se podá 0,12 ml suspenze plynného perfluorbutanu z příkladu 1b1) a levá ledvina se zobrazí přístrojem ATL HDI-3000 se sondou P5-3 při nastavení na maximální energii. Bylo možno pozorovat významné zvětšení bublinek a jejich nahromadění v ledvině. Pak bylo 160 mg FITC-dextranu s molekulovou hmotností 2 000 000 rozpuštěna v 5 ml vody a podáno nitrožilně a zobrazování ultrazvukem bylo prováděno ještě 5 minut při nastavení podle Dopplera k dosažení maximálního akustického výstupu. Pak bylo zvíře usmrceno a ledviny byly sledovány v ultrafialovém světle. Zvýšená fluorescence byla pozorována v levé ledvině

jako skvrny s průměrem 50 až 100 mikrometrů ve vazivové tkáni v oblastech, které byly vystaveny ultrazvuku. Se skvrnami byly vždy spojeny nefrony, prosté fluorescence v cévách.

Příklad 23

Albunex^R jako disperze plynu

0,3 ml/kg prostředku Albunex a 1,5 mikrolitrů/kg emulze perfluordimethylcyklobutanu podle příkladu 1a) se vstříkne nitrožilně anestetizovanému psímu samci s hmotností 20 kg a zobrazení se provede stejně jako v příkladu 10. Zesílení kontrastu je obdobné jako v příkladu 10.

Příklad 24

Zacílené mikrobublínky při zobrazení králičího srdce.

0,1 mikrolitrů/kg mikrobublinek z příkladu 1a) se vstříkne nitrožilně králíkovi a současně se pomocí ultrazvuku zobrazuje srdce přístrojem ATL HDI-3000 se sondou P5-3. Bylo možno pozorovat malé, avšak dlouhotrvající zesílení kontrastu. Po 3 minutách bylo vstříknuto ještě 1,5 mikrolitrů/kg emulze perfluordimethylcyklobutanu z příkladu 1a). Bylo možno pozorovat mírný vzestup kontrastu.

Příklad 25

Zobrazení krysího srdce in vivo při použití disperze plynného perfluorbutanu a emulze perfluordimethylcyklobutanu

Byl opakován pokus z příkladu 19 na krysách se srovnatelnými výsledky.

Příklad 26

Zobrazení psího srdce in vivo při použití disperze plynného perfluorbutanu a emulze perfluorhexanu

0,1 mikrolitrů/kg emulze perfluorhexanu z příkladu 1ar) a 0,2 mikrolitrů/kg suspenze mikrobublinek perfluorbutanu z příkladu 1bl) se současně vstříkne psovi stejně jako v příkladu 10. Výsledek je srovnatelný s výsledkem z příkladu 10.

Příklad 27

Zobrazení psího srdce in vivo při použití disperze plynného perfluorbutanu a emulze heptafluorpent-1-enu

0,3 mikrolitrů/kg suspenze mikrobublinek perfluorbutanu podle příkladu 1bl) a 0,15 ml emulze heptafluorpent-1-enu z příkladu 1am) se současně vstříkne psovi jako v příkladu 10. Je možno pozorovat mírné zvýšení kontrastu, které je však větší a trvá delší dobu než v příkladu 5.

Příklad 28

Zobrazení psího srdce in vivo při použití disperze plenného perfluorbutanu a emulze perfluordimethylcyklobutanu, stabilizované sterilizovaným fosfolipidem

0,3 mikrolitrů/kg suspenze mikrobublinek perfluorbutanu z příkladu 1bl) a 0,3 mikrolitrů/kg emulze perfluordimethylcyklobutanu z příkladu 1bm) se současně vstříkne psovi stejně jako v příkladu 19. Výsledek je srovnatelný s výsledkem z příkladu 19.

Příklad 29

Zobrazení psího srdce in vivo při použití disperze plynného perfluorpropanu a emulze perfluordimethylcyklobutanu

0,17 ml suspenze mikrobublinek perfluorpropanu z příkladu 1b) a 0,3 mikrolitrů/kg emulze perfluordimethylcyklobutanu z příkladu 1a) se současně vstříkne psovi podle příkladu 19. Výsledek je srovnatelný s výsledkem z příkladu 19.

Příklad 30

Zobrazení zažívacího systému psa in vivo při použití plynného perfluorbutanu a emulze perfluordimethylcyklobutanu

20 ml emulze perfluordimethylcyklobutanu podle příkladu 1a) se podá žaludeční sondou anestetizovanému psu. Pak se podá malé množství 0,1 až 0,2 mikrolitrů plynu/kg disperze mikrobublinek perfluorbutanu z příkladu 1a) nitrožilně. Převaděč pro zobrazení se uloží na břišní stěnu, lokalizované zvětšení mikrobublinek v kapilárním systému stěny žaludku zajistí zvýšený kontrast a jasnější obrysy sliznice.

Příklad 31

Zobrazení zažívacího systému psa in vivo při použití disperze plynného perfluorbutanu a emulze perfluordimethylcyklobutanu

Disperze mikrobublinek perfluorbutanu z příkladu 1a) se podá žaludeční sondou anestetizovanému psu a nechá se rovnoměrně rozptýlit v žaludku, což se ověří zobrazením ultrazvukem. Malé množství emulze perfluordimethylcyklobutanu podle příkladu 1a) v množství 0,2 až 1 mikrolitr perfluorovaného uhlovodíku/kg se podá nitrožilně. Převaděč

se uloží na zobrazovanou oblast; zvětšení mikrobublinek v žaludeční šťávě v blízkosti sliznice zajistí zvýšení kontrastu obrysů sliznice.

Příklad 32

Zobrazení psího srdce in vivo při použití disperze plynného perfluorbutanu a emulze perfluordimethylcyklobutanu, podané současně s adenosinem

Okludující svorka se uloží na hlavní větev levé přední sestupné koronární tepny při otevřeném hrudníku psa s hmotností 22 kg a za uzávěr se uloží průtokoměr, který se upraví k dosažení 25% snížení průtoku (14 až 10 ml/min). Pak se současně nitrožilně podá obsah tří stříkaček, i) disperze mikrobublinek perfluorbutanu z příkladu 1b1) s obsahem 4,4 mikrolitrů plynu, ii) emulze perfluordimethylcyklobutanu z příkladu 1a9) s obsahem 33 mikrolitrů dispergované perfluordimethylcyklobutanové fáze a iii) 3,0 mg adenosinu, rozpuštěného v 0,9% roztoku chloridu sodného. Po 10 sekundách se pomalu v průběhu 20 sekund vstříkne ještě 3,0 mg adenosinu, rozpuštěného v 0,9% roztoku chloridu sodného. Levá komora srdeční se zobrazí při použití přístroje ATL HDI-3000 se sondou P5-3, ultrazvuk s maximální energií se nechá procházet 1 minutu k vyvolání růstu mikrobublinek a pak se srdeční sval zobrazí běžným způsobem. Je možno pozorovat zřejmý rozdíl mezi oblastmi, zásobenými zúženými tepnami (oblasti jsou o něco jasnější než šedé základní pozadí) a normálními oblastmi, které jsou daleko jasnější než základní pozadí.

Zastupuje:

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Směsný prostředek pro použití jako kontrastní činidlo současně, odděleně nebo postupně při zobrazování ultrazvukem, v y z n a č u j í c í s e t í m , že je tvořen

- i) injekčním vodným prostředím, v němž je dispergován plyn,
- ii) prostředkem, obsahujícím složku, schopnou difuze in vivo do dispergovaného plynu za alespoň přechodného zvětšení jeho objemu.

2. Směsný prostředek podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jako dispergováný plyn obsahuje vzduch, dusík, kyslík, oxid uhličitý, vodík, inertní plyn, fluorid sírový, fluorid selenový, silan, případně halogenovaný, uhlovodík s nízkou molekulovou hmotností, keton, ester, halogenovaný uhlovodík s nízkou molekulovou hmotností nebo směs kteréhokoliv z uvedených plynů.

3. Směsný prostředek podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m , že plyn obsahuje perfluorovaný keton, perfluorovaný ether nebo perfluorovaný uhlovodík.

4. Směsný prostředek podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jako perfluorovaný uhlovodík obsahuje perfluoralkan, perfluoalken nebo perfluorcykloalkan.

5. Směsný prostředek podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jako plyn obsahuje fluorid sírový, perfluorpropan, perfluorbutan nebo perfluorpentan.

6. Směsný prostředek podle některého z nároků 1 až 5, v y z n a č u j í c í s e t í m , že dispergováný plyn

je stabilizován povrchovou membránou, odolnou proti spojování bublinek, bílkovinou, tvořící film, polymerním materiálem, nepolymerním a nepolymerovatelným materiálem, vytvářejícím stěny nebo smáčedlem.

7. Směsný prostředek podle nároku 6, v y z n a č u - j í c í s e t í m , že smáčedlo je tvořeno nejméně jedním fosfolipidem.

8. Směsný prostředek podle nároku 7, v y z n a č u - j í c í s e t í m , že nejméně 75 % smáčedla je tvořeno molekulami fosfolipidu, nesoucími náboj.

9. Směsný prostředek podle nároku 8, v y z n a č u - j í c í s e t í m , že nejméně 75 % smáčedla, tvořícího film je tvořeno jedním nebo větším počtem fosfolipidů ze skupiny fosfatidylseriny, fosfatidylglyceroly, fosfatidyl-inositolu, fosfatidové kyseliny a kardiolipiny.

10. Směsný prostředek podle nároku 9, v y z n a č u - j í c í s e t í m , že nejméně 80 % fosfolipidů je tvořeno fosfatidylserinu.

11. Směsný prostředek podle některého z nároků 1 až 10, v y z n a č u j í c í s e t í m , že prostředek, schopný difuze je zpracován pro podkožní, kožní, nitrosvalové, nitrožilní podání nebo podání inhalací.

12. Směsný prostředek podle některého z nároků 1 až 10, v y z n a č u j í c í s e t í m , že prostředek s obsahem složky schopné difuze dále obsahuje kapalný nosič.

13. Směsný prostředek podle nároku 12, v y z n a č u - j í c í s e t í m , že složka, schopná difuze je dispergo-

vána ve vodném kapalném nosiči ve formě emulze nebo mikroemulze typu olej ve vodě.

14. Směsný prostředek podle nároku 13, v y z n a -
č u j í c í s e t í m, že složka, schopná difuze je tvo-
řena alifatickým etherem, polycyklickým olejem, polycyklic-
kým alkoholem, heterocyklickou sloučeninou, alifatickým uhlo-
vodíkem, cykloalifatickým uhlovodíkem nebo halogenovaným
uhlovodíkem s nízkou molekulovou hmotností.

15. Směsný prostředek podle nároku 14, v y z n a -
č u j í c í s e t í m, že složka, schopná difuze je tvo-
řena perfluorovaným uhlovodíkem.

16. Směsný prostředek podle nároku 15, v y z n a -
č u j í c í s e t í m, že jako perfluorovaný uhlovodík
obsahuje perfluoralkan, perfluoralken, perfluorocykloalkan,
perfluorocykloalken nebo perfluorovaný alkohol.

17. Směsný prostředek podle nároku 16, v y z n a -
č u j í c í s e t í m, že složka, schopná difuze je tvo-
řena perfluorpentanem, perfluorhexanem nebo perfluordimethyl-
cyklobutanem.

18. Směsný prostředek podle některého z nároků 13 až
17, v y z n a č u j í c í s e t í m, že emulze je stabi-
lizována fosfolipidovým smáčedlem.

19. Směsný prostředek podle nároku 18, v y z n a -
č u j í c í s e t í m, že nejméně 75 % fosfolipidového
smáčedla je tvořeno molekulami, nesoucími náboj.

20. Směsný prostředek podle nároku 19, v y z n a -
č u j í c í s e t í m, že nejméně 75 % fosfolipidového
smáčedla se volí ze skupiny fosfatidylseriny, fosfatidyl-

glyceroly, fosfatidylinositoly, fosfatidové kyseliny a kardiolipiny.

21. Směsný prostředek podle nároku 20, v y z n a -
č u j í c í s e t í m , že nejméně 80 % fosfolipidového
smáčedla je tvořeno fosfatidylseriny.

22. Směsný prostředek podle nároků 1 až 21, v y -
z n a č u j í c í s e t í m , že dále obsahuje léčivo.

23. Směsný prostředek podle některého z nároků 1 až
21, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje látky,
zvyšující kontrast při zobrazování, odlišném od zobrazování
ultrazvukem.

Zastupuje: