

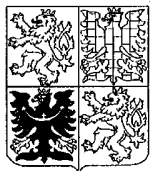
PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 3896

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **22.04.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **22.04.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/9808599**

(33) Země priority: **GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.05.2001**
(Věstník č. 5/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/GB99/01221**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/53963**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 49/22

(71) Přihlašovatel:

NYCOMED IMAGING AS, Oslo, NO;

(72) Původce:

Eriksen Morten, Oslo, NO;
Tolleshaug Helge, Oslo, NO;
Skurtveit Roald, Oslo, NO;
Cuthbertson Alan, Oslo, NO;
Ostensen Jonny, Oslo, NO;
Frigstad Sigmund, Trondheim, NO;
Rongved Pal, Oslo, NO;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Kombinovaný prostředek

(57) Anotace:

Podstatu řešení tvoří kombinovaný prostředek pro současné, oddělené nebo následné použití jako kontrastní prostředek při zobrazování pomocí ultrazvuku, prostředek obsahuje. (i) první prostředek, kterým je injekční vodné prostředí s obsahem dispergovaného plynu a materiálu pro stabilizaci tohoto plynu a (ii) druhý prostředek, kterým je injekční emulze typu olej ve vodě, v níž olejová fáze obsahuje difusibilní složku, schopnou difundovat in vivo do dispergovaného plynu a alespoň přechodně zvětšit jeho rozměr, přičemž tento prostředek dále obsahuje materiál pro stabilizaci emulze, materiál, přítomný na povrchu dispergované plynné fáze a materiál, přítomný na povrchu dispergované olejové fáze mají vzájemnou afinitu.

Kombinovaný prostředek

Oblast techniky

Vynález se týká kombinovaného prostředku pro zobrazování pomocí ultrazvuku zvláště nových kontrastních prostředků a jejich použití při zobrazování tkání, např. zobrazování jejich perfuse.

Dosavadní stav techniky

Je známo, že kontrastní prostředky, tvořené disperzí nebo mikrobublínkami plynů jsou zvláště účinné při zobrazování ultrazvukem vzhledem k nízké hustotě a stlačitelnosti mikrobublinek. Tyto disperze mikrobublinek mohou při příslušné stabilizaci umožnit vysoce účinné zobrazení např. cévního systému včetně malých cév v tkáních, a to často při velmi nízkých dávkách.

Použití zobrazování ultrazvukem pro měření perfuse, to znamená průtoku krve na jednotku hmotnosti tkáně, je velmi důležité například při detekci nádorů vzhledem k tomu, že nádorová tkáň je v typických případech prokrvena jinak než zdravá tkáň a také při zobrazování srdečního svalu, zejména při průkazu infarktu. Určitým problémem při používání známých kontrastních prostředků pro perfusi srdečního svalu je, že informace, získaná tímto způsobem, je zhoršována zeslabením, tvořeným kontrastním prostředkem, přítomným v srdečních komorách.

V současně projednávané mezinárodní patentové přihlášce WO-A-98/17324 téhož přihlašovatele, se uvádí, že zobrazování určité tkáně ultrazvukem, zejména pokud jde o perfusi srdečního svalu a jiných tkání, je možno dosáhnout a/nebo zlepšit použitím kontrastních prostředků s obsahem plynu, které umožňují dočasné a regulovatelné

zvětšení plynné fáze in vivo po podání prostředku. Prostředky tohoto typu je možno použít k vyvolání říditelné a časově omezené retence plynné fáze např. ve formě mikrobublinek v malých cévách tkání, čímž je možno zvýšit koncentraci plynu v takové tkáni a tím i její kontrastnost.

Takovéto využití plynu se značně liší od existujícího využití, při němž se nitrožilně podávají kontrastní látky, obsahující mikrobublínky plynu. V těchto běžných prostředcích se předpokládá, že je nezbytné zabránit zvětšování mikrobublinek tak, aby nedošlo k nebezpečné embolii do tkání. Z tohoto důvodu se také omezují podávané dávky a/nebo se užívají směsi plynů, volené tak, aby zvětšování bublinek in vivo bylo co nejmenší, zejména se brání difuze plynů z krve do mikrobublinek, jak bylo popsáno například v mezinárodních patentových přihláškách WO-A-95/03835 a WO-A-95/16467.

Podle mezinárodní patentové přihlášky WO-A-98/17324 se naopak prostředek, obsahující dispergovanou plynnou fázi podává společně s prostředkem, obsahujícím nejméně jednu látku, schopnou vytvářet in vivo dostatečný tlak plynu nebo par k vyvolání regulovatelného růstu dispergované plynné fáze vnitřní difuzí molekul plynů nebo par, tato složka je označována pro jednoduchost jako „difusibilní složka“. Je však zřejmé, že postupu se mohou účastnit i transportní mechanismy, odlišné od difuze, jak bude dále podrobněji vysvětleno.

Toto společné podávání prostředku, obsahujícího dispergovanou plynnou fázi a prostředku, obsahujícího difusibilní složku s příslušnou tekavostí, je v kontrastu s dřívějšími návrhy, které se týkaly podávání samotných tekavých látek, např. ve formě koloidů, schopných posunu fáze podle WO-A-94/16739. Kontrastní prostředky podle

WO-A-98/17324 umožňují řídit základní faktory, jako jsou pravděpodobnost a/nebo rychlost růstu dispergovaného plynu výběrem příslušných složek prostředku, podávaného společně s disperzí plynu, kdežto při podání samotných svrchu uvedených koloidů s posunem fáze, může dojít ke vzniku mikrobublinek, které nekontrolovatelně rostou a mohou růst až do rozsahu, při němž alespoň část těchto bublinek může vyvolat nebezpečné embolie např. v cévách srdečního svalu a mozku, jak bylo popsáno v Schwarz, Advances in Echo-Contrast 1994, 3, s. 48-49.

Bylo zjištěno, že ani podáním koloidů s posunem fáze nemusí vést k příslušné volatilizaci dispergované fáze in vivo a ke vzniku mikrobublinek plynu nebo par. V publikaci Grayburn a další, J. Am. Coll. Cardiol. 26 (5), 1995, s. 1340-1347 se uvádí, že může být zapotřebí předem aktivovat emulze perfluoropentanu pro dosažení zobrazení srdečního svalu u psů při dávkách dostatečně nízkých, aby nedošlo k hemodynamickým vedlejším účinkům. Aktivační postupy pro tyto koloidní disperze včetně použití podtlaku je popsáno v mezinárodní přihlášce WO-A-96/40282. V typických případech tato aktivace spočívá v tom, že se injekční stříkačka částečně naplní emulzí a pak se pohybuje pístem ve stříkačce tak, aby došlo k přechodným změnám tlaku, které vyvolají tvorbu mikrobublinek plynu v emulzi. Jde o techniku, poměrně nákladnou na čas, která přitom nemusí vyvolat dostatečnou aktivaci prostředku.

V souvislosti s koloidy s posunem fáze se v US-A-5536489 uvádí, že emulze ve vodě nerozpustných chemických látek, vytvářejících plyny, jako perfluoropentanu, je možno použít jako kontrastní prostředky pro specifické zobrazování tkání tak, že tyto emulze vytvoří mikrobublínky plynu po aplikaci ultrazvuku na specifické místo, které má být zobrazeno. Naše vlastní pokusy však prokázaly, že při podání emulzí těkavých látek, jako 2-methylbutanu

nebo perfluoropentanu nedošlo k žádnému pozorovatelnému zlepšení kontrastnosti při zobrazování ultrazvukem in vitro ani in vivo při úrovni energie ultrazvuku, dostatečné k dosažení kontrastu při použití dvousložkových kontrastních prostředků, popsanych v mezinárodní přihlášce WO-A-98/17324.

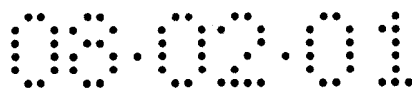
Kombinované prostředky podle WO-A-98/17324 jsou určeny pro současné, oddělené nebo následné použití při zobrazování ultrazvukem a obsahují:

- (i) injekční vodný prostředek s dispergovaným plynem a
- (ii) prostředek, obsahující difusibilní složku, schopnou difuze in vivo do dispergovaného plynu k alespoň přechodnému zvětšení bublinek.

Uvedené prostředky je možno s výhodou použít při zobrazování perfuse tkání, přičemž zvětšení velikosti bublinek dispergovaného plynu se využije ke zvýšení účinku zobrazení dočasnou retencí plynu v malých cévách tkání, čímž dojde ke zvýšení kontrastnosti této tkáně při zobrazení pomocí ultrazvuku.

Specifickou výhodou uvedeného prostředku je skutečnost, že růst dispergované fáze je možno vyvolat nebo zvýšit působením ultrazvuku nebo jiné formy energie včetně zvuku s vyšší nebo nižší frekvencí, než jaká je obvykle užívána, může jít o vibrace, protřepávání, působení energie elektrického pole nebo o bombardování částicemi, jako neutrálními částicemi, ionty nebo elektrony. Tímto způsobem je možno zvláště účinně řídit rychlost růstu dispergovaných částic plynu a lokalizovat růst těchto částic na specifické oblasti organismu tak, aby došlo k přechodné retenci plynu v malých cévách cílového orgánu, např. v srdečním svalu.

Vynález je založen na zjištění, že účinnost kontrastních prostředků typu, popsaného v WO-A-98/17324 je možno podstatně



zvýšit v případě, že oba prostředky jsou vytvořeny takovým způsobem, aby složka s dispergovaným plynem a difusibilní složka, měly k sobě navzájem afinitu např. v důsledku elektrostatických sil nebo jiných fyzikálních nebo chemických vazeb včetně vazeb biologických. Toho je možno dosáhnout tak, že se složka s dispergovaným plynem vytvoří jako stabilizovaná disperze plynu a difusibilní složka jako stabilizovaná emulze, takže materiál, přítomný na povrchu dispergovaného plynu má afinitu k materiálu, přítomnému na povrchu dispergované difusibilní složky. Tyto povrchové materiály, které mají k sobě vzájemnou afinitu, mohou být například smáčedla, stabilizující plyn a disperzi difusibilní složky. Je také možno povrchové materiály se vzájemnou afinitou mísit, chemicky vázat nebo jinak spojit se stabilizačními materiály bez afinity v uvedených disperzích.

I když není žádoucí se vázat na jakékoliv teoretické úvahy, je pravděpodobné, že výsledná afinita mezi dispergovaným plynem a difusibilní složkou zvyšuje pravděpodobnost interakce mezi těmito látkami např. 10krát až 100krát nebo i více, takže větší počet dispergovaných částic plynu poroste v dané dávce obou složek ve srovnání se situací, kde tyto složky nemají vzájemnou afinitu. To může platit zvláště v případech, kdy se užívá aktivace ultrazvukem nebo podobným způsobem k vyvolání růstu částic dispergovaného plynu. V situacích, kde mezi oběma složkami není afinita, může pravděpodobně ultrazvuk vést k rozpadu většího podílu dispergovaného plynu, takže dojde k taleko menší interakci s difusibilní složkou. Úroveň interakce je v tomto případě možno zvýšit použitím plynu a difusibilní složky se vzájemnou afinitou.

Kontrastní prostředky podle vynálezu je z tohoto důvodu možno použít v podstatně nižších dávkách, než jaké jsou navrhovány v mezinárodní přihlášce WO-A-98/17324, přičemž dosažený kontrast je srovnatelný. Toto zjištění je velmi cenné z hlediska bezpečnosti,

protože může umožnit použití emulzí difusibilní složky v tak malém množství, že odpadá jakékoliv riziko vzniku embolie v důsledku aplikace těkavé složky, a to i po zředění plyny z krve, jak bylo popsáno v publikaci J. Appl. Physiol. 40, 5, 1976, s. 745-751.

Je také možno nebo je současně možno snížit i dávku disperze plynu, což opět zvyšuje bezpečnost a je vhodné také z hlediska toxicity. Toto snížení dávky může také prodloužit dobu možného zobrazení např. při echokardiografii vzhledem k tomu, že se dispergovaný plyn rychleji dostává z komor a tím dovoluje daleko rychlejší a dokonalejší zobrazení plynu, který byl zadržen např. v srdečním svalu.

Mimo to bylo zjištěno, že kontrastní prostředky podle vynálezu mohou umožnit účinné zobrazení tkáně, např. srdečního svalu při použití běžných řadových vyšetřovacích postupů, jako B-postupu. To znamená, že energie ultrazvuku, vysílaná při vyšetření tímto způsobem je dostatečná k vyvolání růstu dispergované fáze plynu, která je pak zadržena v malých cévách tkáně a může poskytnout diagnosticky užitečnou informaci po dobu nejméně 5 až 10 minut, aniž by přitom došlo k rozpadu bublinek plynu. Tyto výsledky jsou zásadně odlišné od výsledků, jakých je možno dosáhnout při použití známých prostředků, které obvykle podléhají relativně rychlé degradaci při působení energie ultrazvuku a mohou proto vyžadovat použití složitějších technik, např. přerušovaného zobrazení k tomu, aby mohlo být dosaženo uspokojivých výsledků.

Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tvoří kombinovaný prostředek pro současné, oddělené nebo následné použití jako kontrastní prostředek při zobrazování pomocí ultrazvuku, prostředek obsahuje:

- (i) první prostředek, kterým je injekční vodné prostředí s obsahem dispergovaného plynu a materiálu pro stabilizaci tohoto plynu a
- (ii) druhý prostředek, kterým je injekční emulze typu olej ve vodě, v níž olejová fáze obsahuje difusibilní složku, schopnou difundovat in vivo do dispergovaného plynu a alespoň přechodně zvětšit jeho rozměr, přičemž tento prostředek dále obsahuje materiál pro stabilizaci emulze, materiál, přítomný na povrchu dispergované plyné fáze a materiál, přítomný na povrchu dispergované olejové fáze mají vzájemnou afinitu.

Vynález se rovněž týká zlepšeného způsobu zobrazování lidského nebo jiného živočišného organismu tak, že se

- (i) do cévního systému subjektu vstříkne první svrchu definovaný prostředek,
- (ii) před vstříknutím, v průběhu vstřikování nebo po vstříknutí tohoto prvního prostředku se vstříkne druhý svrchu definovaný prostředek,
- (iii) vytvoří se zobrazení alespoň části organismu pomocí ultrazvuku.

Potřebné afinity mezi povrchovými materiály prvního a druhého prostředku je možno dosáhnout například použitím materiálů s opačnými náboji, takže dochází ke vzájemné elektrostatické vazbě. To znamená, že např. jeden z povrchových materiálů může být kationtové smáčedlo a druhý aniontové smáčedlo, jak bude dále podrobněji rozvedeno. Rozdíl náboje mezi povrchovými materiály může být také dosažen zařazením příslušných kationtových a/nebo aniontových přísad do stabilizačních materiálů, např. smáčedel na povrchu jedné nebo obou dispergovaných fází obou prostředků. Povrchové materiály mohou také být tvořeny stabilizátorem nebo přísadami, které obsahují specifické skupiny, molekuly, ligandy nebo vektory, schopné interakce chemickými vazbami, jako je kovalentní vazba, vodíková vazba nebo iontová vazba. Povrchové materiály mohou tedy například obsahovat

antigen a protilátku nebo její fragment, lectin a skupinu typu uhlohydrátu, avidin/streptavidin a biotin nebo biotinylovou skupinu, účinnou látku a její receptor, přenašeč a jeho receptor, hormon a jeho receptor, peptid nebo protein a komplementární peptid nebo protein, enzym nebo neaktivní enzym a analog substrátu nebo inhibitor, nukleovou kyselinu (DNA nebo RNA) a komplementární nukleovou kyselinu, chelatační látku a ligand, přičemž tento seznam zdaleka neobsahuje všechny použitelné dvojice.

Obecně je možno uvést, že v prvním prostředku je jako plyn možno použít jakýkoliv biologický kompatibilní plyn, přičemž pojem „plyn“ v tomto případě zahrnuje jakoukoliv látku včetně směsí, která je alespoň částečně přítomna ve formě plynů nebo par při běžné tělesné teplotě člověka, 37 °C. S použitelných plynů je možno uvést vzduch, dusík, kyslík, oxid uhličitý, vodík, inertní plyny, jako helium, argon, xenon nebo krypton, fluoridy síry, jako hexafluorid nebo dekafluorid síry nebo pentafluorid trifluormethyl síry, hexafluorid selenu, silany, popřípadě halogenované, jako methylsilan nebo dimethylsilan, uhlohydráty s nízkou molekulovou hmotností obsahující např. až 7 atomů uhlíku, například alkany, jako methan, ethan, propan, butan nebo pentan, cykloalkany, jako cyklopropan, cyklobutan nebo cyklopentan, alkeny, jako ethylen, propen, propadien nebo buten nebo alkiny, jako acetylen nebo propin, ethery, jako dimethylether, ketony, estery, halogenované uhlovodíky s nízkou molekulovou hmotností, např. až do 7 atomů uhlíku nebo směsi těchto látek. S výhodou jsou alespoň některými atomy halogenu v halogenovaných plynech atomy fluoru. Biologicky kompatibilní halogenované uhlovodíky je tedy např. možno volit ze skupiny brom, chlor, difluormethan, chlordifluormethan, dichlordifluormethan, bromtrifluormethan, chlortrifluormethan, chorpentafluorethan, dichlortetrafluorethan, chlortrifluorethylen, fluorethylen, ethylfluorid, 1,1-difluorethan a perfluorované uhlovodíky. Reprezentativními perfluorovanými uhlovodíky jsou perfluoralkany,

jako perfluorethan, perfluorpropany, perfluorbutany, jako perfluor-n-butan, popřípadě ve směsi s dalšími isomery, jako perfluorisobutanem, perfluorpentany, perfluorhexany nebo perfluorheptany, perfluoralkeny, jako jsou perfluorpropen, perfluorbuteny, např. perfluorbut-2-en, perfluorbutadien, perfluorpenteny, jako perfluorpent-1-en, nebo perfluor-4-methylpent-2-en, perfluoralkiny, jako perfluorbut-2-in a perfluorcykloalkany, jako perfluorcyklobutan, perfluormethylcyklobutan, perfluordimethylcyklobutany, perfluortrimethylcyklobutany, perfluorcyklopentany, perfluormethylcyklopentany, perfluordimethylcyklopentany, perfluorcyklohexan, perfluormethylcyklohexan nebo perfluorcykloheptan. Další halogenované plyny jsou methylchlorid, fluorované nebo perfluorované ketony, jako perfluoraceton a fluorované nebo perfluorované ethery, jako perfluordiethylether. Použití perfluorovaných plynů, např. hexafluoridu síry nebo perfluorovaných uhlovodíků, jako perfluorpropanu, perfluorbutanu, perfluorpentanu a perfluorhexanu může být zvláště výhodné vzhledem k vysoké stálosti mikrobublinek s obsahem těchto plynů v krevním oběhu. Je možno použít i jiné plyny s takovými fyzikálně chemickými vlastnostmi, které vedou k tvorbě vysoce stálých mikrobublinek v krevním oběhu.

Plyn může být v prvním prostředí například ve formě mikrobublinek, alespoň částečně zapouzdřených nebo jinak stabilizovaných stabilizačním materiálem. Stabilizační materiál může být tvořen např. povrchovou membránou, odolnou proti spojování mikrobublinek, může jít např. o želatinu podle WO-A-8002365, bílkovina tvořící film, například albumin jako lidský sérový albumin, např. podle US-A-4718433, US-A-4774958, US-A-4844888, EP-A-0359246, WO-A-9112823, WO-A-9205806, WO-A-9217213, WO-A-9406477 nebo WO-A-9501187, dále může jít o polymerní materiál, např. syntetický biologicky degradovatelný polymer podle EP-A-

0398935, elastickou syntetickou polymerní membránu podle EP-A-0458745, mikročasticový biologicky degradovatelný polyaldehyd podle EP-A-0441468, mikročasticový derivát N-dikarboxylové kyseliny s polyaminokyselinou nebo polycyklickým imidem podle EP-A-0458079 nebo biologicky degradovatelný polymer podle WO-A-9317718 nebo WO-A-9607434, nepolymerní a nepolymerovatelný materiál pro tvorbu přepážek podle WO-A-9521631 nebo smáčedlo, například sledový kopolymer polyoxyethylenu a polyoxypropylenu, jako Pluronic, polymerní smáčedlo podle WO-A-9506518 nebo smáčedlo, vytvářející film, například fosfolipid podle WO-A-9211873, WO-A-9217212, WO-A-9222247, WO-A-9428780, WO-A-9503835 nebo WO-A-9729783.

První prostředek může být také odvozen od pevných systémů s obsahem plynu, může jít například o mikročástice, zvláště agregáty nebo shluky mikročastic, které uzavírají plyn mezi sebou nebo jsou jinak vyplněny plynem, který může být například adsorbován na povrchu částic, a/nebo obsažen ve štěrbinách, dutinách nebo pórech, například podle EP-A-0122624, EP-A-0123235, EP-A-0365467, WO-A-9221382, WO-A-9300930, WO-A-9313802, WO-A-9313808 nebo WO-A-9313809. Je zřejmé, že echogenita takového kontrastního prostředku s obsahem mikročastic může být odvozena přímo od obsaženého plynu a/nebo od plynu, uvolněného z pevného materiálu, např. po rozpuštění mikročasticové struktury.

Mikrobublinky plynu nebo jiné materiály, obsahující plyn, jako jsou mikročástice, mají s výhodou počáteční střední průměr nepřevyšující 10 mikrometrů, např. 7 mikrometrů nebo menší tak, aby volně prošly po podání např. nitrožilní injekcí plicním systémem. Je však možno použít i větší mikrobublinky v případě, že tyto bublinky obsahují jeden plyn nebo směs plynů, relativně rozpustných v krvi nebo jinak difundovatelných plynů, jako vzduchu, kyslíku, dusíku nebo oxidu uhličitého s nedifundovatelnými plyny, jako perfluorovanými

uhlovodíky. Difuze rozpustných nebo difuze schopných plynů po podání způsobí rychlé zmenšení mikrobublinek na rozměr, který bude určován množstvím nerozpustného nebo difuze neschopného plynu, tento rozměr je možno volit tak, aby výsledné mikrobublínky prošly plicními kapilárami.

Vzhledem k tomu, že bublinky dispergovaného plynu, podané podle vynálezu se in vivo zvětšují interakcí s difusibilní složkou, mohou být minimální rozměry mikrobublinek při podání podstatně nižší než rozměry, které se obvykle považují za nezbytné k dosažení interakce s ultrazvukem, což je typicky 1 až 5 mikrometrů při běžně užívaných zobrazovacích frekvencích. Mikrobublínky mohou mít z tohoto důvodu například rozměr pouze 1 nm nebo ještě nižší. To znamená, že vynález dovoluje použití prostředků s obsahem plynu, které až dosud nebylo možno navrhovat pro zobrazování ultrazvukem např. vzhledem k příliš malému rozměru bublinek dispergovaného plynu.

V případě, že se užije první prostředek s obsahem fosfolipidů, například ve formě mikrobublinek plynu, stabilizovaných fosfolipidem, je možno z použitelných fosfolipidů uvést lecithiny, jako fosfatidylcholin, může jít např. o přírodní lecithiny z vaječného žloutku nebo ze sojových bobů, polosyntetické, např. částečně nebo plně hydrogenované lecithiny a také syntetické lecithiny, jako jsou dimyristoylfosfatidylcholin, dipalmitoylfosfatidylcholin, nebo distearoylfosfatidylcholin, fosfatidové kyseliny, fosfatidylethanolaminy, fosfatidylseriny, fosfatidylglyceroly, fosfatidylinositoly, kardiolipiny, sfingomyeliny, fluorované analogy těchto látek, jejich směsi a směsi s dalšími lipidy, jako cholesterolem. Zvláště výhodné může být použití fosfolipidů, které převážně, například alespoň ze 70 % obsahují molekuly, nesoucí náboj, například negativní náboj, tak jak tomu je v přírodních látkách ze sojových bobů nebo z vaječného žloutku v

polosyntetických látkách, např. v částečně nebo plně hydrogenovaných a v syntetických látkách typu fosfatidylserinů, fosfatidylglycerolů, fosfatidylinositolů, fosfatidových kyselin a/nebo kardiolipinů, popsaných např. ve WO-A-9729783.

Reprezentativními příklady mikročástic s obsahem plynu, využitelných v prvním prostředku podle vynálezu mohou být uhlohydráty, např. hexózy jako glukóza, fruktóza nebo galaktóza, disacharidy, jako sacharóza, laktóza nebo maltóza, pentózy, jako arabinóza, xylóza nebo ribóza, alfa-, beta- a gammacyklodextriny, polysacharidy, jako škrob, hydroxyethylškrob, amylóza, amylopektin, glykogen, inulin, pulullan, dextran, karboxymethyldextran, dextranfosfát, ketodextran, aminoethyldextran, algináty, chitin, chitosan, kyselina hyaluronová nebo heparin a také alkoholy, odvozené od cukrů včetně alditolů, jako jsou manitol nebo sorbitol, dále může jít o anorganické soli, jako chlorid sodný, organické soli, jako citrát, acetát nebo tartrát sodný, kontrastní látky pro zobrazování rtg paprsky, např. běžně dodávané kontrastní látky na bázi karboxylových kyselin a neiontových amidů, které obsahují nejméně jednu 2,4,6-trijodfenylovou skupinu s různými substituenty ze skupiny karboxyl, karbamoyl, N-alkylkarbamoyl, N-hydroxyalkylkarbamoyl, acylaminoskupina, N-alkylacylaminoskupina nebo acylaminomethyl v poloze 3 a/nebo 5, může tedy jít o prostředky typu kyseliny metrizoové, diatrizoové, iothalamové, ioxaglové nebo o prostředky iohexol, iopentol, iopamidol, iodixamol, iopromid, metrizamid, iodipamid, megluminiodipamid, megluminacetризоát a meglumindiatrizolát, použitelné jsou také polypeptidy a proteiny, jako želatina nebo albumin, např. lidský sérový albumin.

Dalšími materiály s obsahem plynu, využitelnými v prvním prostředku podle vynálezu, jsou materiály o bsahem plynu, stabilizované pomocí kovů, např. podle US-A-3674461 nebo US-A-

3528809, dále materiály s obsahem plynu, stabilizované syntetickými polymery podle US-A-3975194 nebo podle Farnand Powder Technology, 22 (1979), pp. 11-16, použitelné jsou také běžně dodávané mikrokuličky typu Expancel^R, např. Expancel 551 DE podle Eur. Plast. News 9(5), 1982, s. 39, Nonwovens Industry (1981), s. 21 a Mat. Plast. Elast. 10, 1980, s. 468, dále běžně dodávané mikrokuličky typu Ropaque^R podle J. Coatings Technol. 55 (707), 1983, s. 79 a také struktury s obsahem plynu s velikostí částic v mikrometrech a nanometrech, jako jsou zeolity, anorganické nebo organické aerogely, chemické struktury s otevřenými štěrbinami, jako fullereny, nebo clathraty, popsány například v G. E. Gadd, Science 277, 5328, 1997, s. 933-936 a také mikrobublínky přírodních smáčedel, stabilizované ve forma disperze a popsány např. v publikaci d'Arrigo, Stable Gas-in-Liquid Emulsions, Studies in physical and theoretical chemistry 40 - Elsevier, Amsterdam (1986).

Dispergovaná olejová fáze ve druhém prostředí podle vynálezu může být tvořena jakoukoliv příslušnou difusibilní složkou, která je alespoň zčásti nerozpustná ve vodě a nemísitelná s vodou. Difusibilní složka v takových emulzích je s výhodou kapalná při teplotě zpracování a skladování, například až do -10 °C v případě, vodná fáze obsahuje vhodný materiál proti zmrtznutí, současně se však má tento materiál nacházet ve formě plynu nebo páry při teplotě těla. Vhodné sloučeniny je možno volit z celé řady emulgovatelných kapalin s nízkou teplotou varu, tak, jak jsou uvedeny například ve WO-A-9416379. Specifickými příklady emulgovatelných difusibilních složek mohou být alifatické ethery jako diethylether, polycyklické oleje nebo alkoholy, jako mentol, kafr, nebo eukalyptol, heterocyklické sloučeniny, jako furan nebo dioxan, alifatické uhlovodíky, které mohou být nasycené nebo nenasycené a mohou mít přímý nebo rozvětvený řetězec, může jít např. o n-butan, n-pentan, 2-methylpropan, 2-methylbutan, 2,2-dimethylpropan, 2,2-dimethylbutan, 2,3-dimethylbutan, 1-buten,

2-buten, 2-methylpropen, 1,2-butadien, 1,3-butadien, 2-methyl-1-buten, 2-methyl-2-buten, isopren, 1-penten, 1,3-pentadien, 1,4-pentadien, butenyn, 1-butin, 2-butin nebo 1,3-butadiin, cykloalifatické uhlovodíky, jako cyklobutan, cyklobuten, methylcyklopropan nebo cyklopentan, halogenované uhlovodíky s nízkou molekulovou hmotností, např. s obsahem až 7 atomů uhlíku. Reprezentativními halogenovanými uhlovodíky pro toto použití mohou být dichlormethan, methylbromid, 1,2-dichlorethylen, 1,1-dichlorethan, 1-bromethylen, 1-chlorethylen, ethylbromid, ethylchlorid, 1-chlorpropen, 3-chlorpropen, 1-chlorpropan, 2-chlorpropan a terc.butylchlorid. S výhodou jsou alespoň některými atomy halogenu atomy fluoru a může tedy jít například o dichlorfluormethan, trichlorfluormethan, 1,2-dichlor-1,2-difluorethan, 1,2-dichlor-1,1,2,2-tetrafluorethan, 1,1,2-trichlor-1,2,2-trifluorethan, 2-brom-2-chlor-1,1,1-trifluorethan, 2-chlor-1,1,2-trifluorethyldifluormethylether, 1-chlor-2,2,2-trifluorethyldifluormethylether, částečně fluorované alky, jako pentafluoropropany, např. 1H,1H,3H-pentafluorpropan, hexafluorbutany, nonafluorbutany, jako 2H-nonafluor-terc.butan, dekafluorpentany, jako 2H,3H-dekafluorpentan a tridekafluorhexany, jako 1H-tridekafluorhexan, dále může jít o částečně fluorované alkeny, např. heptafluorpenteny, jako 1H,1H,2H-heptafluorpent-1-en a nonafluorhexeny, jako 1H,1H,2H-nonafluorhex-1-en, fluorované ethery, např. 1,1,2,2-tetrafluorethylmethylether, 2,2,3,3,3-pentafluorpropylmethylether, 1,1,2,3,3,3-hexafluorpropylmethylether nebo 2,2,3,3,3-pentafluorpropyldifluormethylether, ještě výhodnějšími látkami jsou perfluorované uhlovodíky. Jako příklady těchto perfluorovaných uhlovodíků lze uvést perfluorované alky, jako jsou perfluorbutany, perfluorpentany, perfluorhexany, jako perfluor-2-methylpentan, perfluorheptany, perfluoroktany, perfluornonany a perfluordekany, dále perfluorcykloalkany, jako perfluorcyklobutan, perfluordimethylcyklobutany, perfluorcyklopentan a perfluormethylcyklopentan, perfluoralkeny, jako perfluorbuteny, např.

perfluorbut-2-en, nebo perfluorbuta-1,3-dien, perfluorpenteny, jako perfluorpent-1-en a perfluorhexeny, jako perfluor-2-methylpent-2-en nebo perfluor-4-methylpent-2-en, perfluorcykloalkeny, jako jsou perfluorcyklopenten nebo perfluorcyklopentadien a perfluorované alkoholy, jako perfluor-terc.butanol.

Je-li to vhodné, je možno difusibilní složku vytvořit jako součást běžně užívané farmaceutické emulze, např. prostředku Intralipid^R (Pharmacia).

Podle dalšího provedení vynálezu může být olejová fáze směsí dvou kapalin, přičemž první kapalinou může být svrchu uvedený perfluorovaný uhlovodík, jako perfluordimethylcyklobutan a druhou může být těkavé lipofilní „plnivo“, které má poněkud vyšší rozpustnost ve vodě, například halogenovaný inhalační anestetický prostředek nebo uhlovodík. Účelem plniva je vyvolat nespecifické zvětšení průměru mikrobublinek. Po zahájení růstu dispergované plynné fáze se bublinky budou po počátečním růstu rychle zmenšovat v důsledku ztráty uvedeného plniva difusí. Zbývající bublinky pak budou obsahovat pouze první těkavou sloučeninu s nižší rozpustností ve vodě a v krevních plynech a budou mít menší velikost, kterou je možno řídit příslušnou volbou počátečního poměru obou těkavých kapalin v difusibilní složce emulze. Poměr mísení obou kapalin může být např. 1:9 pro poměr perfluorovaného uhlovodíku a plniva.

Stabilizační materiál pro emulzi může v typických případech obsahovat jedno nebo větší počet smáčedel. Je zřejmé, že povaha takového smáčedla může podstatně ovlivnit různé faktory, např. rychlost růstu bublinek dispergované fáze plynu. Obecně je možno použít širokou škálu smáčedel, je např. možno použít smáčedla, podrobně uvedená v EP-A-0727225. Reprezentativními příklady použitelných smáčedel mohou být mastné kyseliny, např. nasycené

nebo nenasycené mastné kyseliny s přímým řetězcem, obsahující např. 10 až 20 atomů uhlíku a jejich estery s uhlohydráty a triglyceridy, dále fosfolipidy jako lecithin, fosfolipidy s obsahem fluoru, proteiny, jako albuminy, např. lidský sérový albumin, polyethylenglykoly smáčedla typu sledových kopolymerů, jako jsou sledový kopolymer polyoxyethylenu a polyoxypropylenu, jako Pluronic, extendované polymery, jako acyloxyacylpolyethylenglykoly, jako polyethylenglykomethylether-16-hexadekanoyloxyhexadekanoát, v němž polyethylenglykolová skupina může mít molekulovou hmotnost například 2300, 5000 nebo 10 000, použít je možno také smáčedla s obsahem fluoru, dodávaná pod obchodními názvy Zonyl a Fluorad nebo popsána ve WO-A-9639197 a kationtová smáčedla, která mohou obsahovat jednu nebo větší počet kvarterních amoniových skupin a jednu nebo větší počet lipidových skupin, může jít např. o alkylové nebo alkanoylové skupiny s dlouhým řetězcem s obsahem 10 až 30 atomů uhlíku.

Zvláště výhodné může být použití kationtových látek, jako smáčedel nebo jiných stabilizátorů nebo přísad ke stabilizátorům v povrchovém materiálu difusibilní složky podle vynálezu ve spojení s disperzí plynu, obsahující aniontové povrchové materiály, např. negativně nabitě fosfolipidy, jako jsou přírodně se vyskytující materiály ze sojových bobů nebo vaječného žloutku, polosyntetické materiály, např. částečně nebo plně hydrogenované materiály nebo syntetické materiály typu fosfolipidů, jako jsou fosfatidylseriny, fosfatidylglyceroly, fosfatidylinositoly, fosfatidové kyseliny a kardiolipiny, důvodem je elektrostatická interakce mezi oběma povrchovými materiály.

Obecně je možno použít širokou škálu látek kationtové povahy, např. alespoň poněkud hydrofobní a/nebo v podstatě ve vodě nerozpustné sloučeniny s bazickým atomem dusíku, jako jsou primární aminy, sekundární aminy, terciární aminy a alkaloidy včetně

pyrrolidinů, piperidinů, imidazolů, pyridinů, chinolinů a alkyl- a arylguanidiniových sloučenin. Jako příklad reprezentativních kationtových látek lze uvést lipofilní kvarterní amoniové nebo piridiniové soli, jako didodecyldimethylamoniumbromid, cetyltrimethylamoniumchlorid, cetylpyridiniumchlorid, cetyltrimethylamoniumbromid, Quaternium-26, oleyltrimethylamoniumchlorid, cetylethyldimethylamoniumbromid, lapyriumchlorid, Halimid, cetalkoniumchlorid, 1,2-distearoyl-3-trimethylamoniumpropan, betaincetyléster nebo DC-cholesterol, dále může jít o lipofilní sekundární nebo terciární aminy, jako jsou diethylstearylamin, methylstearylamin, dimethylsfingosin, estery mastných alkoholů s dimethylglycinem, estery mastných kyselin s dimethylethanolaminem, estery mastných alkoholů se sarkosinem nebo estery mastných alkoholů s N(2)- nebo N(6)- dimethyllysinem, amidy mastných kyselin se substituovanými di- nebo triaminy, jako N-stearoyl-N'-dimethylaminopropylamin, primární aminy, jako stearylamin nebo dodecylamin, estery mastných alkoholů s aminokyselinami, jako alaninem, lysinem, serinem nebo threoninem, např. alanincetyléster nebo lysincetyléster, dále amidy mastných kyselin s di- nebo triaminy, jako monostearoyldiaminopropan nebo monostearoylputrescin, nebo pozitivně nabitý fosfolipidy, jako dialkyl-sn-glyceroethylfosfatidylcholinu nebo estery fosfatidových kyselin, jako jsou kyselina dipalmitoylfosfatidová nebo distearoylfosfatidová s aminoalkoholy, jako lysinhydroxyethylamid, hydroxylysinethylester, 1,3-diamino-2-propanol nebo 2,4-diaminobenzylalkohol. Lipofilní kationtové sloučeniny, obsahující kladně nabitý atom, odlišný od atomu dusíku jsou rovněž použitelné, může například jít o kladně nabitý atom síry v sulfoniových sloučeninách, o atom jodu v jododiových sloučeninách, selenu nebo fosforu, např. ve fosfoniových sloučeninách, použitelné jsou také komplexy kovů s kladným nábojem.

Vhodnými kationtovými látkami jsou sloučeniny endogenního původu, jako jsou sfingosiny, DL-dihydrosfingosin, dimethylsfingosin, fytosfingosin nebo psykosin nebo sloučeniny, které se snadno rozkládají na endogenní sloučeniny, jako jsou estery nebo amidy cholinu, ethanolaminu, putrescinu, lysinu, argininu, glycinu, sarkosinu, dimethylglycinu, karnitinu, betainu nebo spermidinu, může jít např. o ester cetylbetainu nebo obecně o deriváty aminokyselin. Výhodné může být také použití kationtových smáčedel s obsahem fluoru, jako jsou kladně nabitě fluorované fosfolipidy nebo běžně dodávaná kationtová fluorovaná smáčedla, jako je Zonyl.

Druhý prostředek může být vstřikován např. nitrožilně, nitrosvalově nebo podkožně. Podkožní nebo nitrosvalové podání může být výhodné v případě, že je žádoucí omezit účinek difusibilní složky na určitou cílovou oblast. Příkladem může být podkožní injekce prostředku s velikostí částic řádu nanometrů, tak jak se užívá při zobrazení lymfatických cest.

Velikost částic emulze, určené pro nitrožilní podání, by s výhodou měla být nižší než 10, např. nižší než 7 mikrometrů a na druhé straně větší než 0,1 mikrometru tak, aby prostředek mohl bez obtíží projít plicním systémem. Je výhodné použít první a druhý prostředek s přibližně stejným rozměrem dispergovaných mikrobublinek plynu a dispergovaných kapiček difusibilní látky, např. v rozmezí 1 až 7, např. 2 až 6 mikrometrů.

V případě potřeby může být difusibilní složka rovněž zpracována jako emulze. Takové systémy typu mikroemulze jsou výhodné vzhledem k jejich termodynamické stabilitě a také ke skutečnosti, že difusibilní složka je ve vodné fázi rovnoměrně rozdělena. Taková mikroemulze má obecně vzhled roztoku, může však mít některé vlastnosti emulze, pokud jde o parciální tlak dispergované fáze.

Jak již bylo uvedeno, dovoluje vynález použití podstatně nižších dávek difusibilní složky a emulze s obsahem této složky, než bylo dosud možné. Kontrastní prostředky koloidního typu s posunem fáze, popsané např. Ve WO-A-9416739 se typicky podávají v množství přibližně 0,1 ml dispergované fáze/kg tělesné hmotnosti. Ve WO-A-9817324 se uvádí, že v případě, že difusibilní složkou je perfluorovaný uhlovodík ve formě emulze typu olej ve vodě, podává se tato emulze v typických případech v dávce, odpovídající 0,2 až 1,0 mikrolitru perfluorovaného uhlovodíku/kg hmotnosti. Vynález dovoluje vytvářet obrazy, srovnatelné s obrazy podle WO-A-9817324 při použití nejméně 20krát, obecně však až 200krát nižší dávky difusibilní složky, např. v rozmezí 1 až 100 nl difusibilní složky/kg hmotnosti nebo až 20 nl difusibilní složky/kg hmotnosti.

Difusibilní složka v emulzi má při odpařování schopnost zvětšit svůj objem nejméně 100krát, přesto však v uvedených dávkách bude celkové množství difusibilní složky obecně nedostatečné pro vznik rizika embolie. Mimo to jsou takové dávky pod hranicí, při níž by mohly vznikat samovolně bublinky plynu v oběhu v místech nízkého žilního tlaku, např. v duté žíle, v pravé srdeční komoře a v plicní tepně v důsledku přesycení krve krevními plyny a těkavou difusibilní složkou.

Aby bylo možno zajistit maximální těkavost difusibilní složky po podání a tak podpořit růst dispergované fáze (oba pochody jsou endothermní), může být výhodné před podáním pozměnit teplotu prvního a/nebo druhého prostředku a/nebo přidat reaktivní exothermní složku. Použití složek, které reagují exothermně vlivem ultrazvuku, může být zvláště výhodné.

Růst dispergované fáze in vivo může být doprovázen např. rozepnutím zapouzdřujícího stabilizačního materiálu v případě, že je

tento materiál dostatečně elastický a/nebo přenesením přebytku smáčedla nebo jiného stabilizačního materiálu, např. z druhého prostředku na rozhraní mezi rostoucími bublinkami plynu a kapalinou. Je však také možné, že napnutí zapouzdřujícího materiálu a/nebo interakce tohoto materiálu s ultrazvukem podstatně zvýší jeho poréznost. Při rozrušení zapouzdřujícího materiálu bylo možno až dosud pozorovat rychlou ztrátu kontrastu rychlou difuzí a rozpuštěním plynu, při podávání prostředku podle vynálezu, je však tento plyn v podstatě stabilní. I když není zapotřebí se vázat na jakékoliv teoretické výpočty, je pravděpodobné, že uvolněné mikrobublinky plynu mohou být stabilizovány proti kolapsu přesyceným okolním prostředím, vytvořeným difusibilní složkou, což vytváří gradient vnitřního tlaku, který působí proti tendenci difuze mikrobublinek plynu. Povrch plynu, v podstatě prostý zapouzdřujícího materiálu, může v tomto případě dovolit dosažení výjimečně příznivých akustických vlastností, zejména odrazu a absorpce podílu s nízkou energií, takže echogenní účinek může přetrvávat po poměrně dlouhou dobu i v průběhu ozařování ultrazvukem.

Stabilizační účinek současně podávané difusibilní složky může tedy být využit ke zvýšení echogenity kontrastního prostředku i k prodloužení trvání tohoto účinku v těch případech, kde by uvedené parametry byly nedostatečné v případě, že by kontrastní prostředek byl podán sám o sobě. Např. trvání účinku kontrastních prostředků na bazi albuminu je často velmi omezeno kolapsem částic zapouzdřeného albuminu v důsledku systolického tlaku v srdci nebo v žilním systému nebo v důsledku ozáření ultrazvukem, toto trvání však může být podstatně prodlouženo současným podáváním s difusibilní složkou podle vynálezu.

V reprezentativním provedení způsobu a prostředku podle vynálezu se může volit prostředek s dispergovanou fází a prostředek s

emulgovanou difusibilní složkou tak, že po nitrožilní injekci obou složek projde alespoň část dispergovaného plynu plicemi a pak se bublinky plynu rychle zvětšují po průchodu plicemi difuzí difusibilní složky, takže dojde k dočasnému zadržení v srdečním svaly a tím se umožní zobrazení průtoku krve srdečním svalem pomocí ultrazvuku. Vzhledem k tomu, že těkavá difusibilní složka v krevním proudu je postupně odstraněna plicemi a vydechováním, metabolismem nebo redistribucí do jiných tkání, bude difusibilní složka typicky difundovat z dispergovaného plynu a jeho bublinky se tedy zmenší na původní menší velikost, takže budou znovu volně procházet nejmenšími cévami a budou odstraněna retikuloendotheliálním systémem. Tento postup prechodného zvětšení echogenity, následovaný postupným vymizením tohoto účinku, je značně odlišný od účinku obou látek v případě, že jsou podány samy o sobě. Vhodnou úpravou dávky a/nebo složení difusibilní složky a zvláště vhodnou úpravou povahy a stupně afinity mezi plynou složkou a difusibilní složkou, je možno řídit trvání účinku výsledné kombinace.

Podobným způsobem je možno zobrazit i jiné kapilární systémy, např. v ledvinách, játrech, slezině, štítné žláze, kosterních svalech, mléčné žláze, prostatě apod.

Obecně je tedy možno uvést, že rychlost a/nebo rozsah růstu bublinek dispergovaného plynu je možno řídit volbou tohoto plynu a volbou stabilizačního materiálu pro tento plyn a zvláště povahou emulgované difusibilní složky a způsobem jejího zpracování včetně povahy stabilizačního materiálu pro emulzi a velikosti částic emulze. V této souvislosti je možno uvést, že při daném množství emulgované difusibilní složky může zmenšení velikosti kapek urychlit přenos difusibilní složky ve srovnání s většími kapkami vzhledem k tomu, že z malých kapiček, které mají větší poměr povrchové plochy k objemu, se může materiál rychleji uvolnit. Dalšími parametry, které dovolují úpravu,

jsou relativní množství v němž jsou oba prostředky podány a v případě odděleného podání také pořadí jejich podání, časový interval mezi jejich podáním a vzdálenost místa podání. V této souvislosti je zřejmé, že difusibilitnost difusibilní složky může dovolit podání této složky na odlišnou část organismu odlišným způsobem, např. podkožně, nitrožilně nebo nitrosvalově.

Zvláště důležitými parametry difusibilní složky je její rozpustnost ve vodě a v krvi a schopnost difuze, např. vyjádřená difusní konstantou, která určuje rychlost transportu nosnou kapalinou nebo krví a také permeabilita jakoukoliv membránou stabilizačního materiálu pro zapouzdření dispergovaného plynu. Tlak, vytvořený difusibilní složkou in vivo, tedy ovlivní rychlost difuze do dispergovaného plynu stejně jako koncentrace této látky. Podle Fickova zákona tedy bude koncentrační gradient difusibilní složky relativně k vzájemné vzdálenosti jednotlivých mikrobublinek plynu a kapek emulze spolu s koeficientem difuze difusibilní složky v okolním kapalném prostředí určovat rychlost přenosu jednoduchou difusí. Koncentrační gradient je určován rozpustností difusibilní složky v okolním prostředí a vzdáleností mezi jednotlivými mikrobublinkami plynu a kapičkami emulze. Podobně bude rozpustnost ve vodě, tlak par a rozměr molekul difusibilní složky ovlivňovat dobu trvání expendovaných mikrobublinek vlivem těchto parametrů na rychlost difuze difusibilní složky. Tímto způsobem je možno řídit trvání kontrastního účinku, optimálně v rozmezí 2 až 5 minut.

Účinnou rychlost transport difusibilní složky je možno řídit úpravou viskosity prostředku s dispergovanou plynou fází a/nebo prostředku s difusibilní složkou. Toho je možno dosáhnout například přidáním biologicky kompatibilních látek, zvyšujících viskozitu, např. kontrastních látek pro zobrazení pomocí rtg-záření nebo je možno zařadit jiné běžné látky, jako polyethylenglykoly, uhlohydráty, proteiny,

polymery nebo alkoholy. Může být například výhodné vstříkovat společně oba prostředky ve formě dávky s poměrně vysokým objemem, např. nejméně 20 ml v případě člověka s hmotností 70 kg vzhledem k tomu, že tento postup zpozdí úplné promísení obou složek s krví a tedy i nástup růstu kapiček dispergovaného plynu až do přívodu kapiček do pravé komory srdeční a do plicních kapilár. Toto zpoždění je možno ještě zvětšit použitím nosné kapaliny, která není nasycená plyny a jinými difusibilními složkami např. v důsledku svého předběžného ochlazení.

Jak již bylo svrchu uvedeno, je možno použít při provádění vynálezu i jiného transportního mechanismu nebo difuze. K transportu může docházet také hydrodynamickým průtokem v okolním kapalném prostředí. To může být důležité v cévách a kapilárách, v nichž při průtoku dochází k vysokému stříhovému namáhání. K transportu difusibilní složky do dispergovaného plynu může také dojít v důsledku kolize mezi mikrobublinkami plynu a kapičkami emulze, což může vést k adsorpci difusibilní složky na povrch mikrobublinek a/nebo k průniku difusibilní složky do mikrobublinek např. spojením obou útvarů. V těchto případech má koeficient difuze a rozpustnost difusibilní složky minimální vliv na přenos, takže velikost částic difusibilní složky, například velikost kapiček v případě emulze a frekvence kolize mezi mikrobublinkami a kapičkami emulze jsou základními faktory, které řídí rychlost a rozsah růstu mikrobublinek. Při daném množství emulgované difusibilní složky tedy zmenšení velikosti kapiček povede ke zvýšení počtu kapiček a tím i ke zvětšení rychlosti přenosu zmenšením vzdálenosti mezi mikrobublinkami plynu a kapičkami emulze a tím zvýšením pravděpodobnosti kolize a/nebo spojení obou útvarů. Jak již bylo svrchu uvedeno, může být rychlost přenosu pomocí kolize značně zvýšená přídatným oscilačním pohybem mikrobublinek plynu a kapiček emulze difusibilní složky pod vlivem ultrazvuku. Kinetika kolize, vyvolaná energií ultrazvuku se může lišit od kinetiky

transportu difusibilní složky v nosné kapalině a/nebo v krvi např. tím, že může být zapotřebí použít určitou specifickou úroveň energie k vyvolání spojování kolidujících mikrobublinek plynu a kapiček emulze. Může tedy být výhodné volit velikost a tím i hmotnost kapiček emulze tak, aby kolize s oscilujícími mikrobublínkami plynu byla dostatečná pro spojení obou útvarů.

Jak již bylo uvedeno svrchu, je permeabilita jakéhokoliv stabilizačního materiálu pro zapouzdření dispergované plynné fáze parametrem, který může ovlivnit rychlost růstu plynné fáze a může tedy být žádoucí volit difusibilní složku s dobrou permeabilitou takového zapouzdřujícího materiálu. Může jít např. o membránu z polymeru nebo smáčedla, tvořenou např. jednou vrstvou nebo větším počtem vrstev nebo dvojvrstev smáčedla, jako fosfolipidu. Nyní bylo zjištěno, že je možno použít také v podstatě impermeabilní zapouzdřující materiál vzhledem k tomu, že přívod ultrazvuku nebo jiného typu energie může vyvolat růst plynné fáze přes přítomnost takového impermeabilního materiálu.

Přestože není zapotřebí se vázat na jakékoliv teoretické úvahy, je možné, že ultrazvuk alespoň přechodně mění permeabilitu zapouzdřujícího materiálu, schopnost difuze difuzibilní složky v okolní kapalně fázi a/nebo frekvenci kolizí mezi kapičkami emulze a zapouzdřenými mikrobublínkami. Tento účinek může být pozorován při použití velmi krátkých ultrazvukových pulzů, např. s trváním přibližně 0,3 mikrosekund při zobrazení B-způsobu nebo přibližně 2 mikrosekundy při zobrazování pomocí Dopplerova ultrazvuku nebo druhé harmonické, pravděpodobně však nejde o stálé zvětšování průměru bublinek plynu (Leighton, E. G., *The Acoustic Bubble*, Academic Press, 1994, s. 379, spíše jde o jev, kdy ultrazvuk rozruší zapouzdřující membránu a tak podporuje růst dispergované fáze difusí difusibilní složky do takto otevřené plynné fáze.

V případě potřeby mohou být dispergovaný plyn nebo difusibilní složka tvořeny azeotropní směsí nebo je možno jejich složení volit tak, že se azeotropní směs tvoří in vivo při mísení difusibilní složky s dispergovaným plynem. Takovou tvorbu azeotropní směsi je možno účinně využít např. ke zvýšení těkavosti sloučenin s poměrně vysokou molekulovou hmotností, jako jsou halogenované uhlovodíky, např. fluorované uhlovodíky včetně perfluorovaných uhlovodíků, které jsou za běžných podmínek kapalné a při tělesné teplotě 37 °C je možno je podávat ještě v kapalně formě. To má podstatnou výhodu vzhledem k účinné echogenní době životnosti kontrastních látek s obsahem takových směsí in vivo vzhledem k tomu, že je známo, že různé parametry, jako rozpustnost ve vodě nebo tucích, difusibilita a odolnost proti tlaku klesá u sloučenin typu fluorovaných uhlovodíků se zvyšující se molekulovou hmotností. Některé kontrastní látky, obsahující biologicky kompatibilní azeotropní směsi, plynné při teplotě 37 °C byly, popsány ve WO-A-9847540.

Obecně bude přírodní odolnost azeotropních směsí vzhledem k oddělení jejich složek zvyšovat stálost kontrastního prostředku, který takové směsi obsahuje, a to jak v průběhu výroby, tak v průběhu skladování a následného podávání.

Azeotropní směsi, použitelné pro účely vynálezu je možno volit na základě literatury, která se takových směsí týká nebo je možno využít jednoduchých pokusů a/nebo teoretických předpovědí, všechny tyto poznatky je možno nalézt např. v publikacích Tanaka, Fluid Phase Equilibria 24, 1985, s. 187-203, Kittel, C. a Kroemer, H., kapitola 10, publikace Thermal Physics (W. H. Freeman & Co., New York, USA, 1980) nebo Hemmer, P. C., kapitoly 16-22 publikace Statistisk Mekanikk (Tapir, Trondheim, Norsko, 1970).

Jedním z literárních příkladů azeotropní směsi, u níž účinně dochází ke snížení teploty varu složky s vyšší molekulovou hmotností pod tělesnou teplotu je směs 1,1,2-trichlor-1,2,2-trifluormethanu s teplotou varu 47,6 °C a 1,2-difluormethanu s teplotou varu 29,6 °C v hmotnostním poměru 57:43, tato směs byla popsána v US-A-4055049 jako směs s teplotou varu 24,9 °C. Další příklady azeotropních směsí s obsahem halogenovaných uhlovodíků je možno nalézt v EP-A-0783017, US-A-5599783, US-A-5605647, US-A-5605882, US-A-5607616, US-A-5607912, US-A-5611210, US-A-5614565 a US-A-5616821.

V publikaci Simons a další, J. Chem. Phys. 18(3), 1950, s. 335-346 se popisuje, že směs perfluor-n-pentanu s teplotou varu 29 °C a n-pentanu s teplotou varu 36 °C má velkou pozitivní odchylku od Raoultova zákona. Tento jev je nejvyjádřenější při použití přibližně ekvimolární směsi. Při praktickém provádění je teplota varu takové azeotropní směsi přibližně 22 °C nebo ještě nižší. Směsi perfluorovaných uhlovodíků a nesubstituovaných uhlovodíků mohou obecně mít užitečné azeotropní vlastnosti. Silné azeotropní účinky byly pozorovány u směsí, jejich složky mají blízké teploty varu. Jako příklad jiné azeotropní směsi s obsahem perfluorovaného uhlovodíku a uhlovodíku je možno uvést směsi perfluor-n-hexanu s teplotou varu 59 °C a n-pentanu, azeotropní směs má teplotu varu mezi teplotou místnosti a teplotou 35 °C a také směs perfluor-4-methylpent-2-enu s teplotou varu 49 °C a n-pentanu, tato azeotropní směs má teplotu varu přibližně 25 °C.

Další potenciálně použitelné azeotropní směsi zahrnují směsi halothanu a diethyletheru a směsi dvou nebo většího počtu fluorovaných plynů, např. perfluorpropanu a fluorethanu, perfluorpropanu a 1,1,1-trifluorethanu nebo perfluorethanu a difluormethanu.

Je známo, že fluorované plyny, např. perfluorethan mohou tvořit azeotropní směsi s oxidem uhličitým, např. podle WO-A-9502652. Při podání kontrastních látek s obsahem takových plynů tedy může in vivo docházet ke tvorbě ternárních nebo vyšších azeotropních směsí s krevními plyny, např. s oxidem uhličitým, čímž se dále zvyšuje stabilita dispergovaného plynu.

V případě, že oba prostředky kombinovaného kontrastního prostředku podle vynálezu mají být podávány současně, je možno je např. podat ve formě injekce z oddělených injekčních stříkaček nebo po předběžném smísení, s výhodou za řízených podmínek tak, aby nedocházelo příliš brzy k růstu dispergované fáze.

Prostředky, určené ke smísení před současným zadáním je možno s výhodou skladovat v příslušném obalu s dvěma oddělenými částmi nebo větším počtem oddělených částí. V prvním prostoru může být uložen např. první prostředek s obsahem dispergovaného plynu nebo jeho suchý prekursor, obsahující např. lyofilizovaný zbytek suspenze mikrobublinek plynu ve vodné prostředí s obsahem amfifilního materiálu, přičemž tento amfifilní materiál je tvořen převážně, tzn. nejméně ze 75 %, s výhodou výlučně fosfolipidem, tento prostředek je tvořen molekulami s nábojem, např. negativním nábojem, první prostor může být např. lahvička, k níž je odděleně připojen prostor, obsahující druhý prostředek s difusibilní složkou. Výstup z injekční stříkačky je uzavřen např. membránou nebo zátkou tak, aby nedošlo k předčasnému smísení. Při pohybu pístu stříkačky dochází k prasknutí membrány a druhý prostředek se smísí s prvním prostředkem nebo s jeho prekursorem, pak je možno podle potřeby směs protřepat a/nebo ředit a pak odebrat, např. pomocí injekční stříkačky a podávat.

Oba dva prostředky mohou být skladovány také v jediné lahvičce nebo injekční stříkačce tak, že jsou od sebe odděleny např. membránou nebo zátkou. Oba prostředky mohou být uloženy za přetlaku plynu nebo páry. Protržením membrány nebo zátky např. injekční jehlou dojde ke smísení obou prostředků, což je možno urychlit ručním protřepáváním, pak se směs odebere a podává. V další úpravě může lahvička obsahovat suchý prekursor pro první prostředek s první injekční stříkačkou, obsahující kapalinu pro opětné uvedení prekursoru do disperze, druhá injekční stříkačka pak obsahuje druhý prostředek nebo se užije lahvička, obsahující druhý prostředek, oddělený membránou od suchého prekursoru, přiložená je injekční stříkačka s obsahem kapaliny pro redispergování prvního prostředku.

V těch provedeních vynálezu, v nichž se oba prostředky mísí před podáním v průběhu výroby nebo následně bude směs typicky skladována při zvýšeném tlaku nebo při snížené teplotě tak, aby tlak difusibilní složky nebyl dostatečný k vyvolání růstu bublinek dispergovaného plynu. Aktivaci tohoto růstu je možno vyvolat jednoduchým uvolněním přetlaku nebo zahřátím na tělesnou teplotu, k čemuž dojde automaticky po podání směsi nebo může být směs předeřhřata těsně před podáním.

V těch provedeních vynálezu, při nichž se oba prostředky podávají odděleně, může být použito různého časového intervalu mezi jejich podáním k ovlivnění oblasti organismu, v níž především dojde k růstu bublinek dispergovaného plynu. Je např. možné vstříknout nejprve druhý prostředek a nechat difusibilní složku koncentrovat v játrech, čímž se zlepší obraz tohoto orgánu po vstříknutí prvního prostředku s obsahem dispergovaného plynu. Tam, kde to dovoluje stálost disperze plynu, je možno nejprve vstříknout tuto disperzi a nechat ji koncentrovat v játrech, načež se podá druhý prostředek s obsahem difusibilní složky ke zlepšení echogenity.

Reprezentativní způsoby zobrazování pomocí ultrazvuku, při nichž je možno využít prostředek podle vynálezu, jsou základní zobrazování v B-způsobu a také harmonické zobrazování v B-způsobu včetně příjmu subharmonických a druhé nebo vyšší harmonické, Dopplerovo zobrazování, popř. včetně selektivního příjmu základní frekvence a harmonických nebo subharmonických frekvencí, barevné Dopplerovo zobrazování, popř. zahrnující selektivní příjem základní frekvence a harmonických nebo subharmonických frekvencí, Dopplerovo zobrazování při použití vyšších energií, popř. včetně selektivního příjmu základních, harmonických nebo subharmonických frekvencí, barevné Dopplerovo zobrazování, popř. při použití vyšších energií, využívající ztráty korelace nebo Dopplerova posunu, vyvolané změnami v akustických vlastnostech mikrobublinek kontrastního prostředí vlivem samovolné destrukce nebo destrukce, vyvolané působením ultrazvuku, zobrazování převrácením pulzu, popř. zahrnující selektivní příjem základních, harmonických nebo subharmonických frekvencí včetně technik, kde počet pulzů, vysílaných v každém směru převyšuje dva, zahrnuto je i zobrazování převrácením pulzů s využitím ztráty korelace, vyvolané změnami akustických vlastností mikrobublinek kontrastního prostředí na základě destrukce, která je samovolná nebo vyvolaná ultrazvukem, na základě fragmentace, růstu nebo splývání bublinek, možno je využít také zobrazování pomocí deformace pulzu, popsané např. v 1997 IEEE Ultrasonics Symposium, s. 1567-1570 a zobrazování, založeného na srovnávání obrazů, získaných při různé amplitudě nebo různém tvaru vln tak, aby bylo možno prokázat nelineární vlivy, vyvolané přítomností mikrobublinek plynu.

Pro danou dávku disperze plynu a difusibilní složky bylo prokázáno, že při použití barevného Dopplerova zobrazování pro růst bublinek dispergovaného plynu, je možno dosáhnout silnějšího

kontrastu při následném zobrazování B-způsobem, pravděpodobně v důsledku vyšších použitých intenzit ultrazvuku. Aby bylo možno snížit vlivy pohybů, je možno shromáždit postupné obrazy tkání, např. srdce nebo ledvin při použití vhodné synchronizační techniky, např. napojením na EKG nebo zaznamenáním dýchacích pohybů subjektu. Měření změn rezonančních frekvencí nebo absorbovaných frekvencí, které doprovází růst bublinek dispergovaného plynu, může být také velmi užitečné.

Je zřejmé, že obsah dispergovaného plynu v kombinovaném kontrastním prostředku podle vynálezu bude dočasně zadržen ve tkáních v koncentracích, které jsou přímoúměrné rychlosti perfuse této tkáně. To znamená, že při použití například běžného nebo harmonického B-způsobu zobrazování, kde se obraz odvozuje přímo od intenzity vracejícího se signálu, je možno interpretovat obraz takové tkáně jako perfusní mapu, v níž je intenzita signálu funkcí krevního zásobení. To je rozdíl proti obrazům, které je možno získat při použití běžných kontrastních prostředků, kde koncentrace kontrastního prostředku v oblasti a odpovídající intenzita vracejícího se signálu závisí na okamžitém obsahu krve a nikoliv na rychlosti perfuse dané tkáně.

Při zobrazování srdce, kde perfusní mapy jsou odvozeny od intenzity vracejícího se signálu podle tohoto provedení vynálezu, může být výhodné podrobit nemocného tělesné námaze nebo farmakologické zátěži tak, aby tento vliv byl ještě zvýšen a bylo tak možno rozeznat rozdíl mezi intenzitou zobrazení normálně zásobeného srdečního svalu a těch oblastí srdečního svalu, které jsou zásobeny zúženými tepnami. Jak je známo ze zobrazování srdce pomocí značených izotopů, tělesná námaha působí rozšíření cév a zvyšuje průtok krve ve zdravém srdečním svaly, kdežto průtok krve v

oblasti, zásobené zúženou tepnou zůstane beze změny, protože kapacita pro rozšíření cév je již vyčerpána současným stavem.

Aplikace tělesné námahy nebo farmakologické zátěže podáním adrenergických agonistů může vyvolat bolest na hrudníku u nemocných, trpících srdečními chorobami a je tedy výhodnější zvýšit průtok krve ve zdravé tkáni podáním látky, rozšiřující cévy. Z těchto látek, vhodných pro použití pro účely vynálezu, je možno uvést endogenní a metabolické vasodilatační látky, jako jsou kyselina mléčná, adenosintrifosfát, adenosindifosfát, adenosinmonofosfát, adenosin, oxid dusičný a látky, vyvolávající hypercapnii, hypoxii a hypoxemii nebo hyperemii, dále je možno použít inhibitory fosfodiesterázy, jako dipyridamol a sildenafil, inhibitory sympatiku jako jsou clonidin a methyldopa, látky, uvolňující hladké svaly, jako papaverin, hydrolazin, dihydrolazin a nitroprusid, agonisty beta-receptorů, jako dopamin, dobutamin, arbutamin, albuterol, salmeterol a isoproterenol, antagonisty alfa-receptorů, jako doxazosin, terazosin a prazosin, organické nitráty, jako glyceryltrinitrát, isosorbitdinitrát a isosorbitmononitrát, inhibitory enzymu pro přeměnu angiotensinu, ACE, jako benazepril, captopril, enalapril, fosinopril, lisinopril, quinapril a ramipril, látky, antagonizující angiotensin II nebo receptor AT1, jako valsartan, losartan a candesartan, blokátory vápníkových kanálů, jako amlodipin, nifedipin, nimodipin, felodipin, isradipin, diltiazem, verapamil a nifedipin, prostaglandiny, jako alprostadil a vasodilatační látky, závislé na endothelu.

Použití adenosinu je zvláště výhodné vzhledem k tomu, že jde o endogenní látku, která má rychlý, ale krátký vasodilatační účinek. Tyto vlastnosti je možno potvrdit skutečností, že poločas v krvním oběhu je pouze několik sekund. Z tohoto důvodu jsou sníženy vedlejší účinky, pociťované nemocným. Rozšíření cév, vyvolané adenosinem, je největší v srdečním svalu vzhledem k tomu, že účinná látka se

dostane do vzdálenějších tkání již v době, která je delší než doba účinnosti, takže tam již nedosáhne farmakologicky účinné koncentrace. Tato látka je tedy nejvýhodnější pro zobrazení srdce při použití prostředku podle vynálezu.

Kromě zúžení tepen je možno při použití prostředku podle vynálezu prokázat ještě další abnormality tkání a prokrvení tkání. Je např. známo, že cévy v oblasti zhoubného bujení jsou málo diferencované a mohou tedy reagovat jinak na vazokonstrikční látky než normální tkáň. Podobný nedostatek reakce na vazokonstrikční látky je možno pozorovat i v oblasti závažných zánětů. Pozorování odpovědi na podání vazokonstrikční látky může tedy poskytnout užitečnou diagnostickou informaci. Z vazokonstrikčních látek, použitelných pro tento účel lze uvést isoprenalin, epinefrin, norepinefrin, dopamin, metaraminol, prenalterol, ergotamin, dihydroergotamin, methysergid a inhibitory produkce kyseliny dusičné, jako analogy L-argininu. Tyto látky je možno podat místně nebo také systemicky.

Pro některé účely může být výhodné podání dvou nebo většího počtu látek s účinkem na cévy, a to zároveň nebo postupně. V případě podání dvou takových látek mohou obě látky rozšiřovat cévy nebo je smršťovat nebo může jedna z látek cévy rozšiřovat a druhá cévy smršťovat. V případě, že se užijí dvě vazodilatační nebo dvě vazokonstrikční látky, měly by se od sebe lišit alespoň jednou ze svých vlastností, např. specifícností pro tkáň nebo mechanismem působení tak, aby v průběhu jediného vyšetření bylo možno pozorovat místní rozdíly v intenzitě signálu. Při odděleném podání je možno podat nejprve vazokonstrikční látku a pak vazodilatační látku nebo také obráceně.

Podání adenosinu může u zdravého srdečního svalu vést až ke 4násobnému zvýšení průtoku krve koronárními cévami, čímž se vysoce zvyšuje příjem a dočasná retence kontrastních látek v prostředí podle vynálezu a současně se také zvyšuje rozdíl v intenzitě vracejícího se signálu mezi normální a špatně prokrvenou srdeční tkání. Vzhledem k tomu, že se kontrastní prostředek zadržuje fyzikálním způsobem, je jeho retence vysoce účinná, např. ve srovnání příjmu radioaktivně značených látek, jako je thalium 201 a technecium, zadržení těchto látek je omezeno nízkou dobou styku mezi značenou látkou a tkání, takže může být zapotřebí udržet rozšířené cévy pro delší časové období, např. 4 až 6 minut v případě scintigrafie thaliem pro dosažení optimálního účinku.

Kontrastní prostředky podle vynálezu netrpí takovým omezením difuze nebo transportu a vzhledem k tomu, že jejich retence v srdeční tkáni může být také rychle ukončena, např. přerušením ultrazvuku, který vyvolává růst bublinek, může být doba vasodilatace, nezbytná pro dosažení zobrazení prokrvení srdeční tkáně tímto způsobem velmi krátká, např. kratší než jedna minuta. Tímto způsobem je možno podstatně zkrátit nepohodlí, které je nemocnému způsobeno podáním vazodilatačních látek.

Je zřejmé, že vzhledem ke krátkému poločasu adenosinu v krevním oběhu, může být nezbytné v průběhu vyšetření srdce injekci nebo infusi opakovat. Je např. možno podat na začátku 150 $\mu\text{g/kg}$ adenosinu v podstatě současně s podáním kontrastního prostředku a po 10 sekundách ještě pomalu podat dalších 150 $\mu\text{g/kg}$ např. v průběhu 20 sekund. Je také možno použít infusi adenosinu stálou rychlostí v průběhu časového intervalu, překrývajícího vstříknutí a ukládání kontrastního prostředku do srdečního svalu.

Kontrastní prostředky podle vynálezu je s výhodou možno použít také jako nosná prostředí pro biologicky účinné skupiny, např. léčiva, tzn. látky s příznivým účinkem na specifické onemocnění u člověka nebo jiného živočicha. Tato léčiva mohou být přítomna v prvním prostředku, např. v dispergovaném plynu a vázána na část stabilizačního materiálu např. kovalentní nebo iontovou vazbou, popř. prostřednictvím vazného řetězce, nebo mohou být fyzikálně smísena se stabilizačním materiálem. Fyzikální smísení je zvláště použitelné v případě, že léčivo a stabilizační materiál mají podobnou polaritu nebo rozpustnost.

Řízením růstu bublinek dispergovaného plynu je možno zajistit přechodnou retenci plynu v malých cévách cílové oblasti. Zvláště výhodné je použití ultrazvuku k vyvolání tohoto růstu a tím i k retenci plynu spolu s přidruženým léčivem v cílové struktuře. K těmto účelům je možno použít také místní injekci prvního prostředku s obsahem plynu nebo s výhodou difusibilní složky ve druhém prostředku.

Použité léčivo, které může být popř. vázáno na specifický vektor s afinitou pro specifické buňky, struktury nebo patologické útvary, může být uvolněno např. v důsledku rozrušení stabilizačního materiálu pro plyn růstem bublinek dispergovaného plynu, solubilizací stabilizačního materiálu nebo desintegrací mikrobublinek nebo mikročástic s obsahem plynu působením ultrazvuku nebo změnou koncentračního gradientu difusibilní složky v cílové oblasti. V případě, že léčivo je chemicky vázáno na stabilizační materiál pro plyn, může toto spojení nebo jakýkoliv vazný řetězec obsahovat jednu nebo větší počet labilních skupin, které se snadno odštěpí a uvolní léčivo. Z těchto odštěpitelných skupin lze uvést zejména amidové, imidové, iminové, esterové, anhydridové, acetolové, karbamátové, karbonátové a disulfidové skupiny, které jsou in vivo biologicky degradovatelné např. hydrolýzou a/nebo působením enzymů.

Jako příklad léčivých látek, použitelných v tomto smyslu, je možno uvést antineoplastické látky, jako jsou vincristin, vinblastin, vindesin, busulfan, chlorambucil, spiroplatin, cisplatin, carboplatin, methotrexat, adriamycin, mitomycin, bleomycin, cytosin arabinosid, arabinosyl adenin, merkaptopurin, mitotan, procarbazin, dactinomycin (antinomycin D), daunorubicin, doxorubicinhydrochlorid, taxol, plicamycin, aminoglutethimid, estramustin, flutamid, leuprolid, megestrolacetát, tamoxifen, testolacton, trilostan, amsacrin (m-AMSA), asparagináza (L-asparagináza), etoposid, interferon, a-2a a 2b, krevní produkty, jako hematoporfyriny nebo jejich deriváty, modifikátory biologické odpovědi, jako muramylpeptidy, látky s účinností proti houbám, jako jsou ketoconazol, nystatin, griseofulvin, flucytosin, miconazol nebo amfotericin B, hormony nebo analogy hormonů, jako jsou růstový hormon, hormon, stimulující melanocyty, estradiol, beclomethasondipropionát, betamethason, cortisonacetát, dexamethason, flunisolid, hydrocortison, methylprednisolon, paramethasonacetát, prednisolon, prednison, triamcinolon nebo fludrocortisonacetát, vitamíny jako kyanokobalamin nebo retinoidy, enzymy, jako jsou alkalická fosfatáza nebo dismutáza superoxidu manganu, antialergické látky, jako amlexanox, antikoagulační činidlo, jako warfarin, phenprocoumon nebo heparin, antithrombotické látky, léčiva pro oběhový systém, jako propranolol, potenciátory metabolismu, jako glutathion, antituberkulotické látky, jako jsou kyselina p-aminosalicylová, isoniazid, capreomycinsulfát, cyclosexin, ethambutol, ethionamid, pyrazinamid, rifampin nebo streptomycinsulfát, protivirové látky, jako acyclovir, amantadin, azidothymidin, ribavirin nebo vidarabin, látky, dilatující krevní cévy, jako diltiazem, nifedipin, verapamil, erythritoltetranitrát, isosorbiddinitrát, nitroglycerin nebo pentaerythritoltetranitrát, antibiotika, jako dapson, chloramfenikol, neomycin, cefaclor, cefadroxil, cefalexin, cefradin, erythromycin, clindamycin, lincomycin,

amoxicillin, ampicillin, bacampicillin, carbenicillin, dicloxacillin, cyclacillin, picloxacillin, hetacillin, methicillin, nafcillin, penicillin nebo tetracyklin, protizánětlivé látky, jako diflunisal, ibuprofen, indomethacin, meclufenamát, kyselina mefanamová, naproxen, fenylbutazon, piroxicam, tolmetin, aspirin nebo salicyláty, látky s účinností proti prvkům, jako chlorochin, metranidazol, chinin nebo megluminantimonát, protirevmatické látky, jako penicillamin, narkotika, jako paregoric, opiáty, jako kodein, morfin nebo opium, srdeční glykosidy, jako deslanesid, digitoxin, digoxin, digitalin nebo digitalis, blokátory nervosvalového přenosu, jako atracuriummesylát, gallamintriethiodid, hexafluorenium bromid, metocurinjodid, pancuroniumbromid, sukcinylcholinchlorid, tubocurarinchlorid nebo vecuronium bromid, sedativa, jako amobarbital a jeho sodná sůl, aprobarbital, sodná sůl butabarbitalu, chloralhydrát, ethchlorvynol, ethinamát, flurazepamhydrochlorid, glutethimid, methotrimeprazinhydrochlorid, methypylon, midazolamhydrochlorid, paraldehyd, pentobarbital, sodná sůl sekobarbitalu, talbutal, temazepam nebo triazolam, místní anestetika, jako bupivacain, chloroprocain, etidocain, lidocain, mepivacain, procain nebo tetracain, obecně anestetické látky, jako droperidol, etomidát, fentanylcitrát s droperidolem, ketaminhydrochlorid, sodná sůl methohexitalu nebo thiopental a jeho farmaceuticky přijatelné soli, např. adiční soli s kyselinami, jako hydrochloridy nebo hydrobromidy nebo soli s bazemi, jako sodné soli nebo soli vápenaté nebo hořečnaté nebo deriváty, např. acetáty, dále je možno použít radiochemické látky, obsahující např. látky, vysílající záření beta. Zvláště důležité jsou antithrombotické látky, jako heparin a látky s podobným účinkem, jako antithrombin III, dalteparin a enoxaparin, inhibitory shlukování krevních destiček, jako ticlopidin, aspirin, dipyridamol, iloprost a abciximab, a thrombolytické enzymy, jako streptokináza a aktivátory plasminogenu. Dalšími příklady léčiv mohou být genetické materiály, např. nukleové kyseliny, RNA a DNA přírodního nebo syntetického

původu včetně rekombinantní RNA a DNA. Kódová DNA pro určité proteiny může být použita při léčení různých onemocnění. Je např. možno dodávat faktor nekrózy nádorů nebo interleukin-2 k léčení pokročilých zhoubných nádorů, thymidinkinázu je možno podávat k léčení nádorů vaječníků nebo mozkových nádorů, interleukin-2 je možno podávat k léčení neuroblastomu, zhoubného melanomu a ledvinových nádorů a interleukin-4 je obecně možno podávat k léčení zhoubných nádorů.

Kontrastní prostředky podle vynálezu je možno použít jako nosná prostředí pro zvýšení kontrastu při zobrazování i jiným způsobem než pomocí ultrazvuku, např. při použití rtg-záření, magnetické rezonance a s výhodou při scintigrafii. Řízený růst dispergovaných částic plynu je možno využít k umístění uvedených prostředků do požadovaných oblastí v organismu, např. s použitím ozáření ultrazvukem cílového orgánu nebo tkáně k vyvolání požadovaného řízeného růstu a tím i dočasné retence prostředku tak, aby bylo možno vytvořit příslušný obraz.

Kontrastní prostředky podle vynálezu je možno využít jako nosná prostředí také pro léčivé látky, které nemusí být nezbytně uvolněny z prostředků k dosažení léčebného účinku. Tyto prostředky mohou např. obsahovat radioaktivní atomy nebo ionty a vysílat např. záření beta, čímž může docházet k místnímu ozáření po růstu dispergované plynné fáze při dočasné retenci prostředku v cílové oblasti. Je zřejmé, že tyto léčivé látky by měly být zařazeny do prostředků tak, aby nedošlo ke smrštění a ukončení retence dispergovaného plynu dříve než by bylo dosaženo léčebné ozařovací dávky.

Kontrastní prostředky podle vynálezu mohou mimo to mít samy o sobě léčebné vlastnosti. Je např. možno tyto prostředky použít k

léčebnému účelu tak, že se nitrožilně vstříkne větší dávka prostředku a pak se tepna, která vede k nádoru místně ozáří ultrazvukem. Rostoucí plynná fáze v tomto případě může blokovat přívod krve k nádoru. Je tedy možno použít lokalizovanou energii ultrazvuku k dosažení řízené místní embolie, což může být důležité ve spojení s dalšími léčebnými zákroky. Koncentrace dispergovaného plynu v kapilárách může rovněž zlepšit absorpci ultrazvukové energie při hypertermickém léčení např. v případě jaterních nádorů. Další tkáně, které je možno léčit tímto způsobem zahrnují mléčnou žlázu, štítnou žlázu a prostatu. Při těchto léčebných zákrocích se užívá cílený paprsek ultrazvuku s vysokou energií, např. 5 W, např. při frekvenci 1,5 MHz.

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

Příklady provedení vynálezu

Příprava 1

Disperze perfluorbutanu při použití materiálu s negativním nábojem

Hydrogenovaný fosfatidylserin (5 mg/ml ve formě roztoku propylenglykolu v čištěné vodě s koncentrací 1 % hmotnostní) a plynný perfluorbutan se homogenizují při 7800 otáčkách za minutu a teplotě přibližně 40 °C za vzniku krémově bílé disperze mikrobublinek. Tato disperze se podrobí frakcionaci k odstranění příliš malých mikrobublinek s velikostí menší než 2 μm a objem disperze se upraví na požadovanou koncentraci mikrobublinek přidáním vodného roztoku sacharózy k dosažení koncentrace sacharózy 92 mg/ml. Pak se podíly výsledné disperze po 2 ml plní do lahviček s objemem 10 ml s plochým dnem, zvláště uzpůsobených pro lyofilizaci a obsah se lyofilizuje za vzniku bílého porézního materiálu. Lyofilizační komora se pak naplní

perfluorbutanem a lahvičky se těsně uzavřou. Před použitím se do lahviček přidá voda a obsah se ručně jemně protřepává několik sekund za vzniku disperze mikrobublinek perfluorbutanu. Koncentrace mikrobublinek v disperzi byla 1,1 % objemových při středním průměru mikrobublinek 2,7 % μm .

Příprava 2

Disperze perfluorbutanu při použití kladně nabitého materiálu

1 ml disperze 1,2-distearoyl-3-trimethylamoniumpropanu s koncentrací 1 mg/ml a distearoylfosfatidylcholinu v množství 4 mg/ml v roztoku propylenglykolu v čištěné vodě s koncentrací 2 g/100 ml se vloží do lahvičky s obsahem 2 ml. Zbývající prostor se promyje perfluorbutanem a pak se lahvička uzavře a protřepává 45 sekund při použití zubolékařského mísícího zařízení Espe CapMix^R. Výsledná mléčně bílá disperze mikrobublinek se 3krát promyje odstředěním a odstraněním infranatantu a pak se přidá stejný objem čištěné vody. Koncentrace mikrobublinek ve výsledné disperzi bylo 4,9 % objemových při středním průměru mikrobublinek 3,2 μm .

Příprava 3

Disperze perfluorbutanu při použití biotinylovaného materiálu

4,5 mg distearoylfosfatidylserinu a 0,5 mg biotin-dipalmitoylfosfatidylethanolaminu se naváží do čisté lahvičky a pak se přidá 1,0 ml roztoku s obsahem 1,4 % propylenglykolu a 2,4 % glycerolu. Po zahřátí na 78 °C se směs zchladí na teplotu místnosti a zbývající prostor v lahvičce se promyje plynným perfluorbutanem. Pak se lahvička uzavře, protřepává 45 sekund při použití zařízení Espe CapMix^R, načež se uloží na 16 hodin na třepací stůl. Výsledná

disperze mikrobublinek se pak důkladně promyje deionizovanou vodou.

Příprava 4

Emulze perfluordimethylcyklobutanu při použití materiálu s kladným nábojem.

Jeden ml disperze didodecyldimethylammoniumbromidu s koncentrací 5 mg/ml v čištěné vodě se uloží do lahvičky s objemem 2 ml a pak se přidá 100 μ l perfluordimethylcyklobutanu s teplotou varu 45 °C. Lahvička se uzavře a pak se protřepává 75 sekund při použití zařízení Espe CapMix^R, čímž vznikne emulze difusibilní složky, která se až do použití skladuje při teplotě 0 °C. Emulze se třikrát promyje s odstředěním a infranatan se odstraní, načež se přidá ekvivalentní množství čištěné vody. Koncentrace kapiček v emulzi je 6,2 % objemových při středním průměru kapiček 2,3 μ m.

Příprava 5

Emulze perfluorhexanu s použitím kladně nabitého materiálu

1 ml disperze 1,2-distearoyl-3-trimethylamoniumpropanu s koncentrací 1 mg/ml a distearoylfosfatidylcholinu s koncentrací 4 mg/ml v čištěné vodě se vloží do lahvičky s objemem 2 ml a přidá se 100 μ l perfluorhexanu s teplotou varu 57 °C. Lahvička se uzavře a protřepává 75 sekund při použití zařízení Espe CapMix^R, čímž vznikne emulze difusibilní složky, která se až do použití uloží při teplotě 0 °C. Emulze se 3krát promyje za odstředění a odstranění infranatanu, načež se přidá ekvivalentní objem čištěné vody. Koncentrace kapiček v emulzi byla 2,9 % objemových při středním průměru kapek 2,9 μ m.

Příprava 6

Emulze perfluordimethylcyklobutanu s použitím materiálu s negativním nábojem

1 ml disperze hydrogenovaného fosfatidylserinu s koncentrací 5 mg/ml v čištěné vodě se vloží do lahvičky s objemem 2 ml a přidá se 100 μ l perfluordimethylcyklobutanu s teplotou varu 45 °C. Lahvička se uzavře a protřepává 75 sekund při použití zařízení Expe CapMix^R, čímž vznikne emulze difusibilní složky, která se skladuje až do použití při teplotě 0 °C. Emulze se 3krát promyje odstředěním a odstraněním infranatanu a pak se přidá ekvivalentní objem čištěné vody. Koncentrace kapiček v emulzi byla 6,9 % objemových při středním průměru kapiček 2,7 μ m.

Příprava 7

Emulze perfluordimethylcyklobutanu s použitím avidinylovaného materiálu

4,5 mg distearoylfosfatidylserinu a 0,5 mg biotin-dipalmitoylfosfadidylethanolaminu se naváží do čisté lahvičky a přidá se 1,0 ml 2% roztoku propylenglykolu. Po zahřátí na 80 °C se směs zchladí na teplotu místnosti. Přidá se 100 μ l perfluordimethylcyklobutanu, lahvička se uzavře a protřepává 75 sekund při použití zařízení Espe CapMix^R, čímž vznikne emulze difusibilní složky. Zředěný vzorek emulze, 100 μ l emulze v 1 ml vody se inkubuje s přebytkem avidinu a uloží na třepací stůl. Pak se zředěná emulze důkladně promyje vodou a koncentruje odstředěním.

Příprava 8

Emulze perfluordimethylcyklobutanu s použitím materiálu s kladným nábojem

73 mg 1,2-distearoyl-3-trimethylamoniumpropanu a 641 mg distearoylfosfatidylcholinu se uloží do lahvičky s okrouhlým dnem s objemem 250 ml a přidá se 100 ml chloroformu. Lahvička se pak zahřívá pod teplovou vodou z vodovodního kohoutku až do získání čirého roztoku, načež se umístí na rotační odpařovač a chloroform se odstraní odpařením při tlaku 35 kPa a při teplotě lázně 45 °C. Aby bylo možno odstranit zbývající stopy rozpouštědla, uloží se vzorek přes noc při tlaku 2 kPa. Pak se přidá 143 ml vody MilliQ a lahvička se opět uloží na rotační odpařovač a otáčí se plnou rychlostí při ponoření do vody s teplotou 80 °C. Přibližně po 25 minutách se vzorek přenesse do vhodné lahvičky a uloží do lednice přes noc.

Podíly po 1 ml byly přeneseny do chromatografických nádobek s objemem 2 ml a do každé nádoby bylo přidáno 100 μ l perfluordimethylcyklobutanu s teplotou varu 45 °C. Lahvičky byly protřepávány na zařízení Espe CapMix^R celkem 75 sekund a pak byly okamžitě uloženy do ledu. Obsah lahviček byl slit do větší lahvičky a byly stanoveny vlastnosti emulze, pokud jde o distribuci velikosti částic a celkový objem částic při použití zařízení Coulter counter. Střední průměr částic byl 2,67 μ m a emulze tedy byla přijatelná pro injekční podání. Koncentrace částic byla upravena na přibližně 1 % objemové dispergované fáze přidáním vody MilliQ. Pak byla emulze uložena do lednice až do použití.

Příprava 9

Emulze perfluormethylcyklopentanu s použitím materiálu s kladným nábojem

Opakuje se způsob podle přípravy 8 s tím rozdílem, že se místo perfluordimethylcyklobutanu užije perfluormethylcyklopentan s teplotou varu 48 °C. Analýza na zařízení Coulter counter prokázala střední průměr částic emulze 2,63 μm .

Příprava 10

Emulze perfluor-2-methylpentanu s použitím materiálu s kladným nábojem

Opakuje se způsob podle přípravy 8 s tím rozdílem, že se místo perfluordimethylcyklobutanu užije perfluor-2-methylpentan s teplotou varu 50 až 57 °C. Analýza při použití zařízení Coulter counter prokázala, že střední průměr částic emulze je 2,72 μm .

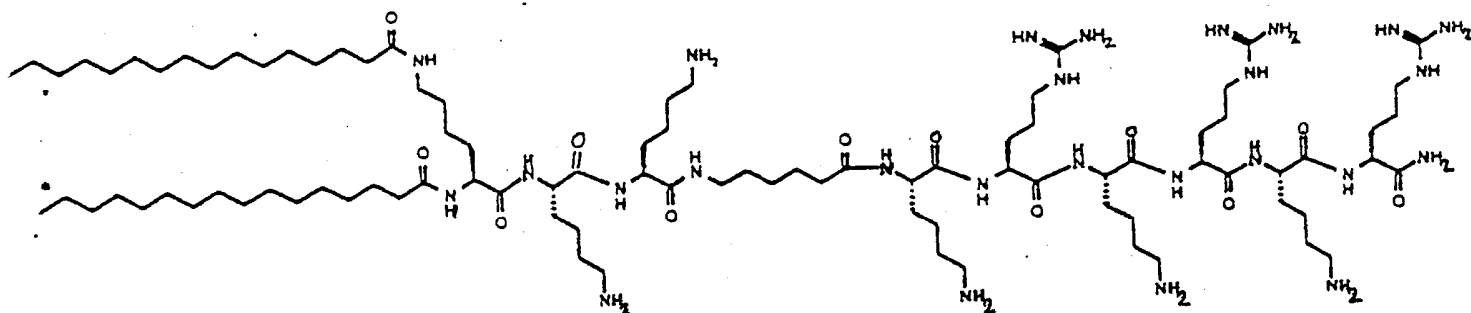
Příprava 11

Emulze perfluorhexanu s použitím materiálu s kladným nábojem

Opakuje se způsob podle přípravy 8 s tím rozdílem, že se místo perfluordimethylcyklobutanu užije perfluorhexan s teplotou varu 58 až 60 °C. Analýza při použití zařízení Coulter counter prokázala, že střední průměr částic je 2,54 μm .

Příprava 12

Syntéza pozitivně nabitého lipopeptidu: palmitoyl-Lys(palmitoyl)-Lys-Lys-Ahx-Lys-Arg-Lys-Arg-Lys-Arg-NH₂, kde Ahx = kyselina aminohexanová

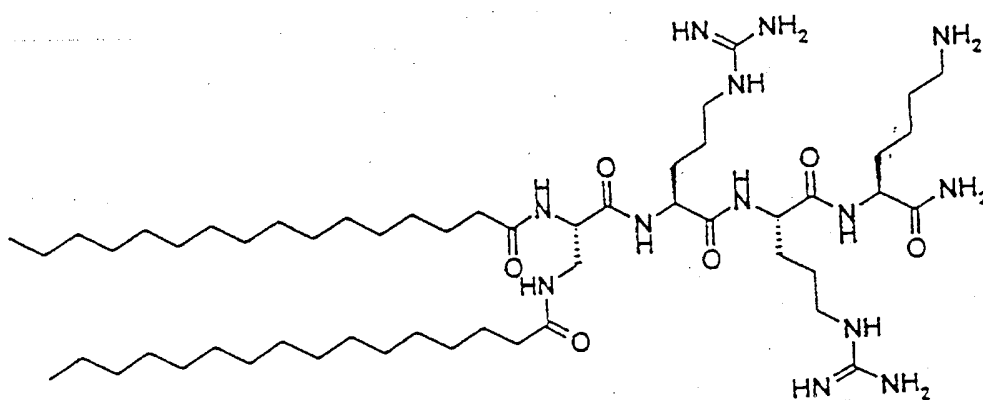


Lipopeptid byl syntetizován na automatickém zařízení ABI 433A pro syntézu peptidů, syntéza byla zahájena s použitím amidové pryskyřice (Rink) v množství 0,25 mmol při použití vždy 1 mmol příslušné aminokyseliny. Všechny aminokyseliny a palmitová kyselina byly předem aktivovány působením O-benzatriazol-1-yl-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorofosfátu HBTU. Současné odstranění peptidu a ochranných skupin postranního řetězce bylo uskutečněno působením kyseliny trifluoroctové TFA, obsahující 5 % fenolu, 5 % triisopropylsilanu a 5 % vody po dobu 2 hodin, čímž byl získán surový produkt v množství 150 mg. Tento produkt byl čištěn preparativní HPLC při použití sloupce Vydac 218TP1022 a při použití 30 mg surového materiálu a gradientu 70 až 100 % B v průběhu 40 minut (A = 0,1% TFA ve vodě, B = acetonitril), rychlost průtoku 9 ml/min. Po lyofilizaci bylo získáno 19 mg čistého materiálu, jak bylo prokázáno analytickou HPLC: gradient 70 až 100 % B, kde B = acetonitril a A = 0,01% TFA ve vodě, sloupec Vydac 218TP54, detekce UV 214 nm,

doba retence produktu 11 minut. Další vlastnosti produktu byly prokazovány s použitím hmotové spektrometrie (MALDI), teoretická hodnota $M+H = 1845$, nalezeno 1850.

Příprava 13

Syntéza kladně nabitého lipopeptidu: palmitoyl-Dpr(palmitoyl)-Arg-Arg-Lys-NH₂, kde Dpr = kyselina diaminopropionová



Lipopeptid byl syntetizován na automatickém zařízení ABI 433A pro syntézu peptidů, syntéza byla zahájena s použitím amidové pryskyřice (Rink) v množství 0,25 mmol při použití vždy 1 mmol příslušné aminokyseliny. Všechny aminokyseliny a palmitová kyselina byly předem aktivovány působením O-benzatriazol-1-yl-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorofosfátu HBTU. Současné odstranění peptidu a ochranných skupin postranního řetězce bylo uskutečněno působením kyseliny trifluoroctové TFA, obsahující 5 % fenolu, 5 % triisopropylsilanu a 5 % vody po dobu 2 hodin, čímž byl získán surový produkt v množství 150 mg. Tento produkt byl čištěn preparativní HPLC při použití sloupce Vydac 218TP1022 s použitím gradientu 90 až 100 % B v průběhu 40 minut (A = 0,1 % TFA ve vodě, B = 0,1 %

TFA v acetonitrilu), rychlost průtoku 9 ml/min. Po lyofilizaci bylo získáno 5 mg čistého materiálu a byla provedena analytická HPLC při gradientu 80 až 100 % B, kde A = 0,1 % TFA ve vodě a B = 0,1 % TFA v acetonitrilu, sloupec Vydac 218TP54, detekce UV 214 nm, doba retence produktu 15 minut. Další vlastnosti produktu byly stanoveny hmotovou spektrometrií (MALDI), teoretická hodnota M+H = 1021, nalezeno 1022.

Příprava 14

a) 2-terc.butoxykarbonylaminoethylester kyseliny hexadekanové

1,6 g, 10 mmol N-Boc-ethanolaminu a 3,28 g, 12 mmol palmitoylchloridu se rozpustí ve 25 ml dichlormethanu a za míchání se přidá 1,68 ml, 12 mmol triethylaminu. Reakční směs se míchá přes noc při teplotě místnosti. Pak se reakční směs zředí na 100 ml dichlormethanem, přenesse se do extrakční nádoby, promyje se 1krát 10 ml 1 M hydrogenuhličitanu sodného a 2krát 25 ml vody, vysuší se a rozpouštědlo se odpaří ve vakuu. Surový produkt se čistí chromatografií na sloupci oxidu křemičitého. Identita sloučeniny byla ověřena pomocí TLC (jedna skvrna) a spektrometrií MALDI (M+1).

b) 2-aminoethylesterhydrochlorid kyseliny hexanové

1,1 g, 2,7 mmol 2-terc.butoxykarbonylaminoethylesteru kyseliny hexadekanové ze stupně (a) se rozpustí v 10 ml 4 M chlorovodíku v dioxanu za stálého míchání. Po několika minutách se počne tvořit bílá sraženina. Pomocí TLC je po 30 minutách možno prokázat plnou přeměnu výchozího materiálu. Bílá sraženina se odfiltruje, na filtru se promyje dioxanem a suší ve vakuu. Identita látky byla prokázána pomocí TLC (1 skvrna) a MALDI (M+1).

Příprava 15

a) terc.butylester kyseliny 4-hexadekanoylaminobutylkarbamové

1 g, 5,3 mmol Boc-1,4-diaminobutanu a 1,64 g, 6 mmol palmitoylchloridu se rozpustí ve 25 ml dichlormethanu. Přidá se 0,64 ml, 6 mmol triethylaminu a reakční směs se míchá přes noc a pak se zředí dichlormethanem na 150 ml, přenesse se do extrakční nálevky, promyje se 1krát 10 ml 1 M hydrogenuhličitanu sodného a 2krát 25 ml vody a pak se vysuší a rozpouštědlo se odpaří ve vakuu. Surový produkt se rozpustí ve 25 ml chloroformu a uloží přes noc do lednice. Pak se surový produkt oddělí ve formě lepivých krystalků. Totožnost látky byla ověřena pomocí TLC (1 skvrna) a MALDI (M+1).

b) hydrochlorid 4-aminobutylamidu kyseliny hexadekanové

1 g, 2,3 mmol terc.butylesteru kyseliny 4-hexadekanoylaminobutylkarbamové ze stupně (a) se rozpustí v 10 ml směsi 4 M chlorovodíku v dioxanu za stálého míchání. Po několika minutách se počne tvořit bílá krystalická sraženina. Reakční směs se zředí 10 ml dioxanu a směs se míchá ještě 4 hodiny, po této době je možno pomocí TLC prokázat plnou přeměnu výchozího materiálu. Bílá sraženina se odfiltruje, na filtru se promyje dioxanem a suší ve vakuu. Totožnost látky byla ověřena pomocí TLC (1 skvrna) a MALDI (M+1).

Příprava 16

a) hexadecylester kyseliny terc.butoxykarbonylaminooctové

1,74 g, 10 mmol Boc-Gly-OH a 2,5 g 10 mmol 1-hexadekanolu se rozpustí ve 30 ml dichlormethanu a přidá se katalytické množství 30

mg dimethylaminopyridinu. Pak se po kapkách a za míchání v průběhu 10 min přidá roztok 2,1 g, 10 mmol dicyklohexylkarbodiimidu v 10 ml dichlormethanu a reakční směs se míchá přes noc při teplotě místnosti. Vysrážená dicyklohexylmočovina se odfiltruje a organická fáze se zředí dichlormethanem na 150 ml. Organická fáze se extrahuje 1krát 5 ml 1 M hydrogenuhličitanu sodného a 2krát 10 ml vody a vysuší, načež se rozpouštědlo odpaří ve vakuu. Surový produkt se užije v následujícím stupni bez dalšího čištění. Totožnost produktu byla ověřena pomocí TLC (1 skvrna) a MALDI (M+1).

b) hydrochlorid hexadecylesteru kyseliny aminooctové

2 g, 5 mmol hexadecylesteru kyseliny terc.butoxykarbonylaminoctové ze stupně (a) se rozpustí ve 20 ml dioxanu. Pak se přidá 10 ml 4 M roztoku chlorovodíku v dioxanu a reakční směs se míchá při teplotě místnosti. Po 30 minutách se počne vytvářet bílá sraženina. Přidá se 50 ml diethyletheru a reakční směs se míchá přes noc při teplotě místnosti, pak se sraženina odfiltruje a promyje se diethyletherem. Pomocí TLC je možno prokázat úplnou přeměnu výchozího materiálu, produkt je však znečištěn malým množstvím 1-hexadekanolu. Čistý produkt se získá chromatografií na sloupci oxidu křemičitého. Jeho totožnost byla ověřena pomocí TLC (1 skvrna) a MALDI (M+1).

Příprava 17

Hydrochlorid hexadecylesteru kyseliny methylaminoctové

10 ml 4 M roztoku chlorovodíku v dioxanu se přidá do reakční nádoby, která obsahuje 100 mg, 1,1 mmol N-methylglycinu a 1 g, 4,1 mmol 1-hexadekanolu. Vzniklá suspenze se míchá několik dnů při teplotě místnosti. Po 4 dnech byla reakční směs homogenní a pomocí

TLC bylo možno prokázat úplnou přeměnu aminokyseliny. Rozpouštědlo bylo odpařeno ve vakuu a surový produkt byl čištěn chromatografií na sloupci oxidu křemičitého. Totožnost produktu byla ověřena pomocí TLC (1 skvrna) a MALDI (M+1).

Příprava 18

Hydrochlorid hexadecylesteru kyseliny dimethylaminooctové

10 ml, 4 M roztoku chlorovodíku dioxanu se přidá do reakční nádoby, která obsahuje 150 mg, 1,1 mmol N,N-dimethylglycinhydrochloridu a 1,33 g, 5,5 mmol 1-hexadekanolu. Vzniklá suspenze se míchá při teplotě místnosti. Po třech týdnech je reakční směs homogenní a pomocí TLC je možno prokázat úplnou přeměnu aminokyseliny. Rozpouštědlo se odpaří ve vakuu a surový produkt se čistí chromatografií na oxidu křemičitém. Totožnost produktu byla prokázána pomocí TLC (1 skvrna) a MALDI (M+1).

Přípravy 19 až 36

Emulze s kladně nabitým materiálem

90 mg distearoylfosfatidylcholinu a 10 mg kationtové přísady z následující tabulky 1 se vloží do lahvičky s objemem 50 ml s okrouhlým dnem a přidá se 10 ml chloroformu. (Při přípravě 31 se přidá k chloroformu 1 ml methanolu k rozpuštění všech složek.) Pak se lahvička zahřívá pod proudem teplé vody z vodovodu až do vytvoření čirého roztoku, pak se lahvička uloží do rotačního odpařovače a chloroform se odpaří za tlaku 35 kPa při teplotě lázně 45 °C. Aby bylo dosaženo odstranění všech zbytků rozpouštědla, byl vzorek ponechán přes noc ve vakuu při tlaku 2 kPa. Pak bylo přidáno 20 ml vody MilliQ a lahvička byla znovu umístěna do rotačního odpařovače při plném

počtu otáček a při ponoření do vodní lázně s teplotou 80 °C. Po době přibližně 10 minut byl vzorek přenesen do vhodné lahvičky a uložen přes noc do lednice.

Podíly produktů s objemem 1 ml byly přeneseny do chromatografických nádobek s objemem 2 ml a do každé nádoby bylo přidáno 100 µl perfluordimethylcyklobutanu. Lahvičky byly protřepávány 75 sekund na zařízení Espe CapMix^R a pak byly vzorky okamžitě zchlazeny uložením do ledu. Emulze byly přeneseny do větších nádobek a byla určena distribuce velikosti částic a celkový objem částic při použití zařízení Coulter counter. Střední průměr kapek je uveden v následující tabulce 1. Objemy částic byly použity k úpravě koncentrace každé emulze na přibližně 1 % objemové dispergované fáze přidáním vody MilliQ. Emulze pak byly až do použití uloženy do lednice.

Tabulka 1

Příprava č.	Kationtová přísada	Střední průměr částic (μm)
19	DC-cholesterol	3
20	1,2-distearoylethylfosfocholin	2,4
21	benzylcetyldimethylamoniumchorid	2,4
22	cetyltrimethylamoniumbromid	2,6
23	cetylpyridiniumchlorid	2,5
24	Palmitoyl-Dpr(palmitoyl)-Arg-Arg-Lys-NH ₂ (př.13)	3,6
25	myristoylcholinchlorid	2,9
26	2-aminoethylester kyseliny hexadekanové (př. 14)	2,5
27	4-aminobutylamid kyseliny hexadekanové (př. 15)	2,3
28	hexadecylester kyseliny aminooctové (př. 16)	2,4
29	cetylkarnitinester	2,4
30	psycosin	2,5
31	D-sfingosinsulfát	2,7
32	fyto sfingosin	2,4
33	DL-dihydrosfingosin	2,9
34	didodecyldimethylamoniumbromid	2,4
35	hexadecylester kyseliny methylaminooctové (př.17)	3,1
36	hexadecylester kyseliny dimethylaminooctové (př. 18)	3,5

Příprava 37

Emulze perfluordimethylcyklobutanu, obsahující kladně nabitý lipopeptid palmitoyl-Lys(palmitoyl)-Lys-Lys-Ahx-Lys-Arg-Lys-Arg-NH₂, kde Ahx = kyselina aminohexanová

90 mg distearoylfosfatidylcholinu a 10 mg kladně nabitého lipopeptidu palmitoyl-Lys(palmitoyl)-Lys-Lys-Ahx-Lys-Arg-Lys-Arg-NH₂, z přípravy 12, se uloží do lahvičky s okrouhlým dnem s objemem 50 ml a přidá se 10 ml chloroformu. Lahvička se zahřívá pod proudem teplé vody z vodovodního kohoutku tak dlouho, až se vytvoří čirý roztok. Pak se lahvička uloží do rotačního odpařovače a chloroform se odstraní odpařením. Aby bylo možno odstranit zbývající stopy rozpouštědla, je možno směs uložit přes noc ve vakuu. Pak se přidá 20 ml vody MilliQ a lahvička se znovu uloží do rotačního odpařovače při plné rychlosti za současného ponoření do vodní lázně s teplotou 80 °C. Po době přibližně 10 minut se vzorek přinese do vhodné lahvičky a uloží přes noc do lednice.

Podíly směsi s objemem 1 ml se přenesou do chromatografických nádobek s objemem 2 ml a do každé nádoby se přidá 100 µl perfluordimethylcyklobutanu. Nádoby se pak protřepávají 75 sekund na zařízení Espe CapMix^R, načež se vzorky okamžitě zchladí v ledu. Obsahy nádobek se spojí do větší nádoby a emulze se charakterizují ke stanovení distribuce velikosti částic a celkového objemu částic při použití zařízení Coulter counter. Zjištění objemové koncentrace částic se užije pro úpravu koncentrace dispergované fáze na přibližně 1 % objemové přidáním vody MilliQ. Pak se emulze až do použití uloží do lednice.

Příklad 1

Zobrazení srdce psa in vivo

Nečistokrevný pes s hmotností 20 kg byl anestezován, ve střední čáře byla provedena sternotomie a byla odstraněna přední část osrdečníku. Pak bylo provedeno zobrazení srdce ve směru krátké osy při použití B-způsobu zařízením ATL HDI-3000 při použití sondy ze silikonové pryže s průměrem 30 mm s malým zeslabením, zařízení bylo opatřeno převaděčem P3-2. Použitá rychlost mřížky byla 40 Hz a mechanický index 1,1.

a) (srovnávací) zobrazení bylo provedeno při použití disperze plynného perfluorbutanu s negativním nábojem a negativně nabitě emulze perfluordimethylcyklobutanu

Psovi bylo současně nitrožilně vstříknuto množství plynné disperze perfluorbutanu z přípravy 1, odpovídající 0,2 μ l plynu/kg tělesné hmotnosti a množství emulze perfluordimethylcyklobutanu z přípravy 6, odpovídající 0,4 mikrolitrům perfluordimethylcyklobutanu/kg tělesné hmotnosti. Bylo možno pozorovat podstatný vzestup odrazu ze srdečního svalu od 20 sekund po injekci, toto zesílení mělo trvání 10 minut. Vymytí kontrastního prostředku z krevního oběhu bylo možno pozorovat dříve než pokles kontrastního účinku v srdečním svalu.

b) zobrazení při použití plynné disperze perfluorbutanu s negativním nábojem a kladně nabitě emulze perfluordimethylcyklobutanu ve vysoké dávce

Psovi bylo současně nitrožilně podáno množství disperze plynného perfluorbutanu z přípravy 1, odpovídající 0,2 μ l plynu/kg tělesné hmotnosti a množství emulze perfluordimethylcyklobutanu z

přípravy 4, odpovídající 0,1 μ l perfluordimethylcyklobutanu/kg tělesné hmotnosti. Výsledný kontrastní efekt v srdečním svalu byl daleko vyjádřenější než při pokusu (a) a trval 20 minut.

c) zobrazení při použití plynné disperze perfluorbutanu s negativním nábojem a pozitivně nabitě emulze perfluordimethylcyklobutanu v nízké dávce

Byl opakován postup z příkladu 1 (b) s tím rozdílem, že dávka emulze perfluordimethylcyklobutanu byla snížena na množství, odpovídající 0,02 μ l perfluordimethylcyklobutanu/kg tělesné hmotnosti. Výsledný kontrastní účinek v srdečním svalu byl srovnatelný s účinkem, pozorovaným v příkladu 1 (a).

Příklad 2

Zobrazení psího srdce in vivo při použití nízké dávky kontrastního prostředku

a) zobrazení při použití disperze plynného perfluorbutanu s negativním nábojem a pozitivně nabitě emulze perfluorhexanu.

Byl opakován způsob podle příkladu 1 (b) s tím rozdílem, že emulze perfluormethylcyklobutanu byla nahrazena množstvím emulze perfluorhexanu z přípravy 5, které odpovídá dávce 0,02 μ l perfluorhexanu/kg tělesné hmotnosti. Výsledný kontrastní účinek v srdečním svalu byl srovnatelný s účinkem, pozorovaným v příkladu 1 (a).

b) (srovnávací) zobrazení při použití disperze plynného perfluorbutanu s negativním nábojem a negativně nabitě emulze perfluordimethylcyklobutanu

Byl opakován způsob podle příkladu 1 (a) s tím rozdílem, že dávka emulze perfluordimethylcyklobutanu byla snížena na množství, odpovídající 0,02 μl perfluordimethylcyklobutanu/kg tělesné hmotnosti. Bylo možno pozorovat pouze slabé kontrastní účinky při zobrazení srdečního svalu.

c) (srovnávací) zobrazení s použitím disperze plynného perfluorbutanu s kladným nábojem a kladně nabitě emulze perfluorhexanu

Psovi bylo současně nitrožilně podáno množství disperze plynného perfluorbutanu z přípravy 2, odpovídající 0,2 μl plynu/kg tělesné hmotnosti a množství emulze perfluorhexanu z přípravy 5, odpovídající 0,02 μl perfluorhexanu/kg tělesné hmotnosti, načež bylo provedeno zobrazení stejným způsobem jako v příkladu 1. Bylo možno pozorovat jen slabý kontrastní účinek v srdečním svalu.

d) zobrazení s použitím disperze plynného perfluorbutanu s kladným nábojem a negativně nabitě emulze perfluordimethylcyklobutanu

Psovi bylo současně nitrožilně podáno množství disperze plynného perfluorbutanu z přípravy 2, odpovídající 0,2 μl plynu/kg tělesné hmotnosti a množství emulze perfluordimethylcyklobutanu z přípravy 6, odpovídající 0,02 μl perfluorhexanu/kg tělesné hmotnosti, načež bylo provedeno zobrazení stejným způsobem jako v příkladu 1. Výsledný kontrastní účinek v srdečním svalu byl srovnatelný s účinkem, pozorovaným v příkladu 1 (a).

Příklad 3 (srovnávací)

Zobrazení psího srdce pouze při použití kladně nabitě emulze perfluorhexanu

Psovi bylo nitrožilně podáno množství emulze perfluorhexanu z přípravy 5, odpovídající $0,02 \mu\text{l}$ perfluorhexanu/kg tělesné hmotnosti, načež bylo provedeno zobrazení stejným způsobem jako v příkladu 1. Nebylo možno pozorovat žádný kontrastní účinek v srdečním svalu ani v krevním proudu.

Příklad 4 (srovnávací)

Zobrazení psího srdce bez předběžného působení ultrazvuku

Byl opakován způsob podle příkladu 1 (c) s tím rozdílem, že generátor ultrazvuku byl první 2 minuty po vstříknutí kontrastního prostředku nitrožilní injekcí vypnut. Po opětovném zapnutí přístroje bylo možno pozorovat po krátké době v srdečním svalu kontrastní účinek, srovnatelný s účinkem, který bylo možno pozorovat po téže době při použití téhož zařízení v případě, že byla vstříknuta pouze disperze plynného perfluorbutanu.

Příklad 5

Zobrazení psího srdce při použití disperze plynného biotinylovaného perfluorbutanu a emulze avidinylovaného perfluordimethylcyklobutanu

Psovi bylo současně nitrožilně vstříknuto množství disperze plynného perfluorbutanu z přípravy 3, odpovídající $0,02 \mu\text{l}$ plynu/kg tělesné hmotnosti a množství emulze perfluordimethylcyklobutanu z přípravy 7, odpovídající $0,02$ mikrolitrů perfluordimethylcyklobutanu/kg tělesné hmotnosti.

Zobrazení srdce bylo uskutečněno při použití zařízení Vingmed CFM-750 při použití projekce ve střední krátké ose. Zařízení bylo

upraveno tak, aby zobrazená tkáň v dané oblasti byla maximálně vystavena působení ultrazvuku při použití kombinace zvýšeného výkonu (7 na stupnici v rozsahu 0 až 7) při vysoké rychlosti mřížky. Po vstříknutí bylo možno nejprve pozorovat zesílení kontrastu v obou srdečních komorách. Stálý vzestup zlepšení kontrastu bylo možno pozorovat ve všech oblastech srdečního svalu až do maximálního zvýšení na displeji. Trvání kontrastu bylo přibližně 30 minut, i když kontrastní účinek v krevním proudu byl již po 5 minutách po injekci snížen téměř na základní hodnotu, takže bylo možno pozorovat úplné a velmi jasné zesílení obvodových kontur srdečního svalu. Kontrastní účinky v srdečním svalu v blízkosti převaděče nebyly sníženy přes působení vysoké intenzity ultrazvuku po celou dobu zobrazení.

Příklady 6 až 9

Zobrazování psího srdce s použitím disperze plynného perfluorbutanu s negativním nábojem a pozitivně nabitých emulzí z příprav 8 až 11.

Nečistokrevný pes s hmotností 19 kg byl anestetizován, byla provedena sternotomie ve střední čáře a byla odstraněna přední část osrdečníku. Pak bylo provedeno zobrazení B-způsobem ve směru krátké osy při použití sondy ze silikonové pryže s průměrem 30 mm s malým zeslabením, dále bylo použito zařízení ATL HDI-3000, opatřené převaděčem P3-2. Rychlost mřížky byla 40 Hz a mechanický index 1,1. Množství disperze plynného perfluorbutanu z přípravy 1 odpovídalo 0,2 μ l plynu/kg tělesné hmotnosti a bylo podáno nitrožilně současně s takovým množstvím některé z emulzí z příprav 8 až 11, které odpovídalo 0,02 μ l těkavého oleje/kg tělesné hmotnosti. V každém případě bylo možno pozorovat podstatný vzestup kontrastnosti srdečního svalu od 20 sekund po injekci, nejvyšší intenzita odpovídala intenzitě, pozorované v příkladu 1 (a).

Intenzita ultrazvuku v srdečním svalu 90 sekund po injekci byla opravena s ohledem na základní hodnotu a výsledné zesílení kontrastu v srdečním svalu (MCE), získané uvedeným způsobem je shrnuto v následující tabulce 2.

Tabulka 2

Příklad č.	Difusibilní složka	MCE s opravou na základní hodnotu (dB)
6	perfluordimethylcyklobutan	7,9
7	perfluormethycyklopentan	4,8
8	perfluor-2-methylpentan	6,6
9	perfluorhexan	7,5

Podstatný vzestup kontrastnosti srdečního svalu bylo možno pozorovat v době, kdy komory již téměř neobsahovaly kontrastní prostředek, což prokazuje, že pozorované zesílení kontrastu je vyvoláno přítomností mikrobublinek, zadržených v srdečním svalu. Trvání kontrastního účinku bylo v rozsahu 5 až 20 minut a bylo závislé na různých faktorech, např. na rozpustnosti těkavého oleje ve vodě a na tlaku jeho par. V následující tabulce 3 jsou uvedeny poločasy MCE pro každý z pokusů.

Tabulka 3

Příklad č.	Difusibilní složka	MCE poločas (min)
6	perfluordimethylcyklobutan	2,9*
7	perfluormethycyklopentan	1,9
8	perfluor-2-methylpentan	6,9
9	perfluorhexan	7,4

*průměr ze dvou měření po 2,3 a 3,4 minutách

Příklady 10 až 27

Zobrazení psího srdce při použití disperze plynného perfluorbutanu s negativním nábojem a pozitivně nabitě emulze podle příprav 19 až 36.

Nečistokrevný pes s hmotností 24 kg byl anestetizován, byla provedena sternotomie ve střední čáře a byla odstraněna přední část osrdečníku. Pak bylo provedeno zobrazení srdce B-způsobem podle krátké osy při použití sondy ze silikonové pryže s průměrem 30 mm a zařízení ATL HDI-3000, vybaveného převaděčem P3-2. Rychlost mřížky byla 40 Hz a mechanický index 1,1. Psovi bylo současně nitrožilně podáno množství disperze plynného perfluorbutanu z přípravy 1, odpovídající 0,2 μ l plynu/kg tělesné hmotnosti a množství perfluordimethylcyklobutanové emulze, odpovídající 0,02 μ l perfluordimethylcyklobutanu/kg tělesné hmotnosti v případě použití emulzí z příprav 19 až 28. V případě kontrastních prostředků, obsahujících emulzi z příprav 29 až 36 byly odpovídající dávky 0,35 μ l plynu/ml a 0,04 μ l/ml perfluordimethylcyklobutanu. Od 20 sekund po provedení injekce bylo možno pozorovat podstatný vzestup kontrastnosti srdečního svalu, tento vzestup trval přibližně 10 minut a v každém případě byla maximální intenzita vyšší, než jakou bylo možno pozorovat v příkladu 1 (a).

Kontrastnost srdečního svalu přibližně 2 minuty po vstříknutí kontrastního prostředku byla opravena s ohledem na základní hodnotu, takto získané zesílení kontrastu srdečního svalu, MCE, je shrnuto v následující tabulce 4. Podstatný vzestup bylo možno pozorovat již v době, kdy srdeční komory téměř neobsahovaly kontrastní prostředek, což prokazuje, že pozorované zesílení kontrastu bylo vyvoláno mikrobublínkami plynu, zadržnými v srdečním svalu.

Tabulka 4

Příklad č.	Kationtová přísada	MCE s opravou na základní hodnotu (dB)
10	DC-cholesterol	11,78
11	1,2-distearoylethylfosfocholin	17,03
12	benzylcetyldimethylamoniumchorid	10,43
13	cetyltrimethylamoniumbromid	11,46
14	cetylpyridiniumchlorid	11,16
15	Palmitoyl-Dpr(palmitoyl)-Arg-Arg-Lys-NH ₂	10,64
16	myristoylcholinchlorid	10,29
17	2-aminoethylester kyseliny hexadekanové	14,41
18	4-aminobutylamid kyseliny hexadekanové	12,74
19	hexadecylester kyseliny aminooctové	16,14
20	cetylkarnitinester	12,11
21	psycosin	13,56
22	D-sfingosinsulfát	13,44
23	fyto sfingosin	13,56
24	DL-dihydrosfingosin	17,05
25	didodecyldimethylamoniumbromid	9,54
26	hexadecylester kyseliny methylaminooctové	15,50
27	hexadecylester kyseliny dimethylaminooctové	15,33

Příklad 28

Zobrazení psího srdce při použití disperze plynného perfluorbutanu s negativním nábojem a kladně nabitě emulze z přípravy 37.

Nečistokrevný pes s hmotností 20 kg byl anestetizován, byla provedena sternotomie ve střední čáře a byla odstraněna přední část ordečnicku. Pak bylo provedeno zobrazení srdce B-způsobem ve směru krátké osy při použití sondy ze silikonové pryže z průměrem 30 mm a zařízení ATL HDI-3000, vybaveného převaděčem P3-2. Rychlost mřížky byla 40 Hz a mechanický index 1,1. Psovi bylo současně nitrožilně podáno množství disperze plynného perfluorbutanu z přípravy 1, odpovídající 0,1 μ l plynu/kg tělesné hmotnosti a množství perfluordimethylcyklobutanové emulze z přípravy 37, odpovídající 0,04 μ l perfluordimethylcyklobutanu/kg tělesné hmotnosti. Pak byl měřen vzestup kontrastnosti srdečního svalu a trvání tohoto jevu.

Zastupuje:

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Kombinovaný prostředek pro současné, oddělené nebo následné použití jako kontrastní prostředek při zobrazování pomocí ultrazvuku, prostředek obsahuje:
 - (i) první prostředek, kterým je injekční vodné prostředí s obsahem dispergovaného plynu a materiálu pro stabilizaci tohoto plynu a
 - (ii) druhý prostředek, kterým je injekční emulze typu olej ve vodě, v níž olejová fáze obsahuje difusibilní složku, schopnou difundovat in vivo do dispergovaného plynu a alespoň přechodně zvětšit jeho rozměr, přičemž tento prostředek dále obsahuje materiál pro stabilizaci emulze, v y z n a č u j í c í s e t í m, že materiál, přítomný na povrchu dispergované plyné fáze a materiál, přítomný na povrchu dispergované olejové fáze mají vzájemnou afinitu.
2. Kombinovaný prostředek podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jako dispergovaný plyn obsahuje vzduch, dusík, kyslík, oxid uhličitý, vodík, inertní plyn, fluorid síry, fluorid selenový, silan, případně halogenovaný, uhlovodík s nízkou molekulovou hmotností, popř. halogenovaný, keton, ester nebo jakoukoliv směs uvedených plynů.
3. Kombinovaný prostředek podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jako plyn obsahuje fluorid sírový nebo perfluorovaný uhlovodík.
4. Kombinovaný prostředek podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jako perfluorovaný uhlovodík obsahuje perfluorpropan, perfluorbutan nebo perfluorpentan.

5. Kombinovaný prostředek podle některého z nároků 1 až 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dispergovaný plyn je stabilizován použitím povrchové membrány, odolné proti spojování bublinek plynu, proteinem, vytvářejícím plyn, polymerním materiálem, nepolymerním a nepolymerovatelným materiálem, vytvářejícím přepážky nebo smáčedlem.
6. Kombinovaný prostředek podle nároku 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jako smáčedlo obsahuje alespoň jeden fosfolipid.
7. Kombinovaný prostředek podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že alespoň 75 % smáčedla je tvořeno molekulami fosfolipidu, nesoucími náboj.
8. Kombinovaný prostředek podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že alespoň 75 % smáčedla je tvořeno jedním nebo větším množstvím fosfolipidů ze skupiny fosfatidylserinu, fosfatidylglycerolů, fosfatidylinositolů, fosfatidových kyselin a cardiolipinů.
9. Kombinovaný prostředek podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, že nejméně 80 % fosfolipidů je tvořeno fosfatidylseriny.
10. Kombinovaný prostředek podle některého z nároků 1 až 9, v y z n a č u j í c í s e t í m, že difusibilní složka je tvořena alifatickým étherem, polycyklickým olejem, polycyklickým alkoholem, heterocyklickou sloučeninou, alifatickým uhlovodíkem, cykloalifatickým uhlovodíkem nebo halogenovaným uhlovodíkem s nízkou molekulovou hmotností nebo jde o směs kterýchkoliv z uvedených sloučenin.
11. Kombinovaný prostředek podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že difusibilní složka je tvořena jedním nebo větším počtem perfluorovaných uhlovodíků.

12. Kombinovaný prostředek podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m, že perfluorované uhlovodíky jsou tvořeny jednou nebo větším počtem sloučenin ze skupiny perfluoralkany, perfluoralkeny, perfluorcykloalkany, perfluorcykloalkeny a/nebo perfluorované alkoholy.
13. Kombinovaný prostředek podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m, že difusibilní složka je tvořena jednou nebo větším počtem sloučenin ze skupiny perfluorpentany, perfluorhexany, perfluordimethylcyklobutany a/nebo perfluormethylcyklopentany.
14. Kombinovaný prostředek podle některého z nároků 1 až 13, v y z n a č u j í c í s e t í m, že emulze s obsahem difusibilní složky je stabilizována fosfolipidovým nebo lipopeptidovým smáčedlem.
15. Kombinovaný prostředek podle některého z nároků 1 až 14, v y z n a č u j í c í s e t í m, že první a druhý prostředek obsahují povrchově aktivní materiály s opačným nábojem.
16. Kombinovaný prostředek podle nároku 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, že první prostředek obsahuje aniontové smáčedlo a druhý prostředek obsahuje kationtový povrchově aktivní materiál.
17. Kombinovaný prostředek podle nároku 16, v y z n a č u j í c í s e t í m, že aniontovým materiálem je fosfolipid, nesoucí negativní náboj a kationtovým materiálem je lipofilní kvarterní amoniová sůl, lipofilní pyridiniová sůl, lipofilní primární, sekundární nebo terciární amin, amid mastné kyseliny, vytvořený s diaminem nebo triaminem, popř. substituovaným, ester mastného alkoholu s aminokyselinou nebo fosfolipid nebo lipopeptid s kladným nábojem.

18. Kombinovaný prostředek podle nároku 17, v y z n a č u j í c í s e t í m, že kationtový materiál je přítomen jako přísada ke stabilizačnímu materiálu druhého prostředku.

19. Kombinovaný prostředek podle některého z nároků 1 až 18, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje látku, rozšiřující a/nebo zužující cévy.

20. Kombinovaný prostředek podle nároku 19, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jako látku, rozšiřující cévy obsahuje adenosin.

21. Kombinovaný prostředek podle některého z nároků 1 až 18, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje léčivo.

22. Kombinovaný prostředek podle některého z nároků 1 až 18, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje skupiny, zvyšující kontrast při jiném způsobu zobrazení než s použitím ultrazvuku.

23. Způsob vytváření zlepšených obrazů lidského nebo jiného živočišného organismu, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se
(i) do cévního systému subjektu vstříkne první prostředek, definovaný v nároku 1,
(ii) před vstříknutím tohoto prostředku, v průběhu jeho vstřikování nebo po jeho vstříknutí, se vstříkne druhý prostředek, definovaný v nároku 1,
(iii) vytvoří se ultrazvukový obraz alespoň části organismu uvedeného subjektu.

24. Způsob podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že růst mikrobublinek kontrastního prostředku se aktivuje v organismu zevními prostředky.

25. Způsob podle nároku 24, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se aktivace uskuteční pomocí ozáření ultrazvukem.

26. Způsob podle některého z nároků 23 až 25, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se současně podává látka, rozšiřující nebo zužující krevní cévy.

27. Způsob podle nároku 26, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se jako látka, rozšiřující cévy užije adenosin.

Zastupuje: