**PCT** WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

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

| (51) Internationale Patentklassifikation 6 : | | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 96/28192** |
|---|---|---|
| **A61K 49/00** | **A1** | (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 19. September 1996 (19.09.96) |

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/01108

(22) Internationales Anmeldedatum: 14. März 1996 (14.03.96)

(30) Prioritätsdaten:
195 10 690.3 14. März 1995 (14.03.95) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstrasse 178, D-13353 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: RÖSSLING, Georg [DE/DE]; Oranienburger Chaussee 60C, D-13465 Berlin (DE). ALBAYRAK, Celàl [DE/DE]; Paul-Lincke-Ufer 42/43, D-10999 Berlin (DE). ROTHE, Matthias [DE/DE]; Ringbahnstrasse 72, D-12099 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht
*Mit internationalem Recherchenbericht.*
*Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.*

(54) Title: MICROPARTICLES, AGENTS CONTAINING SAID MICROPARTICLES FOR USE IN ULTRASOUND DIAGNOSTICS, AND PROCESSES FOR PRODUCING SAID PARTICLES AND AGENTS

(54) Bezeichnung: MIKROPARTIKEL, DIESE ENTHALTENE MITTEL FÜR DIE ULTRASCHALLDIAGNOSTIK SOWIE VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG DER PARTIKEL UND MITTEL

(57) Abstract

The invention concerns gas-containing microparticles for use in ultrasound diagnostics. The wall material of the microparticles is made either from block copolymers of α-, β-, or γ-hydroxycarboxylic acid polyesters with linear or stellate polyethylene glycols and, optionally, liquid crystals, or from α-, β-, or γ-hydroxycarboxylic acid polyesters with liquid crystals. The invention also concerns agents containing these particles for use in ultrasound diagnostics and processes for producing the said agents and particles.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft gasenthaltende Mikropartikeln für die Ultraschalldiagnostik, deren Wandmaterial aus Blockcopolymeren von Polyestern von α- β- oder γ-Hydroxycarbonsäuren mit linearen oder sternförmigen Polyethylenglykolen und gegebenenfalls Flüssigkristallen oder deren Wandmaterial aus Polyestern von α-, β- oder γ-Hydroxycarbonsäuren und Flüssigkristallen aufgebaut ist, diese Partikel enthaltene Mittel für die Ultraschalldiagnostik, sowie Verfahren zur Herstellung der Mittel und Partikel.

*LEDIGLICH ZUR INFORMATION*

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **AM** | Armenien | **GB** | Vereinigtes Königreich | **MX** | Mexiko |
| **AT** | Österreich | **GE** | Georgien | **NE** | Niger |
| **AU** | Australien | **GN** | Guinea | **NL** | Niederlande |
| **BB** | Barbados | **GR** | Griechenland | **NO** | Norwegen |
| **BE** | Belgien | **HU** | Ungarn | **NZ** | Neuseeland |
| **BF** | Burkina Faso | **IE** | Irland | **PL** | Polen |
| **BG** | Bulgarien | **IT** | Italien | **PT** | Portugal |
| **BJ** | Benin | **JP** | Japan | **RO** | Rumänien |
| **BR** | Brasilien | **KE** | Kenya | **RU** | Russische Föderation |
| **BY** | Belarus | **KG** | Kirgisistan | **SD** | Sudan |
| **CA** | Kanada | **KP** | Demokratische Volksrepublik Korea | **SE** | Schweden |
| **CF** | Zentrale Afrikanische Republik | **KR** | Republik Korea | **SG** | Singapur |
| **CG** | Kongo | **KZ** | Kasachstan | **SI** | Slowenien |
| **CH** | Schweiz | **LI** | Liechtenstein | **SK** | Slowakei |
| **CI** | Côte d'Ivoire | **LK** | Sri Lanka | **SN** | Senegal |
| **CM** | Kamerun | **LR** | Liberia | **SZ** | Swasiland |
| **CN** | China | **LK** | Litauen | **TD** | Tschad |
| **CS** | Tschechoslowakei | **LU** | Luxemburg | **TG** | Togo |
| **CZ** | Tschechische Republik | **LV** | Lettland | **TJ** | Tadschikistan |
| **DE** | Deutschland | **MC** | Monaco | **TT** | Trinidad und Tobago |
| **DK** | Dänemark | **MD** | Republik Moldau | **UA** | Ukraine |
| **EE** | Estland | **MG** | Madagaskar | **UG** | Uganda |
| **ES** | Spanien | **ML** | Mali | **US** | Vereinigte Staaten von Amerika |
| **FI** | Finnland | **MN** | Mongolei | **UZ** | Usbekistan |
| **FR** | Frankreich | **MR** | Mauretanien | **VN** | Vietnam |
| **GA** | Gabon | **MW** | Malawi | | |

# Mikropartikel, diese enthaltene Mittel für die Ultraschalldiagnostik sowie Verfahren zur Herstellung der Partikel und Mittel

Die Erfindung betrifft den in den Patentansprüchen gekennzeichneten Gegenstand, daß heißt gasenthaltende Mikropartikel für die Ultraschalldiagnostik, deren Wandmaterial aus Blockcopolymeren von Polyestern von α-, ß- oder γ-Hydroxycarbonsäuren mit linearen oder sternförmigen Polyethylenglykolen und gegebenenfalls Flüssigkristallen oder aus Polyestern von α-, ß- oder γ-Hydroxycarbonsäuren und Flüssigkristallen aufgebaut ist, diese Partikel enthaltene Mittel für die Ultraschalldiagnostik, sowie Verfahren zur Herstellung der Mittel und Partikel.

Die Ultraschalldiagnostik hat in der Medizin wegen der komplikationslosen einfachen Handhabung sehr breite Anwendung gefunden. Ultraschallwellen werden an den Grenzflächen von unterschiedlichen Gewebearten reflektiert. Die dabei entstehenden Echosignale werden elektronisch verstärkt und sichtbar gemacht.

Die Darstellung von Blutgefäßen und innerer Organen mittels Ultraschall erlaubt im allgemeinen nicht die Darstellung des darin vorhandenen Blutflusses. Flüssigkeiten, insbesondere Blut, liefern nur dann Ultraschallkontrast, wenn Dichte- und Kompresibilitätsunterschiede zur Umgebung bestehen. Als Kontrastmittel werden in der medizinischen Ultraschalldiagnostik z. B. Gase enthaltende oder Gas produzierende Substanzen verwendet, da der Impedanzunterschied zwischen Gas und umgebendem Blut wesentlich größer ist, als der von Flüssigkeiten oder Festkörpern und Blut [Levine R.A., J. Am. Coll. Cardiol. 3 (1989) 28 ; Machi I.J. CU 11 (1983) 3].

Roelandt et al. [Ultrasound Med. Biol. 8 (1982) 471-492] beschreiben, daß durch periphere Injektionen von Lösungen, die feine Gasblasen enthalten, cardiale Echokontraste erzielt werden können. Diese Gasblasen werden in physiologisch verträglichen Lösungen z.B. durch Schütteln, andere Agitation oder durch Zusatz von Kohlendioxid erhalten. Sie sind jedoch hinsichtlich Anzahl und Größe nicht standardisiert und können nur unzulänglich reproduziert werden. Auch sind sie in der Regel nicht stabilisiert, so daß ihre Lebensdauer gering ist. Ihre mittleren Durchmesser liegen meist über Erythrocytengröße, so daß keine Lungenkapillarpassage mit nachfolgender Kontrastierung von Organen wie linkes Herz, Leber, Niere oder Milz möglich ist. Darüber hinaus eignen sie sich nicht für Quantifizierung, da sich das von ihnen erzeugte Ultraschallecho aus mehreren, nicht

voneinander zu trennenden Prozessen wie Blasenentstehung, Koaleszenz und Auflösung zusammensetzt. So ist es z.B. nicht möglich, mit Hilfe dieser Ultraschall-Kontrastmittel über die Messung des Kontrastverlaufs im Myokard, Aussagen über die Transitzeiten zu gewinnen. Hierzu sind Kontrastmittel notwendig, deren Streukörper eine ausreichende Stabilität aufweisen.

In der EP 0 131 540 ist die Stabilisierung der Gasblasen durch Zucker beschrieben. Damit wird zwar die Reproduzierbarkeit und Homogenität des Kontrasteffektes verbessert, eine Lungenpassage überstehen diese Blasen jedoch nicht.

In den EP 0 122 624 und 0 123 235 wird beschrieben, daß der gasblasenstabilisierende Effekt von Zuckern, Zuckeralkoholen und Salzen durch Zusatz von grenzflächenaktiven Substanzen verbessert wird. Eine Lungenkapillargängigkeit und die Möglichkeit zur Darstellung des arteriellen Gefäßschenkels und verschiedener Organe wie Leber oder Milz ist bei diesen Ultraschallkontrastmitteln gegeben. Der Kontrasteffekt ist hierbei jedoch auf das Gefäßlumen beschränkt, da die Bläschen nicht von den Gewebezellen aufgenommen werden.

Keines der beschriebenen Ultraschall-Kontrastmittel verbleibt längere Zeit unverändert im Körper. Eine Organdarstellung mit ausreichender Signalintensität durch selektive Anreicherung nach i.v. Gabe oder Quantifizierung ist mit diesen Mitteln nicht möglich.

Eine Verkapselung von Gasen, wie beispielsweise Luft als Ultraschall-Kontrastmittel wird in der EP 0 224 934 beschrieben. Das hierbei verwendete Wandmaterial besteht aus Protein, insbesondere menschliches Serumalbumin mit den bekannten allergenen Eigenschaften, zu denen durch eine Denatuierung cytoxische Effekte hinzukommen können.

In der Patentschrift EP 0 327 490 werden gasenthaltende Mikropartikel für die Ultraschall-Diagnostik auf der Basis von biologisch abbaubaren, synthetischen Materialien beschrieben. Als bioabbaubare Polymere werden u.a. α-, ß- oder γ-Hydroxycarbonsäuren offenbart. Die diagnostische Wirksamkeit daraus bereiteter Kontrastmittelpräparationen ist jedoch nicht in allen Fällen befriedigend.

Mir keinem der beschriebenen Ultraschall-Kontrastmittel ist eine Funktionsanalytik möglich.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, Verbindungen und daraus bereitete Mittel zu finden, die die Nachteile des Standes der Technik überwinden.

Diese Aufgabe wird durch die vorliegende Erfindung gelöst.

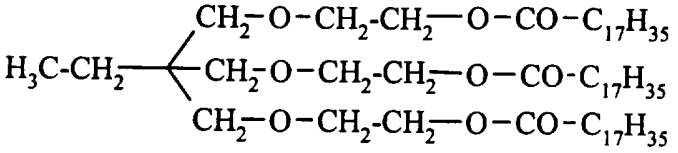
Es wurde gefunden, daß gashaltige Mikropartikel, deren Wandmaterial aus Blockcopolymeren von Polyestern von α-, ß- oder γ-Hydroxycarbonsäuren mit linearen oder sternförmigen Polyethylenglykolen und gegebenenfalls Flüssigkristallen oder aus Polyestern von α-, ß- oder γ-Hydroxycarbonsäuren und Flüssigkristallen aufgebaut ist, hervorragend als Ultraschallkontrastmittel geeignet sind.

Als erfindungsgemäß einsetzbare Blockcopolymere seien beispielhaft genannt:

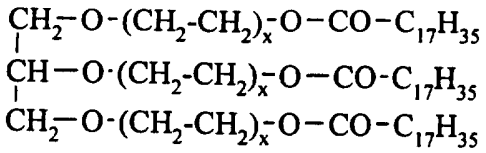
Glycolid-copolymere (PGA) mit Trimethylen Carbonat (TMC) oder Lactid-copolymere (PLA) mit Trimethylen Carbonat, Tetramethylenglycolid, δ-Valerolacton, ε-Caprolacton oder Blockcopolymere von Polyestern von Hydroxycarbonsäuren mit linearem- oder Star-Polyethylenglykol (PEG oder S-PEG), wie z.B. PLA/PEG AB-Blockcopolymere, PLA/PEG/PLA ABA-Blockcopolymere, S(3)-PEG-PLA Blockcopolymere, S(4)-PEG-PLA Blockcopolymere.

Als in dem polymeren Wandmaterial gegebenenfalls enthaltene flüssigkristalline Bestandteile seien beispielhaft genannt:
Polyoxyethylentrimethylolpropandistearat (PTDS), Polyoxyethylenglyceryldistearat (PGDS), Polyoxyethylendistearat (PDS), Polyoxyethylenstearylletherstearate (PSES), Polyoxyethylenlaurylletherstearate (PLES), Monooxyethylentrimethylolpropantristearat (MTTS*) sowie Polyoxyethylenglyceryltristearat (PGTS*) [die genannten flüssigkristallinen Verbindungen sind von Nihon Emulsion Co Ltd. (Tokyo) zu beziehen].

*MTTS



*PGTS



Erfindungsgemäße Mikropartikel, bei denen das Wandmaterial Flüssigkristalle enthält, können vorzugsweise in der Funktionsanalytik eingesetzt werden. So ändern die Flüssigkristalle in Abhängigkeit von der Temperatur ihren Aggregatzustand. Dieses führt bei entsprechender Temperatur zu einer Zerstörung der Partikelhülle, so daß das eingeschlossene Gas entweichen kann, was zu einem verschwinden des Ultraschallechos führt. Phasenübergangstemperaturen sind für eine Vielzahl kommerziell erhältlicher Flüssigkristalle bekannt und können den Herstellerangaben entnommen werden. Darüber hinaus kann die Verweilzeit der Mikropartikel im Blut gewünschtenfalls über die zugesetzte Menge an flüssigkristalliner Verbindung gesteuert werden. Der Anteil an Flüssigkristall in den erfindungsgemäßen Mikropartikeln beträgt 0-30% (Gewichtsprozent).

Als in den Partikeln enthaltene Gase kommen zur Anwendung Luft, Stickstoff, Edelgase, Distickstoffoxid, Kohlendioxid, Halogenkohlenwasserstoffe, gesättigte oder ungesättigte Kohlenwasserstoffe, Stickstoffdioxid und/oder Ammoniak.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Mikropartikeln auf der Basis von Blockcopolymeren von Polyestern von α-, ß- oder γ-Hydroxycarbonsäuren mit linearen oder sternförmigen Polyethylenglykolen und gegebenenfalls Flüssigkristallen sowie zur Herstellung von Mikropartikeln auf der Basis von α-, ß- oder γ-Hydroxycarbonsäuren und Flüssigkristallen.

Derartige Partikel können erhalten werden, indem das jeweilige Polymer, gewünschtenfalls unter Zugabe der flüssigkristallinen Verbindung und gegebenenfalls eine oberflächenaktive Substanz in einem organischen Lösungsmitteln oder Lösungsmittelgemischen, von denen mindestens ein Lösungsmittel mit Wasser gut mischbar ist, gelöst wird, anschließend eine flüssige Perfluoro-Verbindung oder Wasser in dieser Lösung dispergiert wird und anschließend diese Dispersion in Wasser, das eine oberflächenaktive Substanz enthält, mittels eines Rührers dispergiert wird, wobei das Lösungsmittel durch Gaseinleitung und Anlegen eines Vakuums entfernt wird. Hierbei fallen Partikel aus, die zunächst noch Wasser bzw. die flüssige Perfluoro-Verbindung enthalten. Anschließend wird die Partikel enthaltende Suspension mit einem geeigneten pharmazeutisch akzeptablen Kyroprotektor vermischt und gefriergetrocknet, wobei die in den Partikeln befindliche Flüssigkeit weitgehend entweicht und nach Belüften des Lyophilisators durch das gewünschte Gas (in der Regel sterile Luft) ersetzt wird. Je nach Trocknungsdauer verbleibt gegebenenfalls eine geringe Menge der Flüssigkeit (Wasser bzw. Perfluoro-Verbindung) als Dampf in den Partikeln.

Als organische Lösungs- oder Lösungsmittelgemische für die Polymeren werden bevorzugt verwendet, Dichlormethan, Aceton, Ethylacetat, Methylacetat, Triacetin, Triethylcitrat, Ethyllactat, Isopropylacetat, Propylformiat, Butylformiat, Ethylformiat und/oder Methyllactat.

Als Perfluoro-Verbindung kommen vorzugsweise zur Anwendung Perfluoropentan, Perfluorohexan, Perfluoro-1,3-Dimethylcyclohexan, Perfluorocyclohexen, Perfluorodecalin oder Perfluoroether.

Als oberflächenaktive Substanz (Tensid) kommen zur Anwendung Substanzen aus der Gruppe der Poloxamere oder Poloxamine, Polyethylenglycol Alkylether, Polysorbate, Saccharoseester (Sisterna The Netherlands), Saccharoseester [Ryoto sugarester, (Tokyo)], Gelatine, Polyvinylpyrolidon, Fettalkoholpolyglycosid, Chaps (Serva), Chap (Calbiochem), Chapso (Calbiochem), Decyl-ß-D-glycopyranosid, Decyl-β-D-maltopyranosid, Dodecyl-β-D-maltopyranosid, Natriumoleat, Polyethylenglykol, Polyvinylalkohol oder deren Gemische.

Ein alternatives Verfahren besteht darin, daß (die) gewünschte(n) Polymer(e) und gegebenenfalls eine Aminosäure in mindestens einem organischen Lösungsmittel gelöst wird (werden), diese Lösung über eine Düse in eine Kolonne gesprüht wird, die mit einem überkritischen Gas befüllt ist oder von diesem durchströmt wird, wobei das Lösungsmittel vom überkritischen Gas aufgenommen wird.

Vorzugsweise wird bei dieser Verfahrensvariante zu dem jeweils verwendeten gelösten Polymer (Polyester) anstelle des Tensids eine Aminosäure gegeben. Als Aminosäuren kommen vorzugsweise zum Einsatz L-Lysin, L-Phenylalanin, L-Tryptophan sowie D,L-Phenylalanin.

Die Zugabe einer Perfluorverbindung ist in diesem Falle nicht erforderlich.

Als Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemische eignen sich die vorgenannten Lösungsmittel.

Als überkritische Gase werden verwendet, Distickstoffoxid, Kohlendioxid, Halogenkohlenwasserstoffe, gesättigte oder ungesättigte Kohlenwasserstoffe, Stickstoffdioxid und/oder Ammoniak, wobei Kohlendioxid bevorzugt ist. Die

überkritischen Gase können gegebenenfalls bis zu 10% Zusätze, wie z.B. niedere Alkohole wie z.B. Ethanol, Ester oder Gase wie z.B. Stickstoff enthalten.

Die Größe der resultierenden Partikel kann über Art, Größe und Form der Einspritzdüse, Arbeitsdruck und Temperatur in der Kolonne gesteuert werden. Eine Partikelgröße wie sie für ein intravenös appliziertes Ultraschallkontrastmittel erforderlich ist (< 10 $\mu$m) kann unter Verwendung einer Düse mit einem Düsendurchmesser von 0,5 mm und einem Sprühwinkel von 10° bei einem Arbeitsdruck zwischen 90 und 100 bar, vorzugsweise 94-96 bar und einer Temperatur von 36° C realisiert werden.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Kontrastmittel für die Ultraschalldiagnostik enthaltend die erfindungsgemäßen gashaltigen Mikropartikel.

Diese Mittel können hergestellt werden, indem die getrockneten Mikropartikel in einem pharmazeutisch akzeptablen Suspensionsmedium resuspendiert werden.

Als pharmazeutisch akzeptable Suspensionsmedien kommen infrage Wasser p.i., wäßrige Lösungen eines oder mehrere anorganische Salze wie physiologische Elektrolyt-Lösungen und Pufferlösungen, wie z.B. Tyrode, wäßrige Lösungen von Mono- oder Disacchariden wie Glucose oder Lactose, Zuckeralkoholen wie Mannit, die gegebenenfalls zusätzlich noch eine oberflächenaktive Substanz, z.B. aus der Gruppe der Polysorbate oder Polysaccharide, Polyvinylpyrrolidon, Polyethylenglykol, Saccharose Mono- und Diester oder Substanzen aus der Gruppe der Poloxamere oder Poloxamine oder deren Gemische und/oder einem physiologisch verträglichen mehrwertigen Alkohol wie Glycerin. Bevorzugt ist jedoch in für Injektionszwecke geeignetes Wasser.

Um die Sicherheit der Applikation zu erhöhen, kann unmittelbar vor Injektion eine Filtration der Suspension durchgeführt werden.

Die erfindungsgemäßen Mikropartikel auf der Basis von Blockcopolymeren von Polyestern von α-, ß- oder γ-Hydroxycarbonsäuren mit linearen oder sternförmigen Polyethylenglykolen und gegebenenfalls Flüssigkristallen oder auf der Basis von Polyestern von α-, ß- oder γ-Hydroxycarbonsäuren und Flüssigkristallen, sowie daraus bereitete Kontrastmittel erfüllen alle Anforderungen, die an ein modernes Ultraschallkontrastmittel gestellt werden. Die in den Mitteln enthaltenen Partikel zeichnen sich durch die folgenden Vorteile aus:

- Sie werden schnell in-vivo abgebaut,
- Abbauprodukte sind toxikologisch unbedenklich,
- sie zirkulieren ausreichend lange im Blutkreislauf,
- sie sind in allen Modi der Ultraschalldiagnostik, insbesondere auch bei Modi bei denen nichtlineare Effekte ausgenutzt werden anwendbar,
- sie sind gut verträglich,
- sie zeigen eine einheitliche, steuerbare Größenverteilung,
- sie sind leicht herstellbar,
- sie sind ausreichend stabil um auch eine Lungenpassage zu überstehen und eignen sich damit auch für die Kontrastierung des linken Herzens und
- sie werden vom retikuloendothelialen System aufgenommen und eignen sich somit auch für die Kontrastierung der Leber und Milz.

Die Partikel und daraus bereitete Kontrastmittelpräparationen sind darüber hinaus gut verträglich, ohne ein allergenes Potential zu besitzen und verklumpen nicht im wäßrigen Medium. Weiterhin eignen sich die erfindungsgemäßen Mikropartikel deren Partikelhülle eine flüssigkristalline Verbindung enthält, für die Funktionsanalytik.

Nachfolgend eine Zusammenstellung der in der Anmeldung verwendeten Abkürzungen. Es bedeuten:

| | |
|---|---|
| PLA | Polylactid |
| PGA | Polyglycolid |
| TMC | Trimethylencarbonat |
| S | Stern |
| S(x) | x-fach verzweigter Stern, wobei bei einer 3-fach Verzweigung die Verzweigungsstelle ein Stickstoffatom, bei einer 4-fach Verzweigung ein Ammonium ($N^+$)-ion oder ein Kohlenstoffatom ist |
| AB bzw. ABA | bezeichnet die Abfolge der monomeren Bausteine |

Die nachfolgenden Beispiele dienen der näheren Erläuterung des Erfindungsgegenstandes, ohne ihn auf diese beschränken zu wollen.

**Beispiel 1**

3 g Diblock Copolymer von Polylactid und Polyethylengylkol (PLA 9600/PEG 2100) herstellbar wie von K. J. Zhu et al. [Journal of applied Polymer science Vol. 39 (1990) 1- 9 oder Journal of Polymer science (Part A: Polymer letters) Vol. 24 (1986) 331-337], D. Shiaw-Guang Hu et al. [Polymer Bulletin 30, (1993) 669-676] oder X.M. Deng et al. [Journal of Polymer Science (Part C: Polymer letters) Vol. 28 (1990) 411-416] beschrieben - werden in 40 ml Methylenchlorid/Aceton (Volumenanteil 50:50) gelöst. 10 ml Perfluoropentan werden mittels Ultraturrax (10.000 Upm) 2 Minuten lang in der Polymerlösung dispergiert. Die entstandene Emulsion (0/0) wird in 400 ml 1%ige Gelatine Lösung, die auf 0°C temperiert ist, mittels eines mechanischen Rührers (Dispermat-FT, VMA-Getzmann GmbH), (1000 Upm) 30 Minuten lang dispergiert. Die Emulsion (0/0/W) wird in einem 2 l Dreihalskolben, versehen mit einem Rührer (300 Upm) überführt, 3 h lang bei 20°C durch $N_2$-Einleitung, 3 Stunden lang bei 25°C durch Vakuum das Lösungsmittel entfernt. Anschließend wird die Suspension mit einem Kryoprotektor vermischt und gefriergetrocknet.

Das mit Wasser resuspendierte Lyophilisat enthält ultraschallaktive Mikropartikel von 0,1 bis 4 µm Durchmesser. Die Bestimmung der Partikeldurchmesser erfolgte mit einem LS-130 der Firma Coulter Electronics GmbH.

**Beispiel 2**

Es wird wie in Beispiel 1 verfahren, wobei 1% Gelatinelösung durch 0,2% Gelatinelösung und das Diblockcopolymer durch Triblockcopolymer von Polyactid und Polyethylenglykol (ABA) ersetzt wird. Dieses Blockpolymer kann erhalten werden wie bei H. R. Kricheldorf et al. [Makromol. Chem. 194 (1993) 463], Li Youxin et al. [Journal of Controlled Release, 27 (1993) 247-257] beschreiben.

Das mit dem Wasser resuspendierten Lyophilisat enthält ultraschallaktive Mikropartikel von 0,1 bis 4 µm Durchmesser.

**Beispiel 3**

Es wird wie in Beispiel 1 verfahren, wobei 1% Gelatinelösung durch 0,1% Gelatinelösung und das Diblockcopolymer durch Star-Polyethylenglykol- Polylactid Copolymer (S(3) PEG-PLA) ersetzt wurde. Dieses Polymer ist erhältlich wie bei K.J.Zhu [Journal of polymer science (Part A: Polymer chemistry) Vol. 27 (1989) 2151-2159] beschrieben.

Das mit dem Wasser resuspendierte Lyophilisat enthält ultraschallaktive Mikropartikel von 0,1 bis 2 µm Durchmesser.

**Beispiel 4**

Es wird wie in Beispiel 1 verfahren, wobei das Diblockcopolymer durch ein Triblockcopolymer PLA-S(3)-PEG-PLA ersetzt wird. Dieses Polymer ist herstellbar wie von K.J. Zhu [Journal of polymer science: Part A Polymer chemistry, Vol. 27 (1989) 2151-2159] beschrieben.

Das mit dem Wasser resuspendierten Lyophilisat enthält ultraschallaktive Mikropartikel von 0,1 bis 5 µm Durchmesser.

**Beispiel 5**

Es wird wie in Beispiel 1 verfahren, wobei das Diblockcopolymer durch Star-Polyethylenglykol-Polylactid (S(4)-PEG-PLA) ersetzt wurde. Dieses Polymer ist herstellbar wie von K.J. Zhu [Journal of polymer science: Part A Polymer chemistry, Vol. 27 (1989) 2151-2159] beschrieben.

Das mit dem Wasser resuspendierten Lyophilisat enthält ultraschallaktive Mikropartikel von 0,1 bis 2 µm Durchmesser.

**Beispiel 6**

Es wird wie in Beispiel 1 verfahren, wobei das Diblockcopolymer durch ein Triblockcopolymer PLA-S(4)-PEG-PLA ersetzt wird. Dieses Polymer ist herstellbar wie von K.J. Zhu [Journal of polymer science: Part A Polymer chemistry, Vol. 27 (1989) 2151-2159] beschrieben.

Das mit dem Wasser resuspendierten Lyophilisat enthält ultraschallaktive Mikropartikel von 0,1 bis 4 µm Durchmesser.

**Beispiel 7**

Es wird wie in Beispiel 1 verfahren, wobei in der Methylenchlorid/Acetonlösung außer dem Diblockcopolymer auch 300 mg Flüssigkristall MTTS [Nihon Emulsion Co Ltd. (Tokyo)] gelöst werden.

Das mit dem Wasser resuspendierte Lyophilisat enthält ultraschallaktive Mikropartikel von 0,3 bis 7 µm Durchmesser.

**Beispiel 8**

Es wird wie in Beispiel 1 verfahren, wobei in der Methylenchlorid/Acetonlösung außer dem Diblockcopolymer auch 300 mg Flüssigkristall PGTS [Nihon Emulsion Co Ltd. (Tokyo)] gelöst werden. Das mit dem Wasser resuspendierte Lyophilisat enthält ultraschallaktive Mikropartikel von 0,3 bis 7 µm Durchmesser.

**Beispiel 9**

0,375 g L-Lysin (Aldrich) werden in 25 ml Eisessig (Merck) gelöst und mit 2,5 g PLA-PEG (Böhringer Ingelheim) gelöst in 75 ml Dichlormethan (Merck) versetzt. Die vereinigten Lösungen in einer Apparatur wie in Figur 1 abbgebildet weiter behandelt.

Dazu werden die vereinigten Lösungen zunächst in ein Reservoir (17) gegeben und die Anlage über Ventil (2) und Leitung (30) aus einer Vorratsflaschen mit dem Gas befüllt. Mittels einer Kolbenhubpumpe (16) wird die Lösung aus dem Reservoir (17) nach Durchströmen von Leitung (52), einem Wärmetauscher (15), einer Leitung (54), einem Ventil (20) und schließlich Leitung (55), der Düse (118) zugeleitet. Mit einem Druck von 94-96 bar wird die Copolymer enthaltende Lösung durch eine konventionelle Einstoffdüse (118) [Typ Schlick 121 V] in die Kolonne (12) versprüht, wobei gleichzeitig $CO_2$ im überkritischen Zustand mit 90 bar/36° C und einem Durchsatz von 8,9 kg/h im Gleichstrom, über Einlaß (8), durch die Kolonne geleitet wird. Die Düse hat einen Durchmesser von 0,5 mm, der Sprühwinkel beträgt 10°.

Entsprechend der hohen Affinität des überkritischen $CO_2$ zum Lösungsmittel wird den primär gebildeten Tröpfchen Lösungsmittel entzogen. Zurück bleiben kugelförmige feste Polymerpartikeln.

Die weiteren Schritte dienen im wesentlichen der Reinigung und Rückführung des Lösungsmittelbeladenen $CO_2$, haben aber mit der Herstellung der Partikel nichts mehr zu tun. Die Aufbereitung des $CO_2$ kann wie folgt geschehen. Das mit dem Lösemittel beladene Gas entströmt durch Leitungen (42) und (40), gesteuert durch 2 Magnetventile (7 und 9), dem Kolonnenende und wird auf 60 bar entspannt. Die Ventile sind so geschaltet, daß die pro Zeiteinheit in die Kolonne einströmende Menge des fluiden Gases unter Aufrechthaltung des Arbeitsdruckes der Kolonne entströmen kann. Das durch die Entspannung auf 60 bar abgekühlte, mit Lösungsmittel beladene $CO_2$ wird mittels Leitung (62) in den auf 21° C temperierten Separator (10) geleitet, wo sich das Lösungsmittelgemisch infolge der unter diesen Bedingungen stark

verminderten Löslichkeiten im $CO_2$ abscheidet. Das vom Lösungsmittelgemisch befreite $CO_2$ wird mittels Leitung (64 und 32) durch Druck- und Temperaturerhöhung (3 und 4) erneut in den überkritischen Zustand überführt (90 bar, 36° C) und zur weiteren Trocknung der entstandenen Partikel erneut der Kolonne über Leitung (34), Flüssiggaspumpe (4), Leitung (36), Wärmetauscher (5), Leitung (38) durch Einlaß (8) zugeführt.

Die Entnahme des im Separator (10) abgetrennten Lösungsmittelgemischs erfolgt nach Abtrennung des Separators (10) aus dem Kreislauf durch Ventile (6) und (13) und Entspannung auf Atmosphärendruck über das Ventil (72).

Nachdem die gesamte im Reservoir enthaltene Menge an gelöstem Polymer versprüht wurde (Zeitdauer je nach Druck 20 bis 50 min), wird noch solange $CO_2$ durch die Kolonne geleitet, bis im Separator (10) keine Lösungsmittelreste mehr zurückgewonnen werden können.

Nach Abschluß des Trocknungsvorganges wird der $CO_2$-Strom zur Kolonne abgestellt, die Kolonne über die Ventile (11) und (14) auf Atmosphärendruck entspannt und die Partikel am unteren Kolonnenende (19) entnommen.

Es werden ultraschallaktive, gashaltige Mikropartikel mit einem Durchmesser von 1-10 µm erhalten.

**Beispiel 10-16**

Die Herstellung weiterer Mikropartikel erfolgt analog zu Beispiel 9. Die jeweils verwendeten Polymeren sowie weitere Daten sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

In allen Fällen werden ultraschallaktive, gashaltige Mikropartikel erhalten. Die erhaltenen Partikel sind steril und frei von Lösemittelrückständen, Polymerisationskatalysatoren oder Initiatormolekülen.
Sie besitzen eine gleichmäßige Teilchengrößenverteilung von 1 bis 10 µm.

Die Polymere werden jeweils in 75 ml Dichlormethan (Merck) und 25 ml Eisessig gelöst, die jeweilige Menge Aminosäure wird zugegeben. D,L-Phenylalanin ist geeigneterweise in bis 50 ml Ethanol (Merck) vorzulösen.

| Versuchs-nummer | Polymer | Einwaage Polymer [g] | Aminosäure | Einwaage Aminosäure [g] |
|---|---|---|---|---|
| 10 | Poly-(D,L-Lactid-co-trimethylcarbonat) | 2,0 | L-Lysin | 0,3 |
| 11 | Poly-(D,L-lactid-coglycolid)-PEG-blockpolymer | 1,0 | L-Phenyl-alanin | 0,15 |
| 12 | Poly-PLA-PEG-PLA-blockpolymer | 2,0 | D,L-Phenyl-alanin | 0,3 |
| 13 | S(3)-PEG-PLA-Sternblockcopolymer | 2,2 | L-Tryptophan | 0,35 |
| 14 | S(4)-PEG-PLA-Sternblockcopolymer | 3,0 | L-Lysin | 0,25 |
| 15 | PLA-S(4)-PEG-PLA-Sternblockcopolymer | 2,0 | L-Lysin | 0,2 |
| 16 | PLA-S(3)-PEG-PLA-Sternblockcopolymer | 2,0 | L-Lysin | 0,15 |

Tabelle 1

**Patentansprüche**

1. Gashaltige Mikropartikel für die Verwendung in der Ultraschalldiagnostik, dadurch gekennzeichnet, daß das Wandmaterial der Partikel aus Blockcopolymeren von Polyestern von α-, ß- oder γ-Hydroxycarbonsäuren mit linearen oder sternförmigen Polyethylenglykolen oder aus Polyestern von α-, ß- oder γ-Hydroxycarbonsäuren und Flüssigkristallen aufgebaut ist.

2. Gashaltige Mikropartikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß den Blockcopolymeren von Polyestern von α-, ß- oder γ-Hydroxycarbonsäuren mit linearen oder sternförmigen Polyethylenglykolen eine flüssigkristalline Verbindung zugesetzt ist.

3. Gashaltige Mikropartikel nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Wandmaterial aufgebaut ist aus Glycolid-copolymeren mit Trimethylen Carbonat oder
Lactid-copolymeren mit Trimethylen Carbonat, Tetramethylenglycolid, δ-Valerolacton oder ε-Caprolacton oder
Blockcopolymeren von Polyestern von Hydroxycarbonsäuren mit linearen- oder Star-Polyethylenglykol, PLA/PEG AB-Blockcopolymeren, PLA/PEG/PLA ABA-Blockcopolymeren, S(3)-PEG-PLA Blockcopolymeren oder S(4)-PEG-PLA Blockcopolymeren.

4. Gashaltige Mikropartikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als flüssigkristalline Verbindung Polyoxyethylentrimethylolpropandistearat, Polyoxyethylenglyceryldistearat, Polyoxyethylendistearat, Polyoxyethylenstearylletherstearate, Polyoxyethylenlaurylletherstearate, Monooxyethylentrimethylolpropantristearat oder Polyoxyethylenglyceryltristearat enthalten ist.

5. Gashaltige Mikropartikel nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil der flüssigkristallinen Verbindung 0-30 Gewichtsprozent beträgt.

6. Gashaltige Mikropartikel nach Anspruch 1 bis 5 enthaltend als Gas Luft, Stickstoff, Edelgase, Distickstoffoxid, Kohlendioxid, Halogenkohlenwasserstoffe, gesättigte oder ungesättigte Kohlenwasserstoffe, Stickstoffdioxid und/oder Ammoniak.

7. Verwendung von Mikropartikeln nach Anspruch 4 oder 5 in der Funktionsanalytik.

8. Verfahren zur Herstellung von gasenthaltenden Mikropartikeln für die Ultraschalldiagnostik, deren Wandmaterial aus Blockcopolymeren von Polyestern von α-, ß- oder γ-Hydroxycarbonsäuren mit linearen oder sternförmigen Polyethylenglykolen und gegebenenfalls Flüssigkristallen oder aus Polyestern von α-, ß- oder γ-Hydroxycarbonsäuren und Flüssigkristallen aufgebaut ist, dadurch gekennzeichnet, daß das gewünschte Polymer, gewünschtenfalls die flüssigkristalline Verbindung und gegebenenfalls eine oberflächenaktive Substanz in einem organischen Lösungsmitteln oder Lösungsmittelgemischen, von denen mindestens ein Lösungsmittel mit Wasser gut mischbar ist, gelöst wird, anschließend eine bei Körpertemperatur gasförmige Perfluoro-Verbindung oder Wasser in dieser Lösung dispergiert wird und anschließend diese Dispersion in Wasser, das eine oberflächenaktive Substanz enthält, mittels eines Rührers dispergiert wird, wobei das Lösungsmittel durch Gaseinleitung und Anlegen eines Vakuums entfernt wird und abschließend die so erhaltene Suspension mit einem geeigneten pharmazeutisch akzeptablen Kryoprotektor vermischt und gefriergetrocknet wird.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß als oberflächenaktive Substanz Substanzen aus der Gruppe der Poloxamere oder Poloxamine, Polyethylenglycol Alkylether, Polysorbate, Saccharoseester, Saccharoseester, Gelatine, Polyvinylpyrolidon, Fettalkoholpolyglycosid, Chaps, Chap , Chapso , Decyl-ß-D-glycopyranosid, Decyl-β-D-maltopyranosid, Dodecyl-β-D-maltopyranosid, Natriumoleat, Polyethylenglykol, Polyvinylalkohol oder deren Gemische verwendet werden.

10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß als perfluoro-Verbindung Perfluoropentan, Perfluorohexan, Perfluoro-1,3-Dimethylcyclohexan, Perfluorocyclohexen, Perfluorodecalin und/oder Perfluoroether verwendet wird.

11. Verfahren zur Herstellung von gasenthaltenden Mikropartikeln für die Ultraschalldiagnostik, deren Wandmaterial aus Blockcopolymeren von Polyestern von α-, ß- oder γ-Hydroxycarbonsäuren mit linearen oder sternförmigen Polyethylenglykolen aufgebaut ist, dadurch gekennzeichnet, daß

das (die) gewünschte(n) Polymer(e) und gegebenenfalls eine Aminosäure in mindestens einem organischen Lösungsmittel gelöst wird (werden), diese Lösung über eine Düse in eine Kolonne gesprüht wird, die mit einem überkritischen Gas befüllt ist oder von diesem durchströmt wird, wobei das Lösungsmittel vom überkritischen Gas aufgenommen wird.

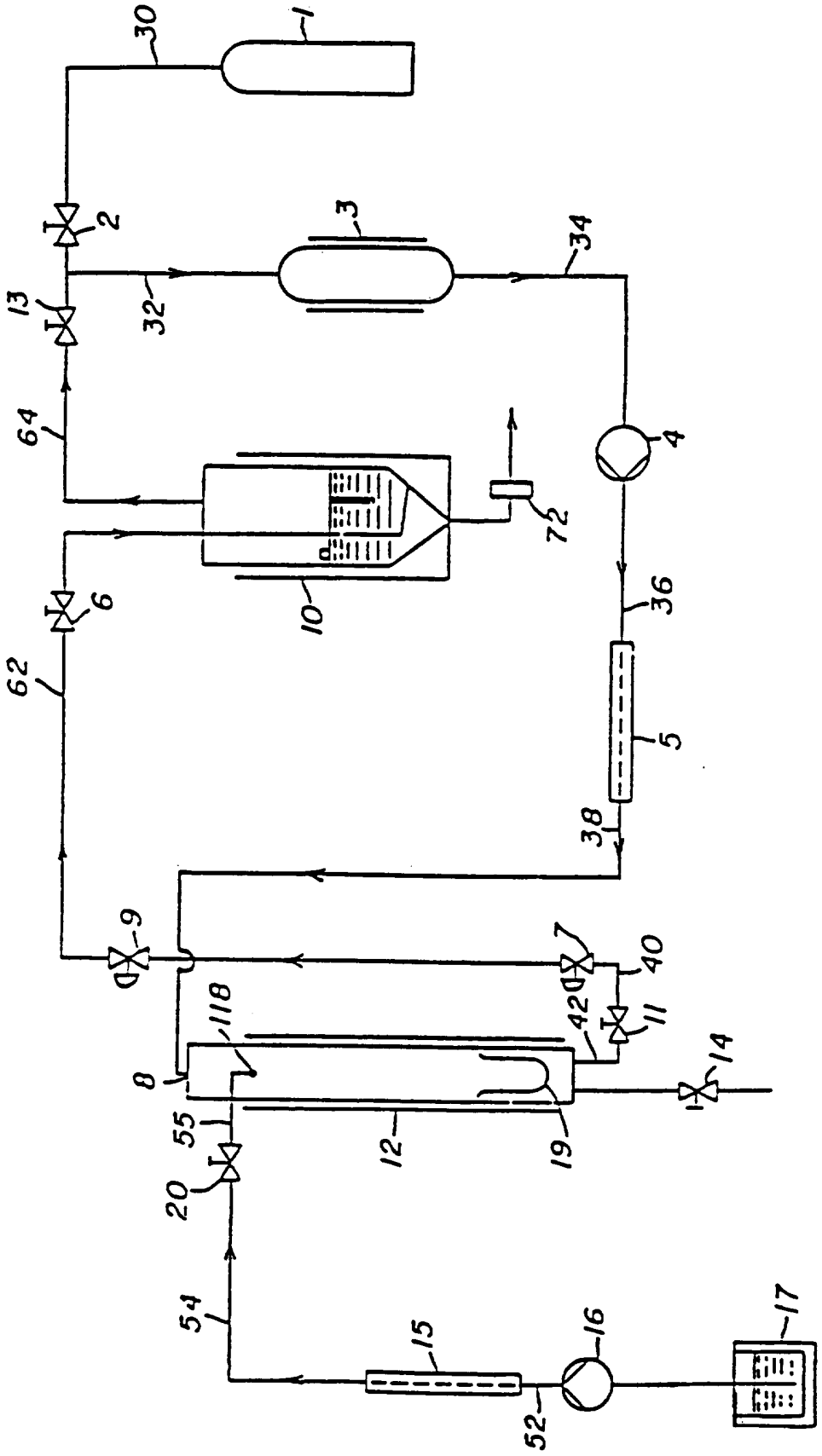
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß als überkritisches Gas Distickstoffoxid, Kohlendioxid, Halogenkohlenwasserstoffe, gesättigte oder ungesättigte Kohlenwasserstoffe, Stickstoffdioxid und/oder Ammoniak verwendet wird.

13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß als Aminosäure L-Lysin, L-Phenylalanin, L-Tryptophan oder D,L-Phenylalanin verwendet wird.

14. Verfahren nach Anspruch 8 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß als organisches Lösungsmittel für das Polymer Dichlormethan, Aceton, Ethylacetat, Methylacetat, Triacetin, Triethylcitrat, Ethyllactat, Isopropylacetat, Propylformiat, Butylformiat, Ethylformiat und/oder Methyllactat verwendet wird.

15. Verfahren zur Herstellung von Kontrastmitteln für die Ultraschalldiagnostik, dadurch gekennzeichnet, daß Mirkopartikel nach Anspruch 1-6 in einem pharmazeutisch verträglichen Suspensionsmedium suspendiert werden.

Figur 1


30
1
2
3
34
13
32
64
4
72
10
6
36
62
5
38
9
7
40
118
42
11
8
14
55
12
19
20
54
15
16
17
52

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 96/01108

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC6 : A 61 K 49/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC6 : A 61 K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| A | WO, A, 93/25 242 (SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT) 23 December 1993 (23.12.93), claims. | 1-15 |
| A | WO, A, 93/25 241 (SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT) 23 December 1993 (23.12.93), claims | 1-15 |
| A | EP, A, 0 327 490 (SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT) 09 August 1989 (09.08.89), claims | 1-15 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 14 June 1996 (14.06.96) | 26 July 1996 (26.07.96) |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office<br>Facsimile No. | Authorized officer<br>Telephone No. |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 96/01108

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**

A 61 K 49/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK 6

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

A 61 K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|---|---|---|
| A | WO, A, 93/25 242 (SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT) 23 Dezember 1993 (23.12.93), Patentansprüche. -- | 1-15 |
| A | WO, A, 93/25 241 (SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT) 23 Dezember 1993 (23.12.93), Patentansprüche. -- | 1-15 |
| A | EP, A, 0 327 490 (SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT) 09 August 1989 (09.08.89), Patentansprüche. ---- | 1-15 |

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☐ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

| Datum des Abschlusses der internationalen Recherche | Absendedatum des internationalen Recherchenberichts |
|---|---|
| 14 Juni 1996 | 26. 07. 96 |

| Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde | Bevollmächtigter Bediensteter |
|---|---|
| Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. ( + 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,<br>Fax ( + 31-70) 340-3016 | SCHNASS e.h. |

# ANHANG — ANNEX — ANNEXE

zum internationalen Recherchenbericht über die internationale Patentanmeldung Nr.

to the International Search Report to the International Patent Application No.

au rapport de recherche international relatif à la demande de brevet international n°

PCT/EP 96/01108 SAE 128757

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben. Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

This Annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Office is in no way liable for these particulars which are given merely for the purpose of information.

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents de brevets cités dans le rapport de recherche international visée ci-dessus. Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsibilité de l'Office.

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument<br>Patent document cited in search report<br>Document de brevet cité dans le rapport de recherche | Datum der Veröffentlichung<br>Publication date<br>Date de publication | Mitglied(er) der Patentfamilie<br>Patent family member(s)<br>Membre(s) de la famille de brevets | Datum der Veröffentlichung<br>Publication date<br>Date de publication |
|---|---|---|---|
| WO A1 9325242 | 23-12-93 | AU A1 43232/93 | 04-01-94 |
| | | CN A 1082924 | 02-03-94 |
| | | DE A1 4219724 | 16-12-93 |
| | | EP A1 644777 | 29-03-95 |
| | | FI A 945837 | 12-12-94 |
| | | FI A0 945837 | 12-12-94 |
| | | HU A0 9403566 | 28-02-95 |
| | | HU A2 69380 | 28-09-95 |
| | | IL A0 105891 | 20-10-93 |
| | | JP T2 7507780 | 31-08-95 |
| | | NO A 944805 | 12-12-94 |
| | | NO A0 944805 | 12-12-94 |
| | | NZ A 253115 | 26-01-96 |
| | | BR A 9304896 | 25-07-95 |
| WO A1 9325241 | 23-12-93 | DE A1 4217724 | 16-12-93 |
| | | EP A1 644776 | 29-03-95 |
| | | JP T2 7507778 | 31-08-95 |
| | | NO A 944806 | 12-12-94 |
| | | NO A0 944806 | 12-12-94 |
| | | US A 5425366 | 20-06-95 |
| | | AT E 109663 | 15-08-94 |
| | | AU A1 30351/89 | 25-08-89 |
| | | AU B2 625200 | 18-06-92 |
| | | CA A1 1336164 | 04-07-95 |
| | | CN A 1035437 | 13-09-89 |
| | | DE A1 3803977 | 10-08-89 |
| | | DE C2 3803977 | 02-11-89 |
| | | DE C0 58908154 | 22-09-94 |
| | | DK A0 1864/90 | 03-08-90 |
| | | DK A 1864/90 | 03-08-90 |
| | | EP A1 327490 | 09-08-89 |
| | | EP A1 388935 | 26-11-90 |
| | | EP A1 586875 | 16-03-94 |
| | | EP B1 388935 | 10-08-94 |
| | | ES T3 2068917 | 01-05-95 |
| | | HU A0 8910055 | 28-01-91 |
| | | HU A2 57222 | 28-05-92 |
| | | IL A0 89175 | 10-09-89 |
| | | IL A1 89175 | 21-03-93 |
| | | JP T2 3503634 | 15-08-91 |
| | | NO A0 903443 | 06-08-90 |
| | | NO A 903443 | 03-10-90 |
| | | NZ A 227869 | 25-11-92 |
| | | NZ A 237900 | 25-11-92 |
| | | PT A 89635 | 04-10-89 |
| | | PT B 89635 | 28-02-94 |
| | | WO A1 8906978 | 10-08-89 |
| | | DE C1 3803771 | 07-09-89 |
| | | FI A0 903865 | 03-08-90 |
| | | ZA A 8900873 | 25-10-89 |

# ANHANG — ANNEX — ANNEXE

zum internationalen Recherchenbericht über die internationale Patentanmeldung Nr.

to the International Search Report to the International Patent Application No.

au rapport de recherche international relatif à la demande de brevet international n°

PCT/EP 96/01108 SAE 128757

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben. Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

This Annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Office is in no way liable for these particulars which are given merely for the purpose of information.

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents de brevets cités dans le rapport de recherche international visée ci-dessus. Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office.

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument<br>Patent document cited in search report<br>Document de brevet cité dans le rapport de recherche | Datum der Veröffentlichung<br>Publication date<br>Date de publication | Mitglied(er) der Patentfamilie<br>Patent family member(s)<br>Membre(s) de la famille de brevets | Datum der Veröffentlichung<br>Publication date<br>Date de publication |
|---|---|---|---|
| | | AU A1 30351/89 | 25-08-89 |
| | | AU B2 635200 | 18-03-93 |
| | | CA A1 1336164 | 04-07-95 |
| | | CN A 1035437 | 13-09-89 |
| | | DE C1 3803971 | 07-09-89 |
| | | DE C0 58908194 | 22-09-94 |
| | | DK A0 1864/90 | 03-08-90 |
| | | DK A 1864/90 | 03-08-90 |
| | | EP A1 378935 | 25-11-90 |
| | | EP A1 586877 | 16-03-94 |
| | | EP B1 378935 | 10-08-94 |
| | | ES T3 2068917 | 01-05-95 |
| | | FI A0 903865 | 03-08-90 |
| | | HU A0 891055 | 28-01-91 |
| | | HU A2 59323 | 28-05-92 |
| | | IL A0 89175 | 10-09-89 |
| | | IL A1 89175 | 21-03-93 |
| | | JP T2 3503634 | 15-08-91 |
| | | NO A0 903443 | 06-08-90 |
| | | NO A 903443 | 03-10-90 |
| | | NZ A 227869 | 25-11-92 |
| | | NZ A 237900 | 25-11-93 |
| | | PT A 87635 | 04-10-89 |
| | | PT B 87635 | 28-09-94 |
| | | WO A1 8906978 | 10-08-89 |
| | | ZA A 8900877 | 25-10-89 |
| | | DE A1 3803971 | 10-08-89 |
| | | DE C2 3803971 | 02-11-89 |
| | | US A 5422366 | 20-06-95 |
| | | DE A1 4219724 | 16-12-93 |
| | | EP A1 644776 | 29-03-95 |
| | | JP T2 7503778 | 20-04-95 |
| | | NO A 944806 | 12-12-94 |
| | | NO A0 944806 | 12-12-94 |
| | | WO A1 9325241 | 23-12-93 |