ČESKÁ REPUBLIKA

(19)

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

# ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(21) 2370-95

(13) A3

6(51) A 61 K 49/00

(22) 16.03.94

(32) 16.03.93

(31) 93/9305349

(33) GB

(40) 13.03.96

(71) NYCOMED IMAGING A. S., Oslo, NO;

(72) Berg Arne, Sandvika, NO;
Dugstad Harald, Oslo, NO;
Foss Per Antonius, Oslo, NO;
Klaveness Jo, Oslo, NO;
Ostensen Jonny, Oslo, NO;
Rongved Pal, Nesoddtangen, NO;
Sirande Per, Oslo, NO;

## (54) Ultrazvukový kontrastní prostředek, způsob jeho výroby a použití

(57) Emulze oleje ve vodě, jejichž olejová fáze obsahuje kondenzovaný nebo rozpuštěný, v oleji rozpustný plyn či tekutinu nebo prekursor plynu, jsou použitelné jako ultrazvuková kontrastní činidla. Takové výrobky obsahují nevýznamná množství bublin nebo mikrobublinek volného plynu ve formě, určené ke skladování a vykazují při skladování dobrou stálost, ale mohou být určeny k vytvoření rychlého vzniku mikrobublinek bezprostředně před podáním nebo v jeho průběhu.

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.
DOŠLO 18. X. 95
č.j. 657 74

# Ultrazvukový kontrastní prostředek, způsob jeho výroby a použití

## Oblast techniky

Vynález se týká nových kontrastních činidel, konkrétněji nových kontrastních činidel pro použití v diagnostickém zobrazování ultrazvukem.

## Dosavadní stav techniky

Ultrazvukové zobrazování je založeno na průstupu ultrazvukových vln, například v rozmezí frekvencí 1 - 10 MHz, lidským nebo živočišným subjektem za pomoci převodníku (měniče), kdy ultrazvukové vlny reagují s rozhraními (meziplochami) tělních tkání a tekutin. Kontrast je v ultrazvukovém zobrazování odvozen z diferenčního odrazu či absorpce zvukových vln na takových rozhraních; výsledky mohou být zesíleny použitím Dopplerových technik, včetně použití barvy Doppler k vyhodnocení toku krve.

Již dříve bylo zřejmé, že může být výhodné zvýšit rozdíl v akustických vlastnostech různých tkání či tekutin použitím kontrastních činidel a od použití indocyaninové zeleně v roce 1968 jako prvního ultrazvukového kontrastního činidla bylo zkoušeno mnoho dalších možných činidel. Patří mezi ně emulse, pevné částice, vodou rozpustné sloučeniny, bublinky volného plynu a různé typy enkapsulovaných systémů, obsahujících plyn. Obecně je známo, že kontrastní činidla o nízké hustotě, která jsou snadno stlačitelná, jsou zvláště účinná, pokud se týká akustického zpětného rozptylu, který vytvářejí; systémy plyn obsahující a plyn vytvářející mají tedy sklon poskytovat značně větší účinnost než jiné typy kontrastních činidel.

Nyní jsou komerčně dostupná nebo v pokročilém klinickém zkoušení tři ultrazvuková kontrastní činidla, a to Echovist®, založený na mikrokrystalech galaktózy, obsahujících plyn; Levovist®, obsahující mikrokrystaly galaktózy s

obsahem plynu, které jsou pokryty mastnou kyselinou; a Albunex®, obsahující bublinky plynu, enkapsulované do částečně denaturovaného lidského sérového albuminu. Klinické použití těchto činidel je však omezené jejich krátkým kontrastním poločasem (tj. relativním nedostatkem stability v podmínkách *in vivo*) a jejich omezenou dobou skladovatelnosti. Proto stále přetrvává potřeba ultrazvukového kontrastního činidla, zvláště pro perfusní studie, týkající se srdce i jiných orgánů, které by spojovalo dobrou stálost při skladování se stálostí *in vivo*, nejlépe pro alespoň několik průchodů oběhem v případě intrakardiálních injikací.

Další nevýhodou mikročásticových ultrazvukových kontrastních činidel jako je Echovist® a Levovist® je to, že potřebují úpravu před podáním, například přídavek vhodného kapalného nosiče a promíchání protřepáním. To nevyhnutelně působí jistou prodlevu a proto přetrvává potřeba zlepšených ultrazvukových kontrastních činidel, která by mohly být skladována po podstatná časová údobí (např. nejméně 12 měsíců, lépe pak 2-3 roky) ve formě "připravené k použití".

## Podstata vynálezu

Předkládaný vynález je založen na zjištění autorů, že uvedené požadavky mohou být splněny kontrastními činidly na bázi emulze oleje ve vodě s obsahem v oleji rozpustných plynů či tekutin, nebo prekursorů plynu v kondenzované či rozpuštěné formě v rozptýlené olejové fázi.

Podle jednoho rysu vynálezu je tedy předkládáno ultrazvukové činidlo, složené z biologicky slučitelné emulze oleje ve vodě, kde olejová fáze obsahuje v oleji rozpustný plyn či tekutinu, nebo prekursor plynu.

Charakteristickým rysem kontrastních činidel podle vynálezu je to, že jsou ve své formě pro skladování před podáváním v podstatě zcela prosté volných bublinek plynu anebo mikrobublinek; k rychlému vytváření mikrobublinek však může dojít následně po podání, například intravenózní nebo intraarteriální injekcí (do žíly nebo

tepny), nebo může být indukováno bezprostředně před takovým podáním, například tak, jak je podrobněji popsáno dále. V tomto ohledu mohou být výrobky podle vynálezu odlišeny od existujících ultrazvukových kontrastních činidel, která ve své formě pro skladování obecně obsahují volný plyn, například jako inkluzi v dutinách jejich krystalových struktur a/nebo přichycený na povrchy v případě látek složených z mikročástic, jako jsou Echovist® a Levovist®, nebo v enkapsulované formě u látek jako Albunex®.

Plyny, používané v kontrastních činidlech podle vynálezu, mají s výhodou nízkou rozpustnost ve vodě pro zajištění jejich přednostní rozpustnosti v lipofilní olejové fázi emulze a pro zvýšení stálosti mikrobublinek, vytvářených ve vodném prostředí krevního oběhu následně po intravenosní nebo intraarteriární injikaci kontrastního činidla. Je však zřejmé, že rozpustnost plynu v olejové fázi by s výhodou neměla být tak vysoká, aby inhibovala tvorbu mikrobublinek po podání, i když vytváření mikrobublinek může být v takových situacích zvýšeno, pokud je to žádoucí, například předehřátím emulze před jejím podáním, například tak, jak je podrobněji popsáno dále. Mezi vhodné plyny tedy například patří inertní plyny jako helium, neon, argon, krypton nebo xenon; uhlovodíky jako methan, acetylen nebo 3-methylbut-1-en; halogenované uhlovodíky včetně haloalkanů jako methylbromid, $C_{1-4}$ hydrofluoroalkanů jako hexyfluoropropan a výhodněji perfluoroalkanů jako perfluoromethan či perfluorobutan a halidy síry, jako hexafluorid síry a podobně.

Výraz "plyn", jak je zde používán, zahrnuje jakoukoli látku, která je v plynném stavu při normální tělní teplotě 37°C a zahrnuje tedy v oleji rozpustné látky, které jsou kapalné při teplotě okolí, například 20-25°C. K příkladům vhodných látek, na které lze pohlížet jako na smísené s olejovou fází emulze v kontextu toho, že jsou v ní rozpuštěny, patří volitelně halogenované a/nebo jinak substituované uhlovodíky, alifatické a cyklické ethery, silany, arsany a halidy síry, jako jsou například následující:

| látka | bod varu (°C) |
|---|---|
| 4-methyl-1,3-dioxolan-2-on | 24,2 |
| dibromodifluoromethan | 24,5 |
| 1-nitroheptafluoropentan | 25,0 |
| tetramethylsilan | 26,5 |
| but-2-yn | 27,0 |
| 2-methylbutan | 27,8 |
| dekafluorid dvojsirný | 29,0 |
| perfluoropent-1-en | 29-30 |
| pent-1-en | 30,0 |
| 1,2-difluoroethan | 30,7 |
| 2-methylbut-1-en | 31,2 |
| furan | 31,4 |
| n-butylfluorid | 32,5 |
| methylisopropylether | 32,5 |
| tris-trifluoromethylarsan | 33,3 |
| 2-methylbuta-1,3-dien | 34,1 |
| oxid propylnatý | 34,2 |
| diethylether | 34,5 |
| chlorid isopropylnatý | 35-36 |
| pentan | 36,1 |
| pent-2-en (trans, cis) | 36,3-36,9 |

Výraz "tekutiny", jak je zde používán, označuje těkavé organické látky, jejichž bod varu s výhodou nepřesahuje 60°C. Je zřejmé, že dříve zmíněné požadavky nízké rozpustnosti ve vodě a přednostní (ale ne nadměrné) rozpustnosti v oleji, které byly uvedeny pro takové kapaliny, by měly být brány jako požadavky mísitelnosti a že požadavek rozpustnosti v olejové fázi emulze by měl být chápán jako požadavek mísitelnosti s touto fází.

K příkladům tekutin patří 1,1-dichloroethylen, 2-methylbut-2-en, 3,3-dimethylbut-1-yn, dimethylaminoaceton, perfluoropentan, cyklopentan, cyklopenten a 2,3-pentadien. Je zřejmé, že takové tekutiny, mající bod varu vyšší než 37°C, nebudou po podání obecně vytvářet plynové mikrobublinky. Budou však vytvářet kapalné mikrobublinky, které díky poměrně nízké hustotě kapaliny budou poskytovat ultrazvukový kontrastní účinek.

K příkladům v oleji rozpustných prekursorů plynu patří organické uhličitany, například sloučeniny o vzorci

RO.CO.OM

kde R je lipofilní organická skupina a M je fyziologicky přijatelný kation.Takové látky budou vytvářet oxid uhličitý při hodnotách pH přibližně 7 nebo nižších, například za podmínek, převažujících v krevním oběhu po intravenosním nebo intraarteriálním podání. Tam, kde jsou použity takové prekursory, závislé na aktivaci pH, může být výhodné začlenění ionoforu, například nigericinu, do emulze k ulehčení přenosu protonu olejovou fází.

Mezi další prekursory plynu patří látky, vytvářející dusík, jako jsou pyrazoliny, pyrazoly, triazoliny, diazoketony, diazoniové sole, tetrazoly, azidy a směsi azidu a uhličitanu, kteé mohou být aktivovány například ozářením, jako ultrafialovým (UV) světlem, například bezprostředně před podáním. Podobně mohou být užitečné i látky, které vytvářejí oxid uhličitý během fotolýzy, např. některé cyklické ketony, laktony a uhličitany.

K plynovým prekursorům, vytvářejícím kyslík, patří perkyseliny jako kyselina perbenzoová.

Použít lze také tepelně degradovatelné plynové prekursory, aktivované po podání tělesným teplem, a příkladem takové látky je tepelně odbouratelná

karboxylová kyselina, jako kyselina 2-methylmléčná.

K další třídě plynových prekursorů patří látky, které jsou enzymaticky odbourávány v podmínkách *in vivo* za doprovodného vzniku plynu. K příkladům patří methylenové diestery (připravené např. za použití technik, jako jsou ty, popsané ve WO-A-9317718 a WO-A-9318070, jejichž obsahy jsou zde zahrnuty ve formě odkazu), které jsou štěpeny běžnými esterázami za vzniku oxidu uhličitého. Jinou užitečnou látkou je peroxid vodíku, který je rozpustný v lipofilních médiích jako jsou ethery a který je *in vivo* enzymaticky odbouráván za tvorby kyslíku. Pokud je použit peroxid vodíku, může být výhodné také začlenění antioxidační stabilizační látky.

Olejová fáze emulze se může v podstatě skládat z plynu či tekutiny, spolu s jakýmikoliv nezbytnými, biologicky slučitelnými emulgačními činidly, za podmínek, v nichž jsou plyn či tekutina samy o sobě schopny vytvořit stabilní emulzi. V takových případech je kritickým požadavkem, aby plyn nebo tekutina byly přítomny spíše v kondenzované než v plynné formě, za použití, pokud je to potřeba, například tlaku.

Obvykleji bude olejová fáze složena v podstatě z plynu či tekutiny nebo prekursoru plynu, rozpuštěných v nejméně jedné složce lipofilního rozpouštědla, spolu s jakýmikoliv nezbytnými, biologicky slučitelnými emulgačními činidly, včetně povrchově aktivních látek a jiných stabilizačních činidel. Je zřejmé, že taková emulgační činidla mohou být s výhodou rozpuštěna nebo rozptýlena buď v olejové fázi nebo ve vodné fázi, pokud je to potřebné pro specifické emulsní systémy.

Do použitelné třídy složek lipofilního rozpouštědla pro olejovou fázi emulzí podle vynálezu patří vysoce fluorované organické sloučeniny, takové, jako byly navrženy jako složky "umělé krve" - viz například EP-A-0231091 a WO-A-8910118, jejichž obsah je zde zahrnut formou odkazu. Je nutné poznamenat, že při použití v umělé krvi tyto fluorované sloučeniny zřejmě provádějí transport kyslíku tvorbou komplexů s kyslíkovými molekulami, na rozdíl od tohoto vynálezu, kde účinně zajišťují prostředí rozpouštědla pro plyn nebo tekutinu, rozpustné v tucích.

Vysoce fluorované organické sloučeniny, kterých lze použít v souhlasu s vynálezem, zahrnují alifatické a cykloalifatické perfluorouhlovodíky, obsahující například nejvýše 20 uhlíkových atomů, jako perfluoro-2,2,4,4-tetramethylpentan, perfluorooktan, perfluorodekan, perfluorotrimethylcyklohexan, perfluoroisopropylcyklohexan, perfluorodekalin, perfluoroindan, perfluorotrimethylbicyklo[3,3,1]nonan, perfluorobicyklo[5,3,0]dekan, perfluoromethyladamantan a perfluorodimethyladamantan; dále bromem substituované analogy výše uvedených sloučenin, jako perfluoroktylbromid; alifatické a cykloalifatické perfluoroaminy, obsahující např. nejvýše 20 uhlíkových atomů, jako perfluorotripropylamin, perfluorotributylamin, perfluoro-N-methyldekahydrochinolin, perfluoro-4-methyloktahydrochinolizidin a perfluoro-1-azatricyklické amíny; perfluorované ethery a směsi kterýchkoli z dříve uvedených látek. K upřednostňovaným sloučeninám tohoto typu patří perfluorooktylbromid a dále perfluorodekalin, který může být například používán v kombinaci s perfluorotripropylaminem, např. jako ve výrobku Fluosol DA®.

Povrchově aktivní látky mohou být použity jako emulgační činidla ke stabilizaci emulze nebo jich samých k zajištění složky lipofilního rozpouštědla, v němž je plyn či tekutina nebo prekursor plynu rozpuštěn. K vhodným biologicky slučitelným povrchově aktivním látkám, kterých lze použít, tedy patří aniontové povrchově aktivní látky, například sole alkalických kovů, odvozené od mastných kyselin, jako dodekanoát sodný, alkylsulfáty alkalických kovů jako laurylsulfát sodný a sulfonované estery alkalických kovů, jako dioktylsulfosukcinát sodný (dokusát) a výhodněji pak neiontové nebo zwitteriontové (s obojetným iontem) povrchově aktivní látky. K příkladům posledně uvedených kategorií patří alkoholy s dlouhým alifatickým řetězcem jako n-dekanol, kopolymery polyoxyethylenu a polyoxypropylenu (např. poloxamery jako Pluronic® F68), sorbitanové estery mastné kyseliny, jako jsou látky typu "Span" a polyoxyethylované analogy těchto látek, jako jsou materiály typu "Tween", fosfolipidy (např. fosfatidylcholin, tj. lecitin, nebo dioleoylfosfatidyl diethanolaminu) a polyethylenglykolové estery mastných kyselin (např. výrobky Cremaphor®).

Polymerizovatelné amfifilní látky, například takové, jaké popisuje WO-A-9217212 (jehož obsah je zde zahrnut formou odkazu), lze rovněž použít jako povrchově aktivní látky; polymerizace takových amfifilních látek, například ozářením UV světlem nebo jinou vhodnou formou iniciace, může být v případě potřeby provedena po emulgaci.

Vhodné povrchově aktivní látky mohou být použity ve formě mnohočetně oddělených měchýřků (multicompartment vesicles), např. podle popisu Kima se spoluautory v Biochim. Biophys. Acta 728, 339, 1983, a v EP-A-0280503. Tyto měchýřky mohou být uvažovány jako složené z lipidových dvojvrstevných membrán, uzavírajících množství nesoustředných jader, tj. mající strukturu podobnou včelí plástvi. Běžně může být použito množství amfipatických lipidů, nejméně pak jeden z nich, majících síťový negativní náboj; přítomen může být také jeden nebo více neutrálních tuků. Mezi složky, které jsou jejich příkladem, tedy patří fosfatidylseriny, fosfatidylglyceroly jako dimyristoylfosfatidylglycerol, fosfatidové kyseliny, jako kyselina dimyristoylfosfatidová, fosfatidylcholiny jako dioleoylfosfatidylcholin nebo dipalmi- toylfosfatidylcholin, fosfatidylethanolaminy, dioleoyllecitin, cholesterol, triolein, trioktanoin a jiné oleje či triglyceridy a jejich deriváty.

K jiným lipofilním látkám, kterých lze použít v emulzích, např. jako stabilizačních složek, patří antioxidační látky jako tokoferoly nebo trioktová kyselina, perfluorované povrchově aktivní látky, které jak rozpouštějí, tak i stabilizují v tuku rozpustný plyn nebo prekursor plynu, kapalné krystaly, sloučeniny vytvářející Langmuir-Blodgetovy filmy a lipofilní biologicky odbouratelné polymery, například blokové kopolymery (např. jako jsou popsané ve WO-A-9204392 nebo WO-A-9317718). Rovněž mohou být použity v oleji rozpustné molekuly nosiče plynu či tekutiny; vhodnými nosiči pro tento účel mohou být porfyriny.

Použít lze také přídavné látky, jako pomocné povrchově aktivní látky, například látky zvyšující viskozitu jako jsou cukry, např. sacharóza.

Jedna ze zvláště vhodných tříd emulzí obsahuje emulze na tukové bázi, jako jsou komerčně dostupné, intravenosně podávané emulze Liposyn® (Abbot Laboratories), Intralipid® (Kabi Vitrum) a Soyacal® (Alpha Therapeutic). Tyto emulze jsou typicky založeny na sojovém oleji, fosfolipidu vaječného žloutku, glycerinu a vodě pro injekce a jejich částice jsou typicky menší než 0,5 μm v průměru, což je podobná velikost, v jaké se vyskytují přírodní chylomikra. K výhodám jejich použití patří dlouhá doba skladovatelnosti, zlepšený poločas cévního kontrastu a plynulé uvolňování plynu.

Pokud je to žádoucí, může olejová fáze kontrastních činidel podle vynálezu nádavkem obsahovat rozptýlené pevné mikročástice jednoho nebo více biologicky tolerovatelných minerálů, majících například velikost částic menší než 1 mikrometr, s výhodou pak menší než 0,2 mikrometru. Takové mikročástice, které mohou například obsahovat oxid křemičitý nebo oxid železa, mohou působit jako nukleační místa, napomáhající vytváření plynu na rozhraní pevné látky a tekutiny následně po podání kontrastních činidel.

Přesné složení kontrastních činidel podle vynálezu se může široce lišit v závislosti na takových faktorech, jako jsou konkrétní použité složky, předpokládané specifické použití a zamýšlená velikost mikrobublinek po podání.

Velikost mikrobublinek, vytvářených po podání může například obecně vzrůstat s rostoucí koncentrací plynu či tekutiny, přičemž je ovlivňována také povahou látek, tvořících olejovou fázi. Pokud kontrastní činidlo obsahuje rozpuštěný plyn, může to být obecně v jakékoli požadované hladině až do nasycení nebo až do přesycení, například u kontrastního činidla uchovávaného pod tlakem.

V případě tlakovaných kontrastních činidel může tvorba mikrobublinek začít před podáním činidla, například po otevření ampule nebo jiné formy zásobníku, a bude pokračovat *in vivo* po podání činidla. Netlakovaná kontrastní činidla budou vytvářet mikrobublinky *in vivo* jako důsledek např. zahřátí kontrastního činidla na

tělní teplotu, rozptýlení (difuze) krevních složek do stabilizačního materiálu a/nebo rostoucího rozpadu emulze. Jinou možností je indukce tvorby mikrobublinek před podáním činidla, například předehřátím emulze, např. mikrovlným zahřátím.

Jak bylo uvedeno výše, plyny rozpustnými v oleji, kterým se dává přednost, jsou takové, které jsou málo rozpustné ve vodě. To pobízí plyn ke spojování s lipofilními složkami emulze, čímž se dále zvyšuje stabilita mikrobublinek a docházet může také k vytvoření pružného lipofilně-mikrobublinkového matrixu, např. ve formě potažených mikrobublinek. V oboru je známo, že takové pružné struktury jsou zvláště výhodné díky svému zvýšenému ultrazvukově kontrastnímu účinku ve srovnání s mnohem neohebnějšími enkapsulovanými systémy mikrobublin.

Kontrastní činidla podle vynálezu mohou být připravována jakoukoli běžnou metodou. Například olejová fáze, obsahující plyn či tekutinu nebo prekursor plynu, která se například skládá z kondenzovaného plynu či tekutiny rozpustných v oleji, nebo roztoku plynu či tekutiny, nebo prekursoru plynu rozpustných v oleji, v alespoň jednom prostředí lipofilního rozpouštědla, může být emulgována ve vodné fázi tak, aby vytvořila emulzi oleje ve vodě.Toho lze dosáhnout například za použití běžných postupů, jako je homogenizace nebo dezintegrace ultrazvukem (sonikování), anebo mohou být požadovaný plyn či tekutina nebo prekursor tekutiny začleněny do olejové fáze předem vytvořené emulze oleje ve vodě.

Pokud je použit v oleji rozpustný plyn, může být například rozpuštěn ve zvoleném prostředí lipofilního rozpouštědla, např. za zvýšeného tlaku, a výsledný olej je poté emulgován, výhodně za tlaku přebytku plynu, a pokud je to nezbytné nebo žádoucí, v přítomnosti jednoho nebo více biologicky slučitelných emulgačních činidel. Pbdobné techniky mohou být použity, pokud se užije v oleji rozpustné tekutiny nebo prekursoru plynu. Jinou možností je začlenění plynu do předem připravené emulze, například průchodem plynu emulzí, a/nebo udržováním emulze pod zvýšeným tlakem plynu.

Ultrazvuková kontrastní činidla podle vynálezu mohou být podávána například enterálně nebo parenterálně, ačkoli zde mohou výhody spočívat ve zvláštních aplikacích při podávání přímo do tělních dutin, jako jsou vejcovody. Nejpravděpodobnějším použitím je však obecně intravaskulární podávání, nejčastěji intravenózní injekcí, sloužící k zesílení cévního zobrazování, včetně srdečních (kardiálních) a mimosrdečních (extrakardiálních) perfuzí.

Je zřejmé, že kontrastní činidla pro intravenózní podávání by měla vytvářet mikrobublinky dostatečně malé, aby prošly kapilárním řečištěm plicního systému. Činidla by tedy měla být s výhodou taková, aby vytvářela mikrobublinky o průměrech menších než 10 μm, lépe v rozmezí 0,2 až 8 μm, např. 0,3 až 7 μm.

Následující příklady, které nejsou omezující, slouží jako dokreslení vynálezu.

## Příklady provedení vynálezu

### Příklad 1

Span 20 (0,1021 g) byl rozpuštěn v n-pentanu (10 ml), poté byl přidán Tween 60 (0,5466 g), rozpuštěný ve vodě (40 ml) a směs byla emulgována při 0°C za použití homogenizátoru Ystral, poskytujícího jemnou, stálou emulzi. Ultrazvukový útlum byl měřen injikací 2 ml emulze do 5 ml destilované vody při 37°C, což je nad bodem varu n-pentanu. Získaný ultrazvukový útlum byl stálý po 20 minut.

### Příklad 2

Span 20 (0,1193 g) byl rozpuštěn v tetramethylsilanu, TMS (10 ml), poté byl přidán Tween 60 (0,9535 g), rozpuštěný ve vodě (40 ml) a směs byla emulgována při 0°C za použití homogenizátoru Ystral, poskytujícího jemnou, stálou emulzi. Ultrazvukový útlum byl měřen injikací 2 ml emulze do 5 ml destilované vody

při 37°C, což je nad bodem varu TMS. Byl získán silný ultrazvukový útlum a signál byl stálý po 20 minut.

Příklad 3

Emulze z výše uvedeného Příkladu 2 (0,35 ml) byla injikována do destilované vody (6,65 ml) při 37°C, což je nad bodem varu TMS. Byl získán echogenní (ozvěnovitý) účinek , vykazující maximum po 4 minutách a signál byl stálý 20 minut.

Příklad 4

Emulze z výše uvedeného Příkladu 2 (2 ml) byla injikována do destilované vody (5 ml) při 0°C a zředěná emulze byla pomalu zahřívána na 37°C. Během zahřívání byl měřen ultrazvukový útlum a bylo zjištěno, že kontrastní působení pomalu vzrůstá v průběhu 20 minut, což prokazuje, že s časem dochází k uvolňování plynu.

Příklad 5

Span 20 (0,0987 g) byl přidán k furanu (10 ml). Poté byl přidán Tween 60 (1,0098 g) rozpuštěný ve vodě (40 ml) a emulgován při 0°C za použití homogenizéru Ystral, poskytujícího jemnou, stálou emulzi. Ultrazvukový útlum byl měřen injikací 2 ml emulze do 5 ml destilované vody při 37°C, což je nad bodem varu furanu. Byl získán echogenní účinek a signál byl stálý po 20 minut.

Příklad 6

Do bromidu didodecyldimethylamonného (0,68 g), rozpuštěného ve vodě (40 ml) byl přidán pentan ( 5 ml) a směs byla emulgována při 0°C za použití homogenizátoru Ystral, poskytujícího jemnou emulzi, stabilizovanou lamelární kapalně krystalickou fází. Ultrazvukový útlum byl měřen injikací 2 ml emulze do 5 ml

destilované vody při 37°C. Byl získán echogenní účinek a signál byl stálý po 20 minut.

Příklad 7

Pentan (5 ml) byl přidán do dodecylsulfátu sodného (0,56 g) a 1-dekanolu (0,60 g), rozpuštěných ve vodě (40 ml) a směs byla emulgována při 0°C za použití homogenizátoru Ystral, poskytujícího jemnou emulzi, stabilizovanou lamelární kapalně krystalickou fází. Ultrazvukový útlum byl měřen injikací 2 ml emulze do 5 ml destilované vody při 37°C. Byl získán echogenní účinek a signál byl stálý po 20 minut.

Příklad 8

Span 20 (0,10 g) byl rozptýlen v perfluorodekalinu (4 ml), který pak byl nasycen hexafluoridem síry při 4°C. Tween 60 (0,45 g) byl rozpuštěn ve vodě (36 ml), ochlazen na 4°C a oba roztoky byly při 4°C emulgovány homogenizátorem Ystral při 20 000 otáčkách za minutu po dobu 30 sekund. Ultrazvukový útlum byl měřen injikací 2 ml emulze do 6 ml destilované vody při 4°C a pomalém zahřívání na 37°C. Pozorován byl útlum 2 dB/cm nebo vyšší po dobu přibližně 120 sekund.

Příklad 9

n-Dekanol (0,5 ml) a dodekanoát sodný (0,50 g) byly rozptýleny ve vodě (36 ml). Perfluorodekalin (4 ml) byl ochlazen na 4°C a nasycen hexafluoridem síry. Oba roztoky byly emulgovány při 4°C za použití homogenizátoru Ystral při 20 000 otáčkách za minutu po dobu 30 sekund. Ultrazvukový útlum byl měřen injikací 2 ml emulze do 6 ml destilované vody při 37°C. Po dobu asi 30 sekund byl pozorován silný útlum (> 2 dB/cm).

Příklad 10

Emulze z Příkladu 9 (2 ml) byla smísena s destilovanou vodou (6 ml) při 4°C a zředěná emulze byla pomalu zahřívána na 37°C. Byl měřen ultrazvukový útlum a maximální útlum 2,7 dB/cm byl pozorován přibližně po 30 sekundách.

Příklad 11

n-Dekanol (0,5 ml) a dodekanoát sodný (0,50 g) byly rozptýleny ve vodě (36 ml). Perfluorodekalin (4 ml) byl ochlazen na 4°C a nasycen xenonem. Oba roztoky byly emulgovány při 4°C za použití homogenizátoru Ystral při 20 000 otáčkách za minutu po dobu 30 sekund. Ultrazvukový útlum byl měřen smísením 2 ml emulze s 6 ml destilované vody při 37°C. Ultrazvukový útlum zesílil z 1 na přibližně 3 dB/cm v průběhu 5 minut.

Příklad 12

n-Dekanol (0,5 ml) a dodekanoát sodný (0,50 g) byly rozptýleny ve vodě (36 ml). Perfluorooktylbromid (4 ml) byl ochlazen na 4°C a nasycen xenonem. Oba roztoky byly emulgovány při 4°C za použití homogenizátoru Ystral při 20 000 otáčkách za minutu po dobu 30 sekund. Ultrazvukový útlum byl měřen smísením 2 ml emulze s 6 ml destilované vody při 37°C.

Příklad 13

Intralipid® (Kabi Vitrum, Stokholm, Švédsko), Fluosel® (Alpha Therapeutic Ltd, Velká Británie) nebo perfluorooktylbromid (10 ml) byly ochlazeny v autoklávu na 4°C. Emulze byly míchány po dobu 16 hodin, kdy byly pod tlakem xenonu (20 atm). Poté bylo míchání zastaveno a tlak pomalu uvolňován. Ultrazvukový útlum byl měřen smísením 2 ml každé z emulzí se 6 ml destilované vody při 37°C.

Příklad 14

Perfluoro-n-butan (1,6 g) byl při tlaku 2,5 atmosféry přidán k perfluorodekalinu (0,4 g), ochlazenému na -5°C, což je pod bodem varu perfluoro-n-butanu (asi -2°C). Vzniklý olej byl emulgován se 40 ml vodného roztoku, obsahujícího Pluronic F68 (1 % hmot./hmotn.) a sacharózu (1 % hmot./hmot.), dezintegrací ultrazvukem (sonikací) po dobu 20 minut v chlazené uzavřené plastové nádobě. Průměr kapének v takto získané emulzi oleje ve vodě byl zjištěn mikroskopicky a činil přibližně 1 mikrometr; po jednotýdenním skladování nebyly pozorovány žádné významné změny. Část (5 ml) emulze v 15 ml nádobě byla ohřáta na 80°C v 800 W mikrovlnné troubě (typickou dobou zahřívání bylo 8-10 sekund), ochlazena a zfiltrována (Millipore, 10 μm). Mikroskopicky bylo potvrzeno vytvoření perfluoro-n-butanových mikrobublinek, pokrytých stabilizačním povlakem perfluorodekalinu. Akustický útlum *in vitro* pro takovýto rozptyl mikrobublinek, který byl zředěn na celkový obsah oleje ve výši 0,2 % (hmot./hmot.), byl větší než 10 dB/cm v rozmezí frekvencí 1-6 MHz a byl stálý po více než 10 minut. Podobný vzorek, připravený bez předehřátí emulze a testovaný při 37°C vykázel akustický útlum, který vzrostl ze 2 dB/cm na 6 dB/cm během 7 minut, tak, jak se spontánně tvořily mikrobublinky.

Zastupuje:

# PATENTOVÉ NÁROKY

1. Ultrazvukový kontrastní prostředek, vyznačující se tím, že se skládá z biologicky slučitelné emulze oleje ve vodě, v níž olejová fáze obsahuje v oleji rozpustný plyn či tekutinu nebo prekursor plynu.

2. Ultrazvukový kontrastní prostředek podle nároku 1, vyznačující se tím, že plynem či tekutinou je inertní plyn, volitelně halogenovaný nebo jinak substituovaný uhlovodík, alifatický nebo cyklický ether, silan, arsan nebo halid síry.

3. Ultrazvukový kontrastní prostředek podle nároku 2, vyznačující se tím, že plynem či tekutinou je perfluoroalkan.

4. Ultrazvukový kontrastní prostředek podle nároku 2, vyznačující se tím, že plyn či tekutina jsou zvoleny z xenonu, n-pentanu, furanu, tetramethylsilanu, hexafluoridu síry a perfluoro-n-butanu.

5. Ultrazvukový kontrastní prostředek podle nároku 1, vyznačující se tím, že prekursorem plynu je organický uhličitan; pyrazolin, pyrazol, triazolin, diazoketon, diazoniová sůl, tetrazol, azid nebo směs azidu a uhličitanu; cyklický keton, lakton či uhličitan, podléhající fotolýze; perkyselina; tepelně degradovatelná karboxylová kyselina; enzymaticky odbouratelný methylendiester nebo peroxid vodíku.

6. Ultrazvukový kontrastní prostředek podle kteréhokoli z nároků 1 až 4, vyznačující se tím, že se olejová fáze emulze skládá v podstatě z kondenzovaného plynu či tekutiny, spolu s kterýmikoliv biologicky slučitelnými emulgačními činidly.

7. Ultrazvukový kontrastní prostředek podle kteréhokoli z nároků 1 až 5, vyznačující se tím, že se olejová fáze emulze skládá v podstatě z plynu či

tekutiny nebo prekursoru plynu, rozpuštěných v nejméně jedné složce lipofilního rozpouštědla spolu s kterýmikoliv nezbytnými biologicky slučitelnými emulgačními činidly.

8. Ultrazvukový kontrastní prostředek podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m , že složka lipofilního rozpouštědla je zvolena z alifatických a cykloalifatických perfluorouhlovodíků a jejich bromem substituovaných analogů, alifatických a cykloalifatických perfluoroaminů, perfluoroetherů a směsí kterýchkoli z předchozích látek.

9. Ultrazvukový kontrastní prostředek podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m , že složkou lipofilního rozpouštědla je perfluorooktylbromid, perfluorodekalin, nebo směs perfluorodekalinu a perfluorotripropylaminu.

10. Ultrazvukový kontrastní prostředek podle kteréhokoli z nároků 6 až 9, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje jako emulgační činidlo jednu nebo více povrchově aktivních látek, zvolených ze solí alkalických kovů, odvozených od mastných kyselin, alkylsulfátů alkalických kovů a sulfonovaných esterů, kopolymerů polyoxyethylenu a polyoxypropylenu, sorbitanových esterů mastných kyselin a jejich polyoxyethylovaných analogů, fosfolipidů, polyethylenglykolových esterů mastných kyselin, polymerizovatelných amfifilních látek a povrchově aktivních systémů ve formě mnohočetných oddělených měchýřků.

11. Ultrazvukový kontrastní prostředek podle kteréhokoli z nároků 7 až 10, v y z n a č u j í c í s e t í m , že emulgační činidlo rovněž působí jako složka lipofilního rozpouštědla.

12. Ultrazvukový kontrastní prostředek podle kteréhokoli z nároků 1 až 5, v y z n a č u j í c í s e t í m , že olejová fáze emulze obsahuje olej ze sojových oříšků a fosfolipid vaječného žloutku a vodná fáze obsahuje glycerin a vodu pro injekce.

13. Ultrazvukový kontrastní prostředek podle kteréhokoli z předcházejících nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m , že v olejové fázi jsou rozptýleny mikročástice jednoho nebo více biologicky tolerovatelných minerálů.

14. Způsob výroby ultrazvukového kontrastního prostředku, definovaného v nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje buď (i) emulgaci olejové fáze, obsahující buď kondenzovaný, v oleji rozpustný plyn či tekutinu, nebo roztok v oleji rozpustného plynu či tekutiny nebo prekursoru plynu v nejméně jedné složce lipofilního rozpouštědla, ve vodné fázi, tak aby byla vytvořena emulze oleje ve vodě, nebo (ii) začlenění požadovaného v oleji rozpustného plynu či tekutiny nebo prekursoru plynu do olejové fáze předem připravené emulze oleje ve vodě.

Zastupuje:

PŘÍL.
URAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
28. XII. 96
00 10
82180
č.j.