

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

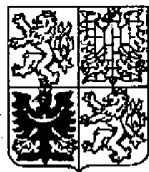
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

## 2626-98

(19)

ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **19. 02. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **19.02.96,  
07.06.96, 29.11.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/9603466, 96/9611894,  
96/9624919**

(33) Země priority: **GB, GB, GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17. 03. 99**  
**(Věstník č. 3/99)**

(86) PCT číslo: **PCT/GB97/00458**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/29782**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>:

**A 61 K 49/00**

(71) Přihlášovatel:

NYCOMED IMAGING A/S, Oslo, NO;

(72) Původce:

Swaerd-Nordmo Marit, Oslo, NO;

Gulliksen Per Helge, Oslo, NO;

Braenden Jorunn Undheim, Oslo, NO;

Fahlvik Anne Kjersti, Oslo, NO;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Břehová 1, Praha  
1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Kontrastní prostředek pro zobrazování  
ultrazvukem a způsob jeho výroby**

(57) Anotace:

Kontrastní prostředek pro zobrazování ultrazvukem v lyofilizovaném stavu obsahuje mikrobublínky a stabilizátor lyofilizace v hmotnostním poměru k mikrobublínkám nejméně 10 : 1, přičemž prostředek je tepelně stálý při teplotě vyšší než 20°C. Prostředek je možno získat tak, že se lyofilizuje vodná disperze, obsahující kontrastní činidlo ve formě mikrobublinek a stabilizátor lyofilizace nebo směs stabilizátorů s hodnotou T<sub>g</sub> nejméně 20°C a hodnotou T<sub>g</sub> -37°C nebo vyšší při hmotnostním poměru stabilizátoru ke kontrastnímu činidlu ve formě mikrobublinek nejméně 10 : 1.

CZ 2626-98 A3

Kontrastní prostředek pro zobrazování ultrazvukem a způsob jeho výroby

### Oblast techniky

Vynález se týká kontrastního prostředku pro zobrazování ultrazvukem, tepelně stabilizovaného a způsobu výroby tohoto prostředku. Prostředek obsahuje stabilizovanou disperzi mikrobublinek.

### Dosavadní stav techniky

Mikrobublínky (tento pojem se užívá k označení unilamelárních a multilamelárních struktur, jako liposomů, micel a mikrobublinek) jsou často užívány jako nosný prostředek pro léčivé nebo diagnostické látky. Při zobrazování ultrazvukem je možno použít mikrobublínky s obsahem různých materiálů, plyných při tělesné teplotě jako kontrastních látek, zvláště při zobrazování úseků cévního systému.

Kontrastní prostředky tohoto typu se obvykle podávají ve formě vodné disperze, obsahující nízkou koncentraci mikrobublinek relativně k nosnému vodnému prostředí. Z tohoto důvodu je výhodné skladování a přeprava těchto kontrastních prostředků za podmínek, při nichž jsou mikrobublínky uloženy v suché formě.

Vhodná je lyofilizace prostředků tohoto typu za použití pomocných prostředků, které usnadňují vymrazování. Tyto pomocné prostředky obvykle slouží ke dvěma účelům. Především se přidávají činidla, zvyšující celkový obsah pevného podílu tak, aby bylo možno získat produkt s vhodnějšími mechanickými vlastnostmi. Mimoto se přidávají stabilizátory, které napomáhají vzniku sklovité formy v



průběhu dehydratace a zvyšují fyzikální pevnost sušeného výrobku. Jako příklady těchto stabilizátorů je možno uvést mannitol a glukosu.

Lyofilizované kontrastní prostředky pro zobrazování ultrazvukem jsou výhodné z hlediska přepravy a skladování vzhledem ke sníženému objemu ve srovnání s vodnými prostředky, připravenými pro použití, jsou však také spojeny s určitými problémy vzhledem k tomu, že takto připravený produkt není stálý při teplotách v průběhu přepravy a skladování a z těchto důvodů musí být před dalším zpracováním uchováván při nižších teplotách, například 5 až 10 °C.

Nyní bylo neočekávaně zjištěno, že při vhodné volbě stabilizátoru v průběhu lyofilizace je možno získat lyofilizované kontrastní prostředky s obsahem mikrobublinek pro zobrazování ultrazvukem, které jsou stálé při teplotě okolí a při poněkud vyšší teplotě, takže snášejí teploty v průběhu přepravy a skladování.

Tepelné stálé lyofilizované produkty je tedy možno skladovat a přepravovat bez potřeby použít řízenou teplotu, mimoto je možno je dodávat i v terénu za podmínek, při nichž uživatel nemá specifické prostředky pro skladování látek, vyžadujících použití nízkých teplot.

#### Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tvoří kontrastní prostředek pro zobrazování ultrazvukem v lyofilizovaném stavu, obsahující mikrobublinky a stabilizátor, stálý při teplotě vyšší než 20 °C, s výhodou nejméně 22 a zvláště 25 nebo až 30, zejména nejméně 40 nebo až 65 °C nebo vyšší. Jde tedy o kontrastní prostředek pro zobrazování ultrazvuku, v lyofili-

zovaném stavu, obsahující mikrobublínky a stabilizátor a mající teplotu skelného přechodu  $T_g$  vyšší než 20, s výhodou vyšší než 22 a zvláště vyšší než 25, ještě výhodněji vyšší než 30 a zvláště výhodně nejméně 40, například až  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  nebo vyšší.

Součástí podstaty vynálezu tvoří také způsob výroby tepelně stálého lyofilizovaného kontrastního prostředku pro zobrazování ultrazvukem s obsahem mikrobublinek, postup spočívá v tom, že se lyofilizuje vodná disperze, obsahující kontrastní činidlo ve formě mikrobublinek a stabilizátor lyofilizace nebo směs stabilizátorů, přičemž stabilizátor nebo směs stabilizátorů má hodnotu  $T_g$  nejméně  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , s výhodou nejméně 22, zvláště nejméně 25, ještě výhodněji nejméně 30 a zvláště výhodně nejméně 40, například až  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  nebo vyšší a hodnotu  $T_g$   $-37\text{ }^{\circ}\text{C}$  nebo vyšší, s výhodou vyšší než  $-36\text{ }^{\circ}\text{C}$  a zvláště výhodně vyšší než  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ , například  $-10$  až  $-37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Součástí podstaty vynálezu tvoří kompresní prostředek pro zobrazování ultrazvukem, který obsahuje vodné nosné prostředí, stabilizátor lyofilizace nebo směs takových stabilizátorů a echogenní kontrastní činidlo pro zobrazování ultrazvukem ve formě mikrobublinek, přičemž stabilizátor nebo směs stabilizátorů má hodnotu  $T_g$  nejméně  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , s výhodou nejméně 22, zvláště nejméně 25, ještě výhodněji nejméně 30 a zvláště výhodně nejméně 40, například až  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  nebo vyšší a hodnotu  $T_g$  vyšší než  $-37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , s výhodou vyšší než  $-36$  a zvláště výhodně vyšší než  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ , například  $-10$  až  $-37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Součástí podstaty vynálezu tvoří také použití stabilizátoru lyofilizace nebo směsi takových stabilizátorů s hodnotou  $T_g$  nejméně  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , s výhodou nejméně 22, zvláště

nejméně 25, ještě výhodněji nejméně 30 a zvláště výhodně nejméně 40, například až 65 °C nebo vyšší a hodnotu  $T_g$  -37 °C nebo vyšší, s výhodou vyšší než -36 a zvláště výhodně vyšší než -35 °C, například -10 až -37 °C pro výrobu kontrastního prostředku s obsahem mikrobublinek pro diagnostické účely při zobrazování ultrazvukem.

Součástí podstaty vynálezu tvoří také způsob skladování a přepravy kontrastních látek pro zobrazování ultrazvukem ve formě mikrobublinek, který spočívá v tom, že se kontrastní látka přepravuje a skladuje v lyofilizované formě s obsahem stabilizátoru lyofilizace, přičemž teplota skelného přechodu  $T_g$  je nejméně 20 °C, s výhodou nejméně 22 °C a prostředek se skladuje a přepravuje bez chlazení.

Tato kontrastní látka se pak disperguje ve fyziologicky přijatelném vodném prostředí, vhodném pro vznik disperze.

Pro jakýkoliv materiál je  $T_g$  teplota skelného přechodu pro materiál v suchém stavu, kdežto  $T_g'$  je teplota skelného přechodu pro maximálně koncentrovaný lyofilizovaný čistý vodný roztok téhož materiálu.

Kromě zlepšení stálosti při vyšší teplotě má kontrastní prostředek v lyofilizované formě s obsahem mikrobublinek také překvapující schopnost mikrobublinek zadržet plynné halogenované uhlovodíky a jejich prekursory, které se běžně užívají v kontrastních prostředcích pro zobrazování pomocí ultrazvuku.

Kontrastní látkou pro zobrazování pomocí ultrazvuku může být jakákoliv fyziologicky přijatelná echogenní látka ve formě mikrobublinek, avšak s výhodou budou mikrobublínky

obsahovat plyn nebo prekursor plynu, například sloučeninu nebo směs sloučenin, která je v podstatě v plynné formě (včetně par) při teplotě lidského těla 37 °C. Je možno použít jakýkoliv biokompatibilní plyn, prekursor plynu nebo směs plynů nebo prekursorů. Může jít například o vzduch, dusík, kyslík, oxid uhličitý, vodík, oxid dusnatý, inertní plyn, jako helium, argon, xenon nebo krypton, fluoridy síry, jako hexafluorid síry, fluorid dvojsírový nebo pentafluorid trifluormethylsíry, hexafluorid selenu a silany, popřípadě halogenované, například tetramethylsilan, dále uhlovodíky s nízkou molekulovou hmotností až do obsahu 7 atomů uhlíku, může jít například o alkan, jako metan, ethan, propan, butan nebo pentan, o cykloalkan, jako cyklobutan nebo cyklopentan, o alken, jako propen nebo buten, o alkin, jako acetylen, dále je možno použít ethery, ketony, estery, halogenované uhlovodíky s nízkou molekulovou hmotností do obsahu například 7 atomů uhlíku nebo směsi těchto látek. Při nejmenším některé halogenované atomy v halogenovaných plynech s výhodou nesou atomy fluoru. Tyto biokompatibilní plynné halogenované uhlovodíky se volí například ze skupiny bromchlordifluormethan, chlordifluormethan, dichlordifluormethan, bromtrifluormethan, chlortrifluormethan, chlorpentafluorethan, dichlortetrafluorethan, perfluorované uhlovodíky, například perfluoralkany, jako perfluormethan, perfluorethan, perfluorpropan, perfluorbutany, například perfluor-n-butan, popřípadě ve směsi s dalšími isomery, jako perfluorisobutanem, perfluorpentany, perfluorhexany a perfluorheptany, dále perfluoralkeny, například perfluorpropen, perfluorbuteny, například perfluorbut-2-en a perfluorbutadien, perfluoralkiny, jako perfluorbut-2-in a perfluoralkany, jako perfluorcyklobutan, perfluormethylcyklobutan, perfluordimethylcyklobutany, perfluortrimethylcyklobutany, perfluorcyklopentan, perfluormethylcyklopentan, perfluordimethylcyklopentany, perfluorcyklohexan, perfluormethylcyklohexan a perfluorcykloheptan. Z dalších halogenovaných plynů je

možno uvést fluorované, například perfluorované ketony, jako perfluoraceton a fluorované, například perfluorované ethery, jako perfluordiethylether.

Ve zvláště výhodném provedení obsahují mikrobublínky perfluoralkan, zvláště perfluorbutan, perfluorpentan nebo perfluorhexan a zvláště výhodně n-perfluorobutan.

V mikrobublínkách může být membrána vytvořena z jakéhokoliv fyziologicky přijatelného materiálu pro tvorbu membrán, může jít například o fosfolipidy, které mohou, avšak nemusí být zesítěny. Zvláště výhodné jsou membrány, tvořené směsí fosfolipidů s nábojem a bez náboje a ve zvláště výhodném provedení by měly mikrobublínky nést zcela určitý definovaný povrchový náboj, s výhodou negativní. Takové fosfolipidové mikrobublínky mají zvláště výhodnou dobu, po níž přetrvávají v krevním oběhu.

Mikrobublínky mohou dále obsahovat činidlo, prodlužující dobu jejich pobytu v krevním oběhu, toto činidlo je možno konjugovat s membránou nebo s lipofilní skupinou, zakotvenou v membráně. Z látek, prodlužujících dobu pobytu mikrobublínek v krevním oběhu je možno uvést polyalkylenoxidy, například polyethylenglykol, které prodlužují dobu příjmu mikrobublínek z krevních cév do retikuloendotheliálního systému.

Je žádoucí, aby alespoň 75 % a s výhodou veškerý fosfolipidový materiál v kontrastním prostředí byl tvořen molekulami, které za podmínek přípravy a/nebo použití jednotlivě nesou určitý náboj, který může být pozitivní, avšak s výhodou je negativní. Jako příklad pozitivně nabitých fosfolipidů je možno uvést estery fosfatidových kyselin, například estery dipalmitoylfosfatidové kyseliny nebo disteroyl-

fosfatidové kyseliny s aminoalkoholy, například s hydroxyethylendiaminem. Jako příklad negativně nabitých fosfolipidů je možno uvést přirozeně se vyskytující (například v soji nebo vaječném žloutku), polosyntetické (například částečně nebo zcela hydrogenované) a syntetické fosfatidylseriny, fosfatidylglyceroly, fosfatidylinositoly, fosfatidové kyseliny a kardiolipiny. Acylové skupiny mastných kyselin v těchto fosfolipidech budou typicky obsahovat 14 až 22 atomů uhlíku a může například jít o palmitoylovou nebo stearoylovou skupinu. Použitelné jsou také lysoformy nabitých fosfolipidů, přičemž pojem "lyso" označuje fosfolipidy, které obsahují acylovou skupinu pouze jedné mastné kyseliny, která je s výhodou vázána esterovou vazbou na uhlíkový atom v poloze 1 glycerylové skupiny. Takové lysoformy nabitých fosfolipidů je s výhodou možno užít ve směsi s nabitými fosfolipidy, obsahujícími dvě acylové skupiny mastných kyselin.

Fosfatidylseriny představují zvláště výhodnou skupinu fosfolipidů pro použití v kontrastních prostředcích podle vynálezu a s výhodou tvoří podstatnou část, například nejméně 80 % počátečního obsahu fosfolipidů v těchto prostředcích, například 85 až 92 %, přestože toto množství může být poněkud sníženo v průběhu následného zpracování, například při sterilizaci působením tepla, například na přibližně 70 %. I když není žádoucí se vázat na teoretické úvahy, je pravděpodobné, že iontové síly mezi karboxylovou skupinou a amino skupinami přilehlých serinových skupin přispívají ke stabilitě těchto systémů. Výhodnými fosfatidylseriny jsou například nasycené (například hydrogenované nebo syntetické) přírodní fosfatidylseriny a syntetické nebo polosyntetické dialkanoylfosfatidylseriny, jako distearoylfosfatidylserin, dipalmitoylfosfatidylserin a diarachidoylfosfatidylserin.

Důležitá výhoda použití kontrastních prostředků na bázi fosfatidylserinů spočívá v tom, že lidský organismus



rozpoznává staré červené krvinky a destičky podle vysokých koncentrací fosfatidylserinu na jejich povrchu, takže může odstranit uvedené kontrastní prostředky z krevního objemu podobným způsobem, jako staré krevní elementy. Mimoto vzhledem k tomu, že povrch takového kontrastního prostředku může být vnímán jako organismu vlastní, nemusí dojít k nepříznivým systemickým účinkům, například hemodynamickým účinkům a dalším anafylaktickým reakcím, které mohou doprovázet podávání některých prostředků typu liposomů, jak je uvedeno například ve WO-A-95/12386.

Liposomální kontrastní prostředky pro zobrazování pomocí ultrazvuku je možno připravit způsobem, který byl v literatuře popsán, například v dokumentech WO-A-92/22247, WO-A-94/28780, WO-A-93/05819, WO-A-95/16467, PCT/GB96/01361 a Unger a další, Invest. Radiol., 29, Suppl. 2), 134-136, 1994.

Stabilizátor, použitý v prostředcích podle vynálezu může být jakýkoliv fyziologicky přijatelný stabilizátor lyofilizace nebo směs takových stabilizátorů s teplotou skelného přechodu  $T_g$  vyšší než  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , například v rozmezí 25 až  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  a s teplotou  $T_g$   $-37\text{ }^{\circ}\text{C}$  nebo vyšší. Jako příklady vhodných stabilizátorů je možno uvést sacharosu, maltosu, trehalosu, rafinosu a stachyosu. Zvláště výhodná je sacharosa, popřípadě ve směsi s menším množstvím (například až 20 % hmotnostních, s výhodou až 10 % hmotnostních) jiných stabilizátorů.

Obecně je možno uvést, že stabilizátor bude ve směsi, která má být lyofilizována přítomen v koncentraci, která podstatně převyšuje koncentraci kontrastního prostředku ve formě mikrobublinek, například v hmotnostním poměru nejméně 10 : 1, s výhodou 20 : 1, optimálně 200 : 1, například 5000 : 1 nebo i vyšší. V důsledku toho je příspěvek mikro-

bublínek k teplotě skelného přechodu  $T_g$  suchého produktu poměrně nezávislý a závisí převážně na stabilizátoru, takže je stabilizátory snadno možno zkoušet běžným způsobem a zjistit, zda mohou v kombinaci s ostatními pomocnými látkami ve vodném nosném prostředí vytvořit produkt, který má po usušení teplotu skelného přechodu  $T_g$  vyšší než  $20^\circ\text{C}$ .

Obvykle může být stabilizátor přítomen v množství 1 až 50, s výhodou 5 až 30 a zvláště 10 až 20 % hmotnostních lyofilizované směsi. Koncentrace stabilizátorů může být v případě potřeby značně vyšší než isotonická koncentrace vzhledem k tomu, že po rekonstituci po lyofilizaci je možno produkt ředit. Složka mikrobublínek bude přítomna v rozmezí 0,01 až 5, s výhodou 0,1 až 3 a zvláště 0,5 až 1,5 % hmotnostních, jako hmotnost této složky se uvažuje pouze hmotnost materiálu, tvořícího membránu. Množství stabilizátoru relativně k množství kapaliny, užití při rekonstituci tak, aby byla z lyofilizovaného produktu připravena disperze, kterou je možno podávat, bude záviset na zobrazované oblasti organismu nebo na zobrazovaném orgánu a na zvoleném způsobu podání. Může například jít o dvojnásobek množství prostředku, použitého k lyofilizaci.

Při zobrazování pomocí ultrazvuku, například při echokardiografii je vhodné, aby mikrobublínky volně procházely plicním systémem a současně bylo dosaženo výhodných frekvencí pro zobrazování v rozmezí 0,1 až 15 MHz a je tedy vhodné užít mikrobublínky se středním průměrem 0,1 až 10, například 1 až 7 mikrometrů. Mikrobublínky mohou být připraveny při velmi úzkém rozmezí distribuce průměrů v oblasti, výhodné pro echokardiografii, čímž je možno podstatně zvýšit jejich odraz ultrazvuku a současně také bezpečnost jejich použití in vivo, takže tyto kontrastní prostředky mají zvláštní výhodu při některých typech použití, například

měření krevního tlaku, měření průtoku krve a při ultrazvukové tomografii. Tímto způsobem je možno získat dobré výsledky zvláště při použití produktů, v nichž více než 90 % mikrobublinek (například nejméně 95 a s výhodou nejméně 98 %) má průměr v rozmezí 1 až 7 mikrometrů a méně než 5 % mikrobublinek (například nejvýše 3 a s výhodou nejvýše 2 %) mají průměr vyšší než 7 mikrometrů.

Kontrastní prostředky pro zobrazování ultrazvukem je například možno podávat v takových dávkách, že množství použitého materiálu pro tvorbu membrán, například fosfolipidu je v rozmezí 0,1 až 10, s výhodou 1 až 5 mikrogramů na kg tělesné hmotnosti. Je zřejmé, že použití takových nízkých dávek materiálu pro tvorbu membrán znamená podstatnou výhodu zejména v tom, že se na co nejmenší míru snižuje možnost výskytu toxických vedlejších účinků.

Celková koncentrace materiálu pro tvorbu membrán v prostředku, připraveném pro použití ze sušeného produktu podle vynálezu se bude s výhodou pohybovat v rozmezí 0,01 až 5, zvláště výhodně 0,05 až 2,0 % hmotnostních, velmi výhodný je zejména prostředek s obsahem 0,5 % hmotnostních tohoto materiálu.

Prostředek, který je podroben lyofilizaci by měl obsahovat ve výhodném provedení nejméně jedno činidlo pro zvýšení objemu, například polyol, zejména s obsahem tří hydroxylových skupin, jako glycerol nebo propylenglykol nebo polysacharid, například dextran, nebo také polyglykol, jako polyethylenglykol nebo směs těchto látek. V typických případech může být toto činidlo použito v koncentracích podobných nebo poněkud nižších než jsou koncentrace použitého stabilizátoru, například 3 až 10, s výhodou 5 % hmotnostních. Činidla pro zvýšení objemu by měla mít schopnost krystalizace

v průběhu lyofilizace, protože pouze v této formě mají neutrální účinek na stálost produktu. Tím se liší od stabilizátorů, které by měly být v průběhu lyofilizace přítomny v amorfním stavu.

Ve směsi, určené k lyofilizaci je možno použít také další pomocné látky nebo je možno takové látky přidávat do prostředku, připraveného pro podání. Může jít například o látky pro úpravu pH, osmotického tlaku nebo viskosity, nebo také o emulgátory, tyto látky se užívají v obvyklých množstvích.

Sušený produkt bude obvykle mít formu prášku, který se snadno rozpouští ve vodě, může však jít také o vodný roztok nebo o roztok ve fyziologickém roztoku tak, aby vstříkaný injekční roztok nebyl hypotonický, nebo může jít o roztok s obsahem několika solí pro úpravu osmotického tlaku, může jít například o běžné kationty krevní plasmy a odpovídající fyziologicky přijatelné anionty, prostředek může také obsahovat cukry, alkoholy odvozené od cukrů, glykoly a další neiontové materiály typu polyolů, například glukosu, sacharosu, sorbitol, mannitol, glycerol, polyethylenglykoly, propylenglykoly a podobně. Rekonstituce obvykle vyžaduje jen mírné míchání, obvykle stačí ruční protřepávání. Rozměr takto vytvořených mikrobublinek je dobře reprodukovatelný a prakticky nezávislý na množství energie, použité při protřepávání vzhledem k tomu, že je určován rozměrem mikrobublinek v počáteční disperzi. Je neočekávané, že uvedený rozměr je v podstatě stálý v lyofilizovaném i rekonstituovaném produktu. Vzhledem k tomu, že rozměr mikrobublinek v počáteční disperzi je možno snadno řídit parametry použitého postupu, jako je rychlost a délka míchání, je možno snadno řídit také konečný rozměr mikrobublinek.

Objem a koncentrace rekonstituované kapaliny mohou být vyváženy tak, aby výsledný přípravek, určený pro přímé použití byl v podstatě isotonický. Objem a koncentrace kapaliny bude tedy záviset také na typu a množství stabilizátoru a dalších látek pro zvýšení objemu, přítomných v lyofilizovaném produktu.

Bylo prokázáno, že lyofilizované produkty podle vynálezu jsou stále při skladování několik měsíců za běžných podmínek. Disperze mikrobublinek, vznikající po rekonstituci ve vodě nebo jiné kapalině, jak bylo uvedeno svrchu, může být ještě stálá po poměrně dlouhou dobu, například nejméně 12 hodin, takže není nutno spíchat s vyšetřením po rekonstituci suchého produktu před podáním injekce.

V případě, že v rekonstituované kapalině je použito pro úpravu osmotického tlaku téže látky, která byla užita jako stabilizátor při lyofilizaci, stačí, aby množství přítomného stabilizátoru bylo dostatečné pro optimální stabilizaci v průběhu lyofilizace. Isotonicity konečného produktu je možno dosáhnout výběrem příslušného množství a koncentrace kapaliny pro rekonstituci. Je tedy možno měnit v širokém rozmezí koncentraci i typ látek, užitých jako stabilizátory v průběhu lyofilizace i koncentraci a typ látek v kapalině pro rekonstituci, přičemž je stále ještě možno získat stálý rekonstituovaný produkt.

Lyofilizaci podle vynálezu je možno uskutečnit běžným způsobem, i když výhodné stabilizátory podle vynálezu mohou mít tu další výhodu, že prostředek má před lyofilizací obecně vyšší teplotu  $T_g$  než ekvivalentní prostředky s obsahem jiných ochranných látek, jako jsou glukosa a manitol, takže je možno užít kratších cyklů v průběhu lyofilizace.

Vynález byl popsán s ohledem na prostředky ve formě mikrobublinek pro zvýšení kontrastu při zobrazování pomocí ultrazvuku. Vynález je však možno aplikovat také na kontrastní prostředky ve formě mikrobublinek, určené pro zobrazování jinými postupy, například MRI, rtg-paprsky, SPECT, PET, magnetografické zobrazování a pod.

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

#### Příklady provedení vynálezu

##### Příklad 1

##### Příprava lyofilizovaného produktu

500,4 mg hydrogenovaného vaječného fosfatidylserinu se přidá ke 100 ml vody, obsahující 5,4 % hmotnostní směsí propylenglykolu a glycerolu v hmotnostním poměru 3 : 10. Směs se protřepe a pak se 5 minut zahřívá na 80 °C, načež se nechá zchladnout na teplotu místnosti, znovu se protřepe a pak se nechá stát přes noc až do použití.

50 ml výsledného roztoku se přenese do baňky s okrouhlým dnem a konickým hrdlem. Baňka se opatří skleněnou manžetou se vstupem a výstupem, napojenými na vodní lázeň, udržovanou na teplotě 25 °C. Do roztoku se ponoří míchadlo a aby nedocházelo k úniku plynu mezi stěnou hrdla a hřídelem míchadla, utěsní se příslušný prostor kovovou zátkou, opatřenou vstupem a výstupem pro plyn, aby bylo možno upravovat obsah plynu a řídit tlak. Výstup plynu se spojí s vakuovým čerpadlem a roztok se 1 minutu zbavuje plynů. Pak se přívodem pro plyn přivede plynný perfluor-n-butan.

Roztok se homogenizuje 10 minut při 23 000 ot/min, přičemž se hřídel míchadla uloží tak, aby otvory byly poněkud nad povrchem kapaliny. Vytvoří se krémovitá disperze, která se přenesse do těsně uzavíratelné nádoby a propláchne perfluor-n-butanem. Disperze se pak přenesse do dělicí nálevky a odstředí 30 minut při 12 000 ot/min, čímž se získá horní krémová vrstva bublinek a spodní zakalená vrstva kapaliny. Tato kapalina se odstraní a nahradí se vodou. Odstředění se dvakrát opakuje, avšak užije se 12 000 otáček po dobu 15 minut. Po posledním odstředění se supernatant nahradí roztokem sacharosu s koncentrací 10 % hmotnostních. Podíly výsledné disperze po 2 ml se rozdělí do lékovek s objemem 10 ml s plochým dnem, zvláště upravených pro lyofilizaci, lékovky se zchladí na  $-47^{\circ}\text{C}$  a obsah se lyofilizuje přibližně 48 hodin, čímž se získá bílá vločkovitá pevná látka. Lékovky se přenesou do podtlakové komory, vzduch se vyčerpá vakuovým čerpadlem a nahradí se plynným perfluor-n-butanem. Před dalším použitím se přidá voda a obsah lékovek se opatrně ručně protřepává několik sekund, čímž se získá disperze mikrobublinek, vhodná pro použití jako kontrastní prostředek pro zobrazování pomocí ultrazvuku.

#### Vlastnosti materiálu

Střední průměr mikrobublinek a jejich objemová koncentrace byly měřeny zařízením Coulter Counter Mark II s otvorem 50 mikrometrů a měřeným rozsahem 1 až 30 mikrometrů. Vzorky s objemem 20 mikrolitrů byly zředěny ve 200 ml fyziologického roztoku chloridu sodného, nasyceného vzduchem při teplotě místnosti, před měřením byly vzorky ponechány 3 minuty k dosažení rovnovážného stavu.

Charakteristika při průchodu ultrazvuku byla provedena na příslušném pokusném zařízení modifikovaným způsobem podle publikace Jong N. a Hoff, Ultrasonics, 31, 175 až 181, 1993. Tímto zařízením je možno měřit zeslabení energie ultrazvuku ve frekvenční oblasti 2 až 8 MHz ve zředěné suspenzi kontrastního prostředku. Před měřením se provádí ještě test na stálost při vyšším tlaku tak, že se vzorek podrobí na 90 sekund přetlaku 120 mm rtuti. V typickém provedení se 2 až 3 mikrolitry vzorku zředí 55 ml prostředku Isoton II a zředěná suspenze vzorku se míchá 3 minuty před provedením měření. Jako primární parametr pro odpověď bylo užito zeslabení energie při 3,5 MHz spolu s návratem k normálnímu stavu rovněž při 3,5 MHz po odstranění přetlaku.

Byla provedena charakterizace disperze mikrobublinek, získané podle příkladu 1 in vitro. V následující tabulce jsou uvedeny získané hodnoty pro koncentraci a střední objemový průměr částic, akustické vlastnosti byly měřeny svrchu uvedeným způsobem.

T a b u l k a 1

číselná konc. $10^6/\text{ml}$	objemová konc. %	objemový střední průměr $\mu\text{m}$	zeslabení při 3,5 MHz dB/cm	zůstatek po užití přetlaku %	frekvence při max. zeslabení MHz
10518	6,51	3,16	150,4	96	4,3

#### Příklad 2

Plyn v pěti vzorcích, připravených podle příkladu 1 byl nahrazen vzduchem, perfluorbutanem, fluoridem sírovým, pentafluoridem trifluormethylsíry nebo tetramethylsilanem následujícím způsobem:



Dva vzorky s obsahem lyofilizovaného produktu z příkladu 1 byly uloženy do desikátoru se vstupem a výstupem pro plyn. Desikátor byl napojen na zařízení Büchi 168, dovolující řízený podtlak a přívod zvoleného plynu. Plyn nad vzorky byl vyčerpán 5 minut až do dosažení tlaku přibližně 1 kPa, načež byl tlak opět zvýšen na atmosférický tlak přívodem zvoleného plynu, pak byly lékovky pečlivě uzavřeny. Postup byl opakován vždy se dvěma vzorky pro každý ze zvolených plynů.

Do každé lékovky byly přidány před použitím 2 ml destilované vody a obsah byl opatrně ručně protřepán. Výsledná disperze mikrobublinek byla charakterizována stejným způsobem jako v příkladu 1. Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce 2.

T a b u l k a 2

plyn	číselná konc. $10^6/\text{ml}$	číselný střední průměr $/\mu\text{m}$	objemová konc. %	objemový střední průměr $/\mu\text{m}$
perfluorbutan	9756	1,8	4,9	5,8
pentafluorid tri- fluormethyl síry	10243	1,9	5,9	3,5
fluorid sírový	9927	1,9	5,7	3,2
tetramethylsilan	9947	1,9	6,1	3,7
vzduch	9909	1,9	6,4	4,0

Jak je ze svrchu uvedených výsledků zřejmé, nedochází při výměně plynu k žádným podstatným změnám v rozměrech mikrobublinek, což prokazuje, že vytvořený rozměr mikrobublinek zůstává v podstatě zachován v průběhu lyofilizace i rekonstituce.

#### Výsledky in vivo

Vzorek, připravený s použitím každého z pěti uvedených plenů byl vyhodnocen in vivo na Dopplerovo zesílení při 10 MHz. Disperze byly podány ve formě injekce králíkům do ušní žíly a měření bylo prováděno Dopplerovou technikou, při níž se ultrazvuková sonda uloží přímo na krkavici. Zaznamenává se intenzita a trvání signálu a vypočítá se integrál Dopplerovy křivky. Získané výsledky, které jsou shrnuty v následující tabulce 3 prokazují, že mikrobublinky s obsahem perfluorbutanu zajistí nejnižší Dopplerovo zesílení. Mikrobublinky s obsahem fluoridu sírového, pentafluoridu trifluormethylsíry nebo tetramethylsilanu jsou poněkud méně účinné než mikrobublinky obsahující perfluorbutan, integrály pro tyto látky jsou 60 až 80 % hodnot pro perfluorbutan.

V tabulce 3 jsou uvedeny výsledky pro prostředky z příkladu 2 po jejich nitrožilním vstříknutí králíkům. Hodnoty jsou opraveny s ohledem na posun základní čáry. Dopplerova jednotka je definována jako vzestup Dopplerova signálu ve srovnání se signálem krve.

T a b u l k a 3

plyn	integrál Dopplerova zesílení v tepně (NDU.s)
perfluorbutan <sup>x</sup>	10361
pentafluorid trifluormethylsíry	8006
tetramethylsilan	6370
fluorid sírový	6297
vzduch	1024

<sup>x</sup> průměr ze dvou injekcí.

### Příklad 3

Lékovka, obsahující lyofilizovaný materiál v atmosféře perfluorbutanu se připraví způsobem podle příkladu 1. Těsně před použitím se do lékovky přidá voda, čímž vznikne suspenze mikrobublinek.

200 ml kapaliny Isoton II se nechá stát několik dnů na vzduchu při teplotě místnosti, aby byl roztok zcela nasycen vzduchem. Dalších 200 ml kapaliny se zbaví plynu ve vakuové baňce při 60 °C po dobu jedné hodiny a pak se zchladí na teplotu místnosti při zachování podtlaku. Vzduch se do nádoby vpustí až těsně před použitím.

Ke každé z obou kapalin se přidá 10 mikrolitrů suspenze mikrobublinek a výsledné směsi se inkubují 5 minut, načež se provádí stejné měření rozměrů jako svrchu při použití přístroje Coulter Multisizer Mark II.

V prostředí, zbaveném plynů, kde nebyla očekávána žádná difuze plenu do mikrobublinek, byl střední průměr mikrobublinek 1,77 mikrometrů, přičemž 0,25 % mikrobublinek mělo průměr větší než 5 mikrometrů. V kapalině, nasycené vzduchem byly odpovídající hodnoty 2,43 mikrometrů a 0,67 %. Opakované měření, provedené po dalších 5 minutách prokázalo, že rozměr mikrobublinek je stálý.

Tyto výsledky ukazují, že střední průměr mikrobublinek se zvětší pouze o 37 % v případě, že mikrobublinky jsou uloženy do kapaliny, nasycené vzduchem, která je tak analogická tepenné krvi, přičemž jen velmi malý počet mikrobublinek dosáhne rozměru, dostačujícího k blokování kapilárních cév. Toto zjištění kontrastuje se zdvojnásobením rozměru mikrobublinek s obsahem směsi vzduchu a perfluorhexanu v obdobném prostředí, vysoce zředěné disperzi mikrobublinek ve vodě s obsahem rozpuštěného vzduchu podle příkladu II mezinárodní patentové přihlášky WO-A-95/03835.

#### Příklad 4

Byl opakován způsob podle příkladu 1, přičemž supernatant byl před lyofilizací nahrazen následujícím materiálem:

- a) 65 mg/ml sacharosy a 65 mg/ml mannitolu,
- b) 100 mg/ml mannitolu a 50 mg/ml glukosy,
- c) 20 mg/ml sacharosy, 76 mg/ml mannitolu a 38 mg/ml glukosy a
- d) 90 mg/ml sacharosy.

V následující tabulce 4 jsou uvedeny hodnoty  $T_g$  a  $T_g$  pro suchý a rozpuštěný produkt.

T a b u l k a 4

Prostředek	Tg'	Tg
a)	-38 °C	19 °C
b)	-43 °C	14 °C
c)	-42 °C	12 °C
d)	-32 °C	66 °C

Prostředky a) až c) vyžadují delší lyofilizační cykly než prostředek d) a mimoto musí být skladovány při nižších teplotách, aby byla zachována jejich integrita.

#### Příklad 5

#### Retence plynu

Materiál byl připraven obdobným způsobem jako v příkladu 1, avšak bylo použito a) 10 % hmotnostních sacharosy, b) 5 % hmotnostních PEG 3000, c) 2 % hmotnostní mannitolu a 1 % hmotnostní glukosy a d) 5 % hmotnostních trehalosy k náhradě supernatantu před lyofilizací, pak byly materiály důkladně promyty dusíkem, vystaveny opakovaně podtlaku a drceny, aby byla zjištěna schopnost produktu udržet perfluorbutan. Po provedení zkoušek byl stanoven zbývající obsah perfluorbutanu. Získané výsledky jsou shrnuty v následující tabulce 5.

T a b u l k a 5

stabilizátor	mg PFB/g produktu
sacharosa	0,69±0,10
PEG 3000	± 0,05
mannitol + glukosa	0,29±0,10
trehalosa	1,24±0,38

V předchozích příkladech je možno použít vyšší množství stabilizátoru, například 20 % místo 10 % nebo jinou kapalinu pro rekonstituci než vodu, například fyziologický roztok chloridu sodného nebo roztok polyolu, jak bylo uvedeno svrchu. Také lyofilizované množství může být vyšší, například 4 ml místo 2 ml, lyofilizační nádoby mohou být větší, například 20 ml a lyofilizace může probíhat déle, například 60 hodin.

Zastupuje:

## P A T E N T O V É   N Á R O K Y

1. Kontrastní prostředek pro zobrazování ultrazvukem v lyofilizovaném stavu, obsahující mikrobublínky a stabilizátor lyofilizace, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje stabilizátor lyofilizace v hmotnostním poměru k mikrobublínkám nejméně 10 : 1, přičemž prostředek je tepelně stálý při teplotě vyšší než 20 °C.

2. Kontrastní prostředek podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jeho teplota skelného přechodu  $T_g$  je vyšší než 20 °C.

3. Kontrastní prostředek podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se stabilizátor volí ze skupiny sacharosa, maltosa.H<sub>2</sub>O, trehalosa, rafinosa a stachyosa.

4. Kontrastní prostředek podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jako stabilizátor obsahuje sacharosu.

5. Kontrastní 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 hmotnostní poměr stabilizátoru k mikrobublínkám je nejméně 20 : 1.

6. Kontrastní prostředek podle některého z nároků 1 až 5, v y z n a č u j í c í s e t í m , že mikrobublínky obsahují plynný halogenovaný uhlovodík nebo jeho prekursor.

7. Kontrastní prostředek podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m , že mikrobublínky obsahují perfluoralkan.

8. Kontrastní prostředek podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m , že mikroublínky obsahují jako perfluoralkan perfluorbutan a perfluorpentan.

9. Kontrastní prostředek podle některého z nároků 1 až 8, v y z n a č u j í c í s e t í m , že membrána mikroublínek je tvořena fosfolipidem.

10. Způsob výroby tepelně stálého lyofilizovaného prostředku pro zobrazování ultrazvukem s obsahem mikroublínek, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se lyofilizuje vodná disperze, obsahující kontrastní činidlo ve formě mikroublínek pro zobrazování ultrazvukem a stabilizátor lyofilizace nebo směs stabilizátorů, přičemž stabilizátor nebo směs stabilizátorů má hodnotu  $T_g$  nejméně  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a hodnotu  $T_g'$   $-37\text{ }^{\circ}\text{C}$  nebo vyšší a hmotnostní poměr stabilizátoru nebo směsi stabilizátorů v disperzi ke kontrastnímu činidlu ve formě mikroublínek je nejméně 10:1.

11. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m , že vodná disperze obsahuje 1 až 50 % hmotnostních stabilizátoru.

12. Způsob podle nároku 10 a 11, v y z n a č u j í c í s e t í m , že kontrastní činidlo ve formě mikroublínek obsahuje plynný halogenovaný uhlovodík nebo jeho prekursor.

13. Způsob podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m , že mikroublínky obsahují halogenovaný uhlovodík ze skupiny perfluorbutan a perfluopentan.

14. Způsob podle některého z nároků 10 až 13, v y z n a č u j í c í s e t í m , že vodná disperze dále obsahuje činidlo pro zvětšení objemu.



15. Způsob podle nároku 14, v y z n a č u j í c í s e t í m , že vodná disperze jako činidlo pro zvětšení objemu obsahuje polyol se 3 atomy uhlíku.

16. Způsob podle nároku 14 nebo 15, v y z n a č u - j í c í s e t í m , že vodná disperze obsahuje 3 až 10 % hmotnostních činidla pro zvětšení objemu.

17. Kontrastní prostředek pro zobrazování pomocí ultrazvuku, obsahující vodné nosné prostředí, stabilizátor lyofilizace nebo směs stabilizátoru a kontrastní činidlo pro zobrazování pomocí ultrazvuku ve formě mikrobublinek, v y z n a č u j í c í s e t í m , že stabilizátor nebo směs stabilizátorů má hodnotu  $T_g$  nejméně  $20^{\circ}\text{C}$  a hodnotu  $T_g$   $-37^{\circ}\text{C}$  nebo vyšší, přičemž stabilizátor nebo směs stabilizátorů v prostředí je v hmotnostním poměru ke kontrastnímu činidlu pro zobrazování pomocí ultrazvuku ve formě mikrobublinek nejméně 10 : 1.

18. Použití stabilizátoru lyofilizace nebo směsi stabilizátorů s hodnotou  $T_g$  nejméně  $20^{\circ}\text{C}$  a hodnotou  $T_g$   $-37^{\circ}\text{C}$  nebo vyšší pro výrobu kontrastního prostředku s obsahem mikrobublinek pro zobrazování pomocí ultrazvuku, přičemž tento prostředek obsahuje stabilizátor nebo směs stabilizátorů v hmotnostním poměru k mikrobublínkám nejméně 10 : 1 a je určen pro diagnostické účely včetně diagnostického zobrazování pomocí ultrazvuku.

19. Způsob skladování a přepravy kontrastního prostředku ve formě mikrobublinek pro zobrazování pomocí ultrazvuku, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se kontrastní činidlo užije v lyofilizované formě s obsahem stabilizátoru lyofilizace v hmotnostním poměru vzhledem k mikrobublínkám nejméně 10 : 1, přičemž teplota skelného přechodu  $T_g$  je

nejméně 20 °C, skladování a přeprava kontrastního prostředku probíhá bez použití chlazení.

20. Způsob výroby kontrastního prostředku pro zobrazování pomocí ultrazvuku s obsahem mikrobublinek, v y - z n a ě u j í c í s e t í m , že se lyofilizovaný kontrastní prostředek podle některého z nároků 1 až 19 disperguje ve fyziologicky přijatelném vodném prostředí pro přípravu disperze.

Zastupuje: