

(11) *Número de Publicação:* **PT 620744 E**

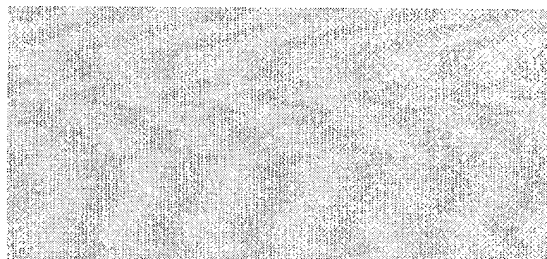
(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
A61K049/00 A

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) <i>Data de depósito:</i> 1993.01.08 (30) <i>Prioridade:</i> 1992.01.09 GB 9200388 (43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1994.10.26 (45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 2000.04.12	(73) <i>Titular(es):</i> NYCOMED IMAGING AS NYCOVEIEN 2, P.O. BOX 4220, TORSHOV N-0401 OSLO NO (72) <i>Inventor(es):</i> JO KLAVENESS NO PAL RONGVED NO LARS STUBBERUD SE (74) <i>Mandatário(s):</i> JOSÉ LUÍS FAZENDA ARNAUT DUARTE RUA DO PATROCÍNIO, 94 1350 LISBOA PT
---	--

(54) *Epígrafe:* MELHORAMENTOS EM OU RELACIONADOS COM AGENTES DE CONTRASTE

(57) *Resumo:*



f L A

DESCRIÇÃO**"MELHORAMENTOS EM OU RELACIONADOS COM AGENTES DE CONTRASTE"**

Esta invenção refere-se a novos agentes de contraste mais particularmente a novos agentes de contraste microparticulados de utilização em diagnóstico por imagem.

É bem conhecido que a imagem ultra-sônica é uma ferramenta de diagnóstico potencialmente valiosa, por exemplo em estudos do sistema vascular, particularmente em cardiografia, e em microvascularidade dos tecidos. Têm sido propostos uma variedade de agentes de contraste para melhorar as imagens acústicas assim obtidas, incluindo suspensões de partículas sólidas, gotículas de líquido emulsificado, microbolhas de gás e gases ou líquidos encapsulados. É geralmente aceite que agentes de contraste de baixa densidade que são facilmente compressíveis são particularmente eficientes em termos do sinal acústico de retorno a que dão origem, e tem sido mostrado interesse considerável na preparação de sistemas contendo gás ou geradores de gás.

Estudos iniciais envolvendo microbolhas de gás livre gerados *in vivo* por injeção intracardiaca de substâncias fisiologicamente aceitáveis, demonstraram a eficiência potencial de tais bolhas como agentes de contraste em ecocardiografia; tais técnicas são, no entanto, severamente limitadas na prática pelo curto tempo de vida das bolhas livres. Do mesmo modo tem sido demonstrado interesse em métodos geradores ou estabilizadores de microbolhas de gás para ecocardiografia e outros estudos ultrasônicos, por exemplo utilizando emulsificantes, óleos, espessantes ou açúcares.

Técnicas envolvendo a utilização de açúcares em agentes de contraste ultrasônico estão descritos em, por exemplo, US-A-4 681 119, US-A-4 442 843 e US-A-4 657 756, que revelam a utilização de sólidos particulados possuindo uma pluralidade de espaços preenchidos com gás e preferencialmente também uma

pluralidade de núcleos para formação de microbolhas. EP-A-0123235 e EP-A-0122624 sugerem agentes de contraste ultrasónico consistindo de tensioactivos que podem incluir uma variedade de açúcares. Quando são descritas micropartículas contendo tensioactivos, estes são simplesmente preparados por mistura do tensioactivo com os materiais microparticulados, por exemplo, por trituração.

DE-A-3834705 propõe a utilização de suspensões contendo micropartículas de misturas de pelo menos um ácido gordo C_{10-20} com pelo menos uma substância não activa à superfície, incluindo açúcares como as ciclodextrinas, monossacáridos, dissacáridos ou trissacáridos, assim como outros polióis e sais orgânicos e inorgânicos; na prática, apenas estão exemplificadas a utilização de galactose como material não activo à superfície e apenas a utilização de ácidos gordos saturados. Os materiais microparticulados são tipicamente preparados por co-precipitação do ácido gordo e da substância não activa à superfície e fragmentação do produto resultante, por exemplo utilizando um moinho a jacto de ar.

Um material do tipo descrito em DE-A-3834705, SHU 508 (Levovist®), é descrito nas seguintes publicações: Schlieff, R. et al., *Circulation Supplement III* (1990) 82, p.28; Scharf, M. et al., *Circulation Supplement III* (1990) 82, p. 261; Fritzsche, T. et al., *Invest. Radiol.* (1990) 25 (Suppl.), pp. 160-161; Schlieff, R. et al., *Echocardiography* (1990) 7, pp. 61-64; Loughery, E.J. et al., *Echocardiography* (1990) 7, pp. 279-292; e Smith, M.D. et al., *JACC* (1989) 13, pp. 1622-1628.

Meios de contraste contendo gás são também conhecidos como sendo eficazes em imagem por ressonância magnética (RM), por exemplo, como agentes de contraste de susceptibilidade que actuam para reduzir a intensidade de sinal de RM. Meios de contraste contendo oxigénio representam também agentes de contraste potencialmente úteis para RM paramagnética.

Além disso, no campo da imagem de raios-X tem sido observado que gases tais como o dióxido de carbono podem ser utilizados como agentes de contraste negativos orais.

Uma desvantagem geral da maior parte dos agentes de contraste particulados contendo/gerando gás, tais como os agentes com base em açúcares acima discutidos, é a sua relativa falta de estabilidade *in vivo*. Este é um problema particular em aplicações tais como a ecocardiografia, em que existe a necessidade de agentes de contraste melhorados que combinem estabilidade suficiente e pequeno tamanho de microbolhas (tipicamente menos do que cerca de 10 μm , preferencialmente menos do que cerca de 7 μm) para permitir a passagem através do leito capilar pulmonar e assim permitir aumentar a visualização do lado esquerdo do coração, preferencialmente para mais do que uma passagem da circulação. De acordo com o exposto existe uma necessidade de agentes de contraste que gerem sistemas de microbolhas exibindo boa estabilidade enquanto proporcionem um nível eficaz de eficiência de contraste.

A presente invenção baseia-se na nossa descoberta de que agentes de contraste compreendendo micropartículas de um hidrato de carbono possuindo um tensioactivo misturado com eles (mas excluindo as misturas previamente reveladas de galactose e ácidos gordos C_{10-20} saturados) podem ser utilizados para gerar sistemas de microbolhas exibindo efeito de contraste aumentado e/ou estabilidade relativa aos previamente propostos agentes de contraste à base de hidratos de carbono. No campo dos ultra-sons isto pode ser demonstrado por, por exemplo, medições *in vitro* de níveis de atenuação inicial e da semi-vida do efeito atenuante; uma indicação útil do efeito combinado destas propriedades é o integral obtido pela determinação da área sob a curva de um gráfico de atenuação contra o tempo.

O termo "tensioactivo", como aqui utilizado, significa qualquer composto possuindo propriedades anfifílicas capazes

de modificar a tensão de superfície.

Assim, de acordo com um aspecto da presente invenção, é fornecido um agente de contraste como definido na reivindicação 1.

O hidrato de carbono microparticulado é preferencialmente solúvel em água, e sujeito às condições apresentadas pode por exemplo ser seleccionado de hexoses tais como glucose, frutose ou galactose; dissacáridos tais como sacarose, lactose ou maltose; pentoses tais como arabinose, xilose ou ribose; e polissacáridos tais como ciclodextrinas α -, β - e γ -, maltodextrina e glicogénio; o termo "hidrato de carbono", como aqui utilizado, pretende também abarcar álcoois de açúcar, p. ex. alditóis tais como manitol ou sorbitol. Micropartículas dos hidratos de carbono acima geralmente conterão gás presente como uma inclusão nos espaços da sua estrutura cristalina e/ou aderido à sua superfície, cujo gás pode gerar microbolhas quando, por exemplo, as micropartículas são suspensas ou dissolvidas num líquido transportador injectável, por exemplo água para injeção, uma solução aquosa de um ou mais sais inorgânicos (p.ex. salino fisiológico ou uma solução de tampão fisiológico), uma solução aquosa de um monossacárido (p.ex. glucose ou galactose) ou dissacárido (p.ex. lactose), ou uma solução aquosa de um álcool monohídrico ou polihídrico fisiologicamente tolerável (p. ex. etanol, propanol, isopropanol, etilenoglicol, propilenoglicol, glicerina ou polietilenoglicol).

Adicionalmente aos gases especificados na reivindicação 1, também pode estar presente ar nos agentes de contraste da invenção.

Pode estar contido gás no agente de contraste de tal modo que antes da utilização o produto não dê contraste, mas que se torne eficaz durante a administração, p. ex. como resultado de as microbolhas que formam o gás como uma matriz de hidrato de carbono se dissolverem.

f L A

Sujeitos às condições apresentadas, podem ser utilizados uma vasta variedade de tensioactivos nos agentes de contraste de ultra-sons da invenção; deverá obviamente ser entendido que o tensioactivo deve ser biocompatível, i.e., deverá ser fisiologicamente tolerável nas quantidades nas quais será administrado. O tensioactivo é vantajosamente biodegradável *in vivo* ou de outro modo prontamente eliminado do sistema.

O tensioactivo pode, por exemplo, ser um lípido anfifílico, p. ex. seleccionado a partir de ácidos gordos e sais destes (p. ex. sais de metais alcalinos), ácidos esteróides, esteróis, fosfolípidos e glicolípidos. Tais lípidos incluem ácidos alifáticos de cadeia linear saturados e insaturados de elevado peso molecular (p. ex. C₁₀₋₅₀), tais como ácido cáprico, palmítico, hexadecanodiólico, esteárico, linoleico, behénico, docosanediólico e melíssico; ácidos aralcanóicos, p. ex. ácidos fenílicos alcanóicos baixos tais como ácido 2-fenilbutírico; sais de qualquer dos ácidos referidos; mono- e di- glicéridos, por exemplo ácidos alifáticos de ésteres de glicerilo de elevado peso molecular (p. ex. C₁₀₋₅₀), tais como monolaurato de glicerilo; ácidos colânicos tais como ácido 5 β -colânico; colesterol; ésteres de sorbitano de ácidos gordos tais como materiais tipo Span; álcoois alifáticos de cadeia linear de elevado peso molecular (p. ex. C₁₀₋₅₀) tais como álcool estearílico e álcool cetílico; fosfolípidos tais como fosfatidilcolina (lecitina) e dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE); e misturas destes.

Outros tensioactivos que podem ser empregues incluem tensioactivos aniónicos, por exemplo sulfatos alquilo de metal alcalino tais como laurilssulfato de sódio e ésteres sulfonados tais como dioctilsulfosuccinato de sódio (docusato); e tensioactivos não iónicos, por exemplo co-polímeros polioxietileno-polioxipropileno (p. ex. poloxâmeros tais como Pluronic F68) e ésteres de sorbitano polioxietilados (p. ex. polisorbatos tais como materiais tipo Tween).

A parte tensioactiva pode, se desejável, ser ligada covalentemente a um substrato tal como um hidrato de carbono, antes da sua mistura com o hidrato de carbono principal. Assim, por exemplo, um ácido gordo tal como ácido palmítico (preferencialmente sob a forma de um derivado reactivo tal como um haleto de acilo correspondente) pode ser utilizado para esterificar um açúcar (preferencialmente apropriadamente O-protégido) tal como galactose, e o hidrato de carbono resultante modificado lipofilicamente, utilizado como o tensioactivo de acordo com a invenção.

O tensioactivo pode, por exemplo, estar presente numa quantidade de 0,01-5,0 em % de peso, preferencialmente 0,1-2,0 em % de peso, em relação ao hidrato de carbono.

Os agentes de contraste da invenção podem ser utilizados numa variedade de técnicas de diagnóstico por imagem, incluindo imagem por ultra-sons, RM e raios X. As suas utilizações em imagem de ultra-sons para diagnóstico e imagem RM, por exemplo como agentes de contraste de susceptibilidade, constituem características preferidas da invenção.

Os agentes de contraste da invenção podem ser preparados por qualquer método conveniente, que leve à mistura física do tensioactivo e hidrato de carbono com a estrutura microparticulada e à produção de micropartículas do tamanho desejado.

Num método preferido, de acordo com a invenção, o hidrato de carbono e o tensioactivo são, cada um, dissolvidos em solventes mutualmente miscíveis apropriados (p. ex. água, no caso do hidrato de carbono e um álcool inferior tal como etanol no caso de tensioactivos lipídicos como os ácidos gordos), as soluções resultantes são misturadas, os solventes são removidos (p. ex. por evaporação sob pressão reduzida) e a mistura sólida resultante é micronizada para produzir as micropartículas desejadas. Deve ser entendido que todas estas operações devem ser efectuadas sob condições estéreis.

Em geral, técnicas de micronização convencionais como trituração ou moagem podem ser empregues em processos de acordo com a invenção. Verificou-se que a moagem de esferas da mistura sólida era particularmente vantajosa, permitindo a preparação de micropartículas sob a forma de agregados (por exemplo, possuindo um tamanho de agregado de 20-125 micrometros, tais como 30-50 micrometros) de partículas possuindo um tamanho de partícula de, por exemplo, 1-50 micrometro, tais como 1-10 micrometro. Tais agregados tendem a conter um volume substancial de ar adsorvido nas suas superfícies e entranhado em espaços, tais como cavidades inter-partículas ou nas fronteiras dos grãos entre os cristais. O tamanho de partícula pode, por exemplo, ser seleccionado para ser substancialmente comensurado com o tamanho desejado de microbolha. Em aplicações ultra-sónicas como a ecocardiografia, de modo a permitir a passagem livre através do sistema pulmonar e obter ressonância com as frequências de imagem preferidas de cerca de 0,1-15 MHz, pode ser conveniente empregar microbolhas e micropartículas possuindo um tamanho médio de 0,1-10 μm , por exemplo 1-7 μm ; a utilização de micropartículas de tamanho médio 1-4 μm para dar origem a microbolhas com um tamanho médio de 4-7 μm é geralmente vantajosa. Bolhas substancialmente maiores e partículas, por exemplo com tamanhos médios até 500 μm , podem contudo ser úteis em outras aplicações, por exemplo imagem gastrointestinal.

Agentes de contraste ultra-sónicos na forma de micropartículas compreendendo um hidrato de carbono que dá origem a microbolhas em mistura com um ácido orgânico anfifílico contendo 20 átomos de carbono em excesso, são a matéria objecto de WO 93/13802.

Os seguintes exemplos não limitativos servem para ilustrar a invenção:

f L A

Exemplos 1-18

Procedimento Geral

D-(+)-galactose (10,0 g) foi dissolvida em água destilada (14,2 g) a 50°C, esterilizada por filtração e arrefecida em gelo até uma temperatura de 4-8°C. As quantidades referidas dos tensioactivos (em % de p/p em relação à galactose) listadas na Tabela I foram cada uma dissolvidas na quantidade de etanol a 96% (ou em água nos Exemplos 5 e 6) apresentada na Tabela, a 50-78°C, e a solução resultante foi esterilizada por filtração e depois adicionada assepticamente à solução aquosa de galactose fria sob agitação. A mistura resultante foi evaporada até à secura sob pressão reduzida (10 torr, 40°C), e o produto sólido resultante foi seco num excicador durante a noite e foi então triturado durante 10 minutos sob condições assépticas num moinho de esferas de aço inoxidável possuindo um copo de trituração de 50 ml e esferas de 3 x 20 mm (Retsch centrifugal ball mill, S1). O produto triturado foi seco num excicador durante 24 horas.

f L A

Tabela I

Exemplo No.	Tensioactivo	Quantidade de Tensioactivo (% p/p)	Quantidade de etanol (ou água) (g)
1	Lecitina	1,0	1,2
2	"	0,2	1,2
3	Laurilssulfato de Sódio	1,0	1,0
4	" "	0,1	(água) 1,0
5	Span 80	1,0	(água) 1,2
6	" "	0,1	1,2
7	Span 85	1,0	1,2
8	" "	0,1	1,2
9	Pluronic F68	1,0	1,2
10	" "	0,1	1,2
11	Docusato de sódio	1,0	1,2
12	" "	0,1	1,2
13	DOPE	1,0	1,2
14	"	0,1	1,2
15	Monolaurato de α -Glicerilo	0,2	3,2
	Tripalmitato de Glicerilo	0,2	
	Colesterol	0,2	
	Acetato de Colesterol	0,2	
	Benzoato de Colesterol	0,2	
16	Monolaurato de α -glicerilo	0,02	1,2
	Tripalmitato de glicerilo	0,02	
	Colesterol	0,02	
	Acetato de Colesterol	0,02	
	Benzoato de Colesterol	0,02	
17	Ácido Hexadecanodióico	0,2	1,2
18	Ácido Linolénico	1,0	1,2

f L A

Exemplos 19-22

O procedimento geral para os Exemplos 1-18 foi repetido excepto que a D-(+)-galactose foi substituída pelos hidratos de carbono listados na Tabela II, nas quantidades e utilizando as quantidades de água apresentadas, e que o tensioactivo utilizado foi ácido palmítico (0,2% p/p relativamente ao hidrato de carbono) dissolvido em etanol a 96% (1,2 g).

Tabela II

Exemplo No.	Hidrato de Carbono gerador de Microbolhas	Quantidade de Hidrato de Carbono (g)	Quantidade de água (g)
19	Xilose (BDH)	10,0	14,2
20	Maltodextrina	10,0	14,2
21	Glicogénio (Merck)	5,0	17,2
22	α -Ciclodextrina (Sigma)	5,0	12,2

Exemplo 23

Misturas de 6-O-palmitoil-D-galactopiranoses/galactose

(A) 6-O-Palmitoil-1,2,3,4-diisopropilideno-D-galactopiranoses

1,2,3,4-Diisopropilideno-D-galactopiranoses (Sigma, 13,4 g, 51,3 mmol) e trietilamina (7,15 ml, 51,3 mmol) foram dissolvidos em cloreto de metileno (150 ml) e arrefecidos a 0°C. Cloreto de palmitólio (Aldrich, 14,1 g, 51,3 mmol) dissolvido em cloreto de metileno (100 ml) foi adicionado gota a gota com agitação durante 1 h. O banho de arrefecimento foi removido e a mistura de reacção foi agitada durante a noite. O cloridrato de trietilamina precipitado foi removido por filtração, o filtrado foi transferido para um funil de separação e extraído com água (3 x 50 ml), seco sobre MgSO₄ e o solvente foi removido sob vácuo. O resíduo era um óleo acastanhado claro que solidificou em cristais cerosos.

f L A

Rendimento bruto: 23 g. O produto bruto foi utilizado sem posterior purificação. Uma pequena fracção foi recristalizada para caracterização. FT-IR: CO-1734 cm^{-1} . ^{13}C -RMN: CO-éster 172,79. Pf. 124-127°C.

(B) 6-O-Palmitoil-D-galactopiranosose

6-O-Palmitoil-1,2,3,4-diisopropilideno-D-galactopiranosose (6 g) foi dissolvido em ácido acético (25 ml) e aquecido a 100°C sob azoto durante 6 h. Durante o arrefecimento subsequente até à temperatura ambiente, o produto precipitou a partir do solvente, e foi deixado à temperatura ambiente durante a noite. Os cristais foram colhidos por filtração e secos sob vácuo. Rendimento: 3,3 g. O produto foi caracterizado por FT-IR: CO-1734 cm^{-1} ; OH-3463 cm^{-1} .

(C) Misturas 6-O-palmitoil-D-galactopiranosose/galactose

- (i) D-(+)-galactose (2 g) foi dissolvida em água purificada (2,87 g) e esterilizada por filtração. 6-O-Palmitoil-D-galactopiranosose (0,25 g) preparado como descrito em (B) acima, foi dissolvido em etanol (3 g) e filtrado em condições estéreis. A solução de palmitoil-galactopiranosose foi adicionada à solução de galactose sob agitação e toda a mistura foi levada até à secura sob vácuo (10 torr, 50°C). O produto foi seco num excicador durante a noite.
- (ii) O procedimento de (i) foi repetido utilizando 6-O-palmitoil-D-galactopiranosose (0,50 g) dissolvido em etanol (6 g).

Exemplo 24

Ecogenicidade *in vitro*

10 ml de propilenoglicol misturado com 90 ml de dextrose a 5% em água foi utilizado como um veículo líquido para determinar a ecogenicidade de produtos de acordo com os

Exemplos. 1,0 g de cada produto a ser testado foi disperso em 3,0 ml do veículo líquido e agitado durante 15 segundos. A mistura resultante foi adicionada a 52 ml de solução de infusão de albumina sérica humana a 5%, na célula de medida e os efeitos acústicos dos produtos foram investigados por medida da transmissão acústica através das amostras utilizando um transdutor de banda larga de 5 MHz numa técnica de reflexão de pulso. A temperatura na célula de medida foi estabilizada a 37°C e a circulação do líquido foi mantida por meio de agitação a uma velocidade constante. A transmissão de ultra-sons através das amostras foi medida como uma função do tempo sobre a duração de 390 segundos. Os resultados foram normalizados a medidas numa referência consistindo em 55 ml de solução de infusão de albumina sérica humana a 5%.

Os resultados para os produtos representativos exemplificados e os resultados comparativos para D-(+)-galactose moída não modificada estão apresentados no esquema acompanhante como Fig. 1. Deve ser óbvio que estes produtos exibem um forte efeito na atenuação de ultra-sons *in vitro*, um efeito que persistiu durante alguns minutos.

Lisboa, 28 de Abril de 2000

O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

h. c. A.

REIVINDICAÇÕES

1. Agente de contraste compreendendo micropartículas geradoras de microbolhas compreendendo um hidrato de carbono e misturado com este, na estrutura microparticulada, um tensioactivo, em que as microbolhas geradas pelas referidas micropartículas compreendem gás seleccionado de hexafluoreto de enxofre e hidrocarbonetos fluorinados que estão na forma gasosa a 37°C.
2. Agente de contraste de acordo com a reivindicação 1, em que o hidrato de carbono é uma pentose solúvel em água, hexose, dissacárido, polissacárido ou álcool de açúcar.
3. Agente de contraste, de acordo com a reivindicação 2, em que o hidrato de carbono é galactose.
4. Agente de contraste, de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, em que o tensioactivo é seleccionado de: sais e ácidos carboxílicos alifáticos de cadeia linear; ésteres de sorbitano e mono- e diglicéridos destes; ácidos aralcanóicos e sais destes; ácidos esteróides; esteróis; álcoois alifáticos de cadeia linear; fosfolípidos; sulfatos de alquilo de metais alcalinos e ésteres sulfonados; co-polímeros de polioxietileno-polioxipropileno; ésteres de sorbitano polioxietilados; e misturas de quaisquer dos referidos.
5. Agente de contraste de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, em que o tensioactivo compreende um hidrato de carbono lipofilicamente modificado.

6. Agente de contraste de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, em que o tensioactivo está presente numa quantidade de 0,1-2,0% p/p, relativamente ao hidrato de carbono.
7. Agente de contraste de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, em que as micropartículas são agregados possuindo um tamanho de agregado de 30-50 micrometros de partículas possuindo um tamanho de partícula de 1-10 micrometros.
8. Agente de contraste de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, que gera microbolhas compreendendo ar em mistura com o referido hexafluoreto de enxofre ou hidrocarboneto fluorinado.
9. Processo para preparação de um agente de contraste de acordo com a reivindicação 1 que compreende (i) mistura de soluções do hidrato de carbono e tensioactivo e remoção do(s) solvente(s) destes e (ii) micronização da mistura resultante para produzir as micropartículas desejadas.
10. Processo de acordo com a reivindicação 9 em que a mistura é micronizada por moagem de esferas.
11. Utilização de um agente de contraste de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8 em imagem de diagnóstico.
12. Utilização de um agente de contraste de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8 em imagem ultra-sónica de diagnóstico.

13. Utilização de um agente de contraste de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8 em imagem de ressonância magnética.

Lisboa, 28 de Abril de 2000

O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

h u A t

f u A

