

Изобретение относится к специальным контрастным средам для ультразвуковой диагностики, включающие газонаполненные микрочастицы, оболочка которых состоит из полицианакрилатов или сложных полиэфиров α -, β - или γ -гидроксикарбоновых кислот, а также к способам их получения.

Известно, что с помощью периферического введения растворов, которые содержат мелкие пузырьки газа, можно получить контрасты сердечного эха (Roelandt J. *Ultrasound Med. Biol.*, 8 : 471 - 492, 1982). Эти пузырьки газа получают в физиологически совместимых растворах, например, путем встряхивания, взбалтывания или путем добавления двуокиси углерода. Но они не стандартизированы по их числу и размерам и могут быть воспроизведены только неадекватно. Также они обычно неустойчивы, так что их жизнь коротка. Их средние диаметры большей частью больше, чем размер эритроцитов, так что легочное капиллярное прохождение с последующим контрастированием таких органов, как отделы сердца, печень, почки или селезенка, невозможно. Более того, они непригодны для количественных оценок, поскольку ультразвуковое эхо, продуцируемое ими, состоит из нескольких процессов, которые нельзя отделить друг от друга, таких как рост, соединение и растворение пузырьков. Таким образом, невозможно, например, получить информацию о временах прохождения с помощью этих ультразвуковых контрастных сред путем измерения хода контраста в миокарде. Для этой цели необходимы контрастные среды, чьи рассеивающие элементы имеют адекватную стабильность.

Стабилизация пузырьков газа с помощью сахара описывается в EP 0131540. При этом, хотя воспроизводимость и однородность контрастного эффекта улучшается, эти пузырьки не выдерживают прохождения через легкое.

В EP 0122624 и 0123235 указано, что эффект стабилизации пузырьков газа сахарами, сахарными спиртами и солями улучшается посредством добавления поверхностно-активных веществ. С помощью этих ультразвуковых контрастных сред обеспечиваются легочный капиллярный путь прохождения и возможность для визуализации артериального бедренного кровеносного сосуда и других органов, таких как печень или селезенка. Но в этом случае контрастный эффект ограничивается сосудистыми полостями, поскольку пузырьки не поглощаются клетками тканей.

Ни одна из описанных ультразвуковых контрастных сред не остается неизменной в теле в течение продолжительного периода времени. С помощью этих сред невозможно распознавание органов с достаточной интенсивностью сигнала путем селективной концентрации после внутривенного введения, или количественные оценки.

Инкапсуляция газов, как например, воздуха, в качестве ультразвуковой контрастной среды описывается в EP 0224934. Материал стенок, используемый в этом случае, состоит из протеина, в частности, альбумина сыворотки человека с известными аллергенными свойствами, к которым путем денатурации можно добавить цитотоксические эффекты.

Газонаполненные микрочастицы для ультразвуковой диагностики, основанные на биологически разрушающихся синтетических материалах, описываются в опубликованном патенте EP 0327490. Эти среды имеют достаточное *in vivo* время жизни, и после внутривенного введения концентрируются внутриклеточно в ретикулоэндотелиальной системе и, таким образом, также в печени и селезенке. В данном патентном описании также указываются полицианакрилаты или α -, β - или γ -гидроксикарбоновые кислоты, но частицы согласно изобретению отличаются от описанных в EP 0327490 в том, что удельная плотность частиц равна $<0,7 \text{ г/см}^3$.

Более низкая плотность частиц в соответствии с изобретением, следовательно, является результатом того, что при том же самом размере они содержат больше газа. Поскольку интенсивность ультразвукового эха, продуцируемого рассеянием и отражением пузырьков газа, зависит от радиуса газового ядра в шестой степени, то, следовательно, частицы согласно изобретению представляют собой значительно более эффективную ультразвуковую контрастную среду, чем среды, описанные в EP 0327490.

Это увеличение объема газа достигается согласно изобретению путем уменьшения толщины стенок. Неожиданно оказалось, что частицы согласно изобретению, несмотря на меньшую толщину стенок, все еще являются достаточно устойчивыми, чтобы выдержать прохождение через легкое.

Новые "тонкостенные" частицы можно получать, используя способы в соответствии с изобретением.

Размер частиц, требуемый с точки зрения капиллярного пути прохождения, составляет $<10 \text{ мкм}$. Предпочтительными являются частицы со средним диаметром $0,2 - 2 \text{ мкм}$. Это требование также выполняется при использовании способа в соответствии с изобретением.

Удельная плотность частиц, полученных в соответствии со способом изобретения, составляет $0,05 - 0,7 \text{ г/см}^3$, из чего вычисляется средняя толщина стенки частиц, составляющая $10 - 50 \text{ нм}$.

Сравнение свойств полицианакрилатных частиц по изобретению, полученных в соответствии с примером 9 данной заявки, со свойствами частиц, полученных в соответствии с примером 2 EP 0327490, представлено ниже в таблице.

На основе удельного веса частиц, составляющего $0,15 \text{ г/см}^3$, полученных в соответствии с примером 9 изобретения, вычислено, что средняя толщина стенки примерно в 10 раз меньше, а объем газа приблизительно на 60% больше.

Эти значения хорошо согласуются с результатами снимков, полученных с помощью сканирующего электронного микроскопа (см. фиг.1 и 2).

Неожиданно оказалось, что для частиц в соответствии с изобретением при ультразвуковых исследованиях помимо усиления сигнала, вызываемого рассеянием, наблюдается также повышение контраста частицами вследствие того, что они возбуждаются до независимых сигналов при облучении ультразвуком подходящего звукового давления и подходящей частоты.

Из-за этого неожиданно наблюдаемого явления, во-первых, возникает новая область использования сред согласно изобретению для диагностики опухолей в печени и селезенке. Таким образом, здоровая ткань оказывается окрашенной по методу Допплера кодирования цветом после периферического венозного введения микрочастиц согласно изобретению, в то время как области опухолей оказываются в меньшей степени или вообще не кодированы цветом.

Кроме того, благодаря описанным преимуществам частиц - большому объему газа плюс независимые

ультразвуковые сигналы - можно достичь хороших контрастов уже при значительно меньшем числе частиц. В результате этой повышенной эффективности необходимы лишь малые количества (в диапазоне мкг) полимерного вещества для хорошего ультразвукового контраста, посредством чего повышается степень фармакологической безопасности.

Таким образом, в типичном эксперименте на животных, на бигле (коротконогой гончей), уже 25мкг частиц на кг массы тела (кг Т) давало оптимальный, однородный контраст левых полостей сердца (рисунок 3/ справа). При использовании частиц по ЕР 0327490 нельзя было добиться сравнимого контраста, до тех пор, пока не использовали дозу 2мг/кг массы тела (рисунок 3/ слева).

Контрастные эффекты частиц, описанных здесь (пример 9), и частиц, описанных в ЕР 327490 (пример 2), после инстилляции в мочевой пузырь представлены на рисунках 4 и 5. Частицы ЕР 0327490 добавляли при дозе примерно 3мг/мл, а частицы в соответствии с изобретением - при дозе 0,04мг/мл. Видно, что, несмотря на очевидно меньшую концентрацию, достигнут значительно лучший контрастный эффект.

Другой аспект изобретения относится к способам получения микрочастиц согласно изобретению.

Для получения микрочастиц на основе полицианакрилата процедуру проводят таким образом, что мономерный цианакрилат в кислом водном растворе, насыщенном газом, который необязательно содержит, по крайней мере, одно поверхностно-активное вещество, диспергируют роторно-статорным смесителем, полученные частицы после диспергирования в течение от 5 минут до 3 часов отделяют, необязательно промывают водой, затем абсорбируют в фармацевтически приемлемой суспензионной среде и высушивают вымораживанием, а суспензию преимущественно взбалтывают в течение замораживания. Предпочтительно в качестве цианакрилата используют бутиловый сложный эфир, в качестве газа используют воздух, азот, кислород, благородные газы или двуокись углерода. Вместо роторно-статорного смесителя можно также использовать сравнимые устройства (такие как, например, сосуд с мешалкой), которые обеспечивают интенсивное диспергирование смеси. В качестве поверхностно-активного вещества используют вещество (вещества) из группы полисорбатов, октил- или нонил-фенолов, сложных эфиров макроголь-глицерина или цетомакроголей или Полоксамеров® или их смесей. рН водного насыщенного газом раствора предпочтительно составляет 1,8 - 4,5, для подгонки рН особенно пригодны соляная кислота и фосфорная кислота. Отделение частиц происходит путем центрифугирования или флотации. Пригодной суспензионной средой является вода для целей инъекции, необязательно с добавлением поваренной соли и/или глюкозы, и/или маннита, и/или лактозы, которая необязательно дополнительно также содержит поверхностно-активное вещество, такое, как, например, из группы полисорбатов, октил или нонил-фенолов, сложных эфиров макроголь-глицерина или цетомакроголей или веществ из группы Полоксамеров® или их смесей и/или многоатомных спиртов.

Для получения микрочастиц на основе сложных полиэфиров процедуру проводят таким образом, что сложный полиэфир α -, β - или γ -гидроксикарбоновой кислоты, необязательно вместе с вододиспергируемым эмульгатором, растворяют в безвредном для здоровья растворителе, и этот раствор добавляют при диспергировании мешалкой-растворителем или ультразвуковой мешалкой в газообразную жидкость, которая если эмульгатор уже не был добавлен вместе со сложным полиэфиром, содержит вододиспергируемый эмульгатор, полученные частицы после диспергирования в течение 30 минут - 2 часов отделяют, необязательно промывают водой, затем их помещают в фармацевтически приемлемую суспензионную среду и высушивают вымораживанием.

Согласно изобретению предпочтительным являются полимеры молочной кислоты или гликолевой кислоты, а также их сополимеры. В качестве безвредного растворителя предпочтительно используют нагретый этиловый спирт. В качестве газообразной жидкости предпочтительно используют воду или глицерин 87%, предпочтительными газами являются воздух, азот, кислород, благородные газы или двуокись углерода. В качестве вододиспергируемого эмульгатора можно упомянуть фосфатидилхолин или сахарозо-пальмитатстеарат 15, а также их смеси. В качестве фармацевтически приемлемой суспензионной среды пригодными являются те же самые среды, что и в случае частиц на основе полицианакрилата.

Сушка вымораживанием микрочастиц согласно изобретению преимущественно происходит посредством добавления веществ, которые защищают частицы в сушке вымораживанием от разрушения и/или агломерации (так называемые криопротекторы). В качестве криопротекторов можно благоприятно добавить при концентрации 1 - 15% суспензии биополимеры (например, альбумин, стерилизованный желатин, оксиполижелатин, желатинполисукцинат, сшитые полипептиды), синтетические макромолекулярные вещества (например, повидон, поливиниловый спирт), сахара (например, сахарозу, лактозу, трегалозу, рафинозу), сахарные спирты (например, маннит, сорбит) или смеси этих фармацевтических вспомогательных средств. Добавление криопротекторов в соответствии с изобретением происходит либо в среде получения, путем абсорбции микрочастиц после отделения флотацией в растворе криопротектора, либо путем добавления к суспензии непосредственно перед сушкой вымораживанием.

Неожиданно было обнаружено, что дополнительно к криопротектору благоприятно добавление вещества, оптимизирующего сушку вымораживанием, из группы полиолов (т.е. глицерина, пропиленгликоля) или DMSO (диметилсульфоксида) при концентрации 0,1 - 3%.

Сушка вымораживанием преимущественно происходит таким образом, чтобы предотвратить флотацию микрочастиц согласно изобретению в течение вымораживания. Для этой цели благоприятно предварительно охлаждать суспензию микрочастиц согласно изобретению, замораживать ее при скорости замораживания 2 градуса Кельвина в минуту или более и сушить ее вымораживанием.

Другим важным преимуществом способа получения в соответствии с изобретением по сравнению со способами, описанными в ЕР 0327490, является то, что газонаполненные частицы можно получать одностадийным способом без применения вредного для здоровья и экологически опасного органического растворителя или вспомогательного средства.

Получение инъекционного препарата частиц согласно изобретению, готового для применения, происходит путем ресуспендирования лиофилизата в фармацевтически приемлемой суспензионной среде, такой, как например, воде, водных растворах одной или более неорганических солей, таких как физиологические растворы

электролитов и буферные растворы, такие, как например, водные растворы Тирода моно- или дисахаридов, таких как глюкоза или лактоза, сахарных спиртов, таких как маннит, которые необязательно дополнительно содержат поверхностно-активное вещество, например, из группы полисорбатов, октиловых или нониловых фенолов, сложных эфиров макроглицерина или цетомакроглицерина или веществ из группы Полоксамеров или их смесей, и/или физиологически совместимый многоатомный спирт, такой как глицерин, но предпочтительно в воде, пригодной для инъекций. Общая концентрация необязательно растворенных веществ составляет 0 - 15мас. %.

Альтернативный способ для получения инъеклируемых препаратов, готовых для применения, состоит в том, что в способе согласно изобретению - для получения микрочастиц - обходятся без конечной сушки вымораживанием. Для повышения безопасности введения можно непосредственно перед инъекцией выполнить фильтрацию суспензии. Это осуществляется преимущественно с помощью фильтра, прикрепленного между шприцем и канюлей, который служит для удержания агрегатов, необязательно встречающихся в случае ошибок при работе, но позволяет проходить неагрегированным частицам. В качестве материала фильтра пригодными являются в основном имеющиеся в продаже мембранные фильтры. Но неожиданно, при выборе фильтров оказалось, что наилучшие результаты достигаются с помощью специальных многослойных мембран из полипропиленовых микронитей. Особенно удобными оказались фильтры с абсолютной скоростью удержания 10 - 20мкм. Эти фильтры также способны задерживать меньшие агрегаты частиц, но которые нежелательны при внутривенном использовании, например 5 - 10мкм.

Концентрацию контрастной среды, готовой для применения, можно установить в диапазоне 0,1 - 20мг, предпочтительно 2 - 6мг частиц/мл суспензионной среды. Инъеклируемая доза зависит от желательного применения и составляет, например, в цветовой ультразвуковой эхографии Допплера при исследовании сосудов, в диапазоне 1 - 500, предпочтительно 10 - 100мкг частиц/кг массы тела, при исследовании печени и селезенки в диапазоне 50 - 1000, предпочтительно 200 - 600мкг/кг массы тела.

Пример 1. 0,4мл бутилового сложного эфира цианакриловой кислоты диспергировали в 60мл раствора HCl при pH = 2,0, который содержал 1% Полоксамера 407, с помощью роторно-статорного смесителя в течение 5 минут. Микрочастицы со средним размером 2мкм центрифугировали и помещали в 300мл водного раствора 1% Полоксамера и 5% глюкозы. При определении плотности получили удельный вес 0,2г/см³.

Пример 2. Повторяли ту же процедуру, что и в примере 1, но раствор соляной кислоты имел pH = 2,5, а Полоксамер 407 заменяли октоксинолом-9. Микрочастицы имели средний размер примерно 0,9мкм и удельный вес 0,2г/см³. Их помещали в 300мл 5% раствора маннита, который содержал 0,1% полисорбата 20.

Пример 3. Повторяли ту же процедуру, что и в примере 1, но раствор соляной кислоты имел pH = 3,0, а Полоксамер 407 заменяли цетомакроглицерин-1200. Средний размер частиц составлял 1,5мкм, а удельный вес 0,3г/см³. Их помещали в 300мл 5% раствора маннита, который содержал 0,1% цетомакроглицерина 1200 и 5% повидона.

Пример 4. Повторяли ту же процедуру, что и в примере 1, а Полоксамер 407 заменяли 5% полисорбатов 40. Средний размер микрочастиц составлял 1,0мкм, а удельный вес 0,4г/см³. Их помещали в 300мл 5% раствора маннита, который содержал 1% макроглицерин-гидроксистеарата.

Пример 5. Повторяли ту же процедуру, что и в примере 1, а Полоксамер 407 заменяли 5% макроглицерин-гидроксистеаратом. Средний размер частиц составлял 0,9мкм, и они имели удельный вес 0,3г/см³. Их помещали в 300мл 5% раствора маннита, который содержал 1% макроглицерин-гидроксистеарата и 10% пропиленгликоля.

Пример 6. Повторяли ту же процедуру, что и в примере 1, но бутиловый сложный эфир цианакриловой кислоты заменяли этиловым сложным эфиром цианакриловой кислоты. Микрочастицы имели средний размер 1,5мкм и удельный вес 0,2г/см³. Их помещали в 300мл водного раствора 1% Полоксамера 407 и 5% глюкозы.

Пример 7. Повторяли ту же процедуру, что и в примере 1, но бутиловый сложный эфир цианакриловой кислоты заменяли изопропиловым сложным эфиром цианакриловой кислоты. Микрочастицы имели средний размер 1,3мкм, и удельный вес 0,2г/см³. Их помещали в 300мл водного раствора 1% Полоксамера 407 и 5% маннита и 10% пропиленгликоля.

Пример 8. 3мл бутилового сложного эфира цианакриловой кислоты диспергировали в 300мл раствора HCl с pH = 2,0, который содержал 1% Полоксамера 407, с помощью смесителя в течение 120 минут. Микрочастицы со средним размером 2мкм и удельным весом 0,1г/см³ отделяли флотацией и помещали в 5л 5% раствора маннита, который содержал 1% Полоксамера 407 и 10% пропиленгликоля.

Пример 9. Повторяли ту же процедуру, что и в примере 8, но Полоксамер 407 заменяли октоксинолом-9, а pH устанавливали 2,5. Средний размер микрочастиц составлял 0,8мкм, их удельный вес был 0,15г/см³. Их помещали в 5л 0,9% раствора поваренной соли, который содержал 0,1% цетомакроглицерина 1200.

Пример 10. Повторяли ту же процедуру, что и в примере 8, но Полоксамер 407 заменяли цетомакроглицерин-1200. Средний размер микрочастиц составлял 1,8мкм, а их удельный вес равнялся 0,4г/см³. Их помещали в 5л 5% раствора глюкозы, который содержал 0,2% цетомакроглицерина 1200.

Пример 11. Повторяли ту же процедуру, что и в примере 8, но Полоксамер 407 заменяли 5% полисорбатов 60. Средний размер микрочастиц составлял 1,0мкм, а их удельный вес равнялся 0,4г/см³. Их помещали в 5л 5% раствора маннита, который содержал 1% Полоксамера 407 и 10% пропиленгликоля.

Пример 12. Частицы, полученные в примере 8, 9, 10 или 11, вместо помещения их в растворы, указанные там, помещали в 5л 5% раствора маннита в каждом случае, и этот раствор содержал 0,1% цетомакроглицерина 1200 и 5% повидона, замораживали 15мл порциями при интенсивном встряхивании и высушивали вымораживанием. Перед применением лиофилизат ресуспендировали водой для инъекций и необязательно профильтровывали.

Пример 12а. Частицы, полученные в примере 8, 9, 10 или 11, вместо помещения их в растворы, указанные там, помещали в 5л 10% раствора лактозы, который содержал 0,1% цетомакроглицерина 1200, замораживали 15мл порциями при интенсивном встряхивании и высушивали вымораживанием. Перед применением лиофилизат ресуспендировали водой для инъекций и необязательно профильтровывали.

Пример 13. 1,0г гидрогенизированного лецитина из соевых бобов диспергировали в 200мл глицерина с

помощью смесителя. По истечении 60 минут в дисперсию вводили 2,0г поли-L-лактида (средняя молекулярная масса 1100), растворенного в 10мл кипящего этанола. Диспергирование продолжали свыше 60 минут. Полученные микрочастицы центрифугировали при 1000об/мин, отстоявшуюся жидкость помещали в 50мл воды, снова центрифугировали (1000об/мин), отстоявшуюся жидкость помещали в 5% раствор маннита. Эту суспензию разделяли на 10мл порции и высушивали вымораживанием. Перед применением лиофилизат ресуспендировали водой для инъекций.

Пример 14. 1,0г сахарозо-пальмитат-стеарата (ГПБ 15) диспергировали в 200мл глицерина с помощью смесителя. По истечении 30 минут в дисперсию вводили 1,0г поли-L-лактида (средняя молекулярная масса 1100), растворенного в 10мл кипящего этанола. Диспергирование продолжали свыше 60 минут. Полученные микрочастицы имели средний размер 2мкм. Их центрифугировали при 1000об/мин в течение 30 минут, отстоявшуюся жидкость помещали в 50мл воды, снова центрифугировали (1000об/мин), отстоявшуюся жидкость помещали в 50мл 5% раствора маннита. Эту суспензию разделяли на 10мл порции и высушивали вымораживанием. Перед применением лиофилизат ресуспендировали водой для инъекций.

Пример 15. Микрочастицы, полученные в соответствии с примером 8 (250мкг/мл) при дозе 25мкг/кг массы тела инъецировали собаке (12,5кг, ингаляционный наркоз) внутривенно при скорости 2мл/мин. В ультразвуковом исследовании в β -изображении в левой половине сердца заметно интенсивное продолжительное усиление сигнала.

Пример 16. Пример 15 повторяли с частицами, полученными в примерах 1 - 7 или 9 - 14. В этом случае также в левой половине сердца появлялись интенсивные продолжительные усиления сигнала.

Пример 17. Микрочастицы, полученные в соответствии с примером 8 (250мкг/мл) при дозе 300мкг/кг массы тела инъецировали собаке (11кг, ингаляционный наркоз) внутривенно при скорости 0,1мл/с. По истечении 10мин печень оказывалась однородно кодированной цветом в цветовом исследовании Доплера в течение периода, достаточно длительного для исследования.

Пример 18. Повторяли пример 17 с частицами, полученными в примерах 1 - 7 или 9 - 14. И в этом случае печень также оказывалась однородно кодированной цветом.

Пример 19. Микрочастицы, полученные в примере 8, смешивали 1 - 1 с сывороткой собаки и инкубировали при 37°C. Через 4 часа изначально мутная суспензия становилась полностью прозрачной, и почти 100% содержание бутанола, предполагавшееся теоретически, было обнаружено с помощью гелехроматографии.

Пример 20. 3мл бутилового сложного эфира цианакриловой кислоты диспергировали в 300мл раствора HCl при pH = 2,5, который содержал 1% ноноксинола, с помощью смесителя в течение 90 минут. Микрочастицы со средним размером 1,4мкм отделяли флотацией, помещали в 100мл воды и затем смешивали с 5% альбумином. Затем смесь замораживали 5мл порциями при легком перемешивании и высушивали вымораживанием.

Пример 21. 3мл бутилового сложного эфира цианакриловой кислоты диспергировали в 300мл раствора HCl с pH = 2,5, который содержал 1% октоксинола, с помощью смесителя в течение 90 минут. Микрочастицы со средним размером 1,4мкм отделяли флотацией, помещали в 100мл выдержанного в автоклаве раствора желатина, доведенного с помощью HCl/NaOH до pH 5,0, и затем замораживали 5мл порциями при легком перемешивании, и также высушивали вымораживанием.

Пример 22. 3мл бутилового сложного эфира цианакриловой кислоты диспергировали в 300мл раствора HCl с pH = 2,5, который содержал 1% октоксинрла и 5% повидона, с помощью смесителя в течение 90 минут. Микрочастицы со средним размером 1,4мкм отделяли флотацией, помещали в 5% раствор повидона и разливали 5мл порциями. Затем разлитую суспензию термостатировали в течение одного часа до 0°C и замораживали, а также высушивали вымораживанием.

Пример 23. 3мл бутилового сложного эфира цианакриловой кислоты диспергировали в 300мл раствора HCl с pH = 2,5, который содержал 1% октоксинола, с помощью смесителя в течение 90 минут. Микрочастицы со средним размером 1,4мкм отделяли флотацией, помещали в 300мл воды, смешивали с 0,1% глицерина и 10% лактозы и, после замораживания, сушили вымораживанием.

Таблица

	Частицы в соответствии с ЕР 0 327 490; получены согласно примеру 2	Частицы в соответствии с изобретением, полученные согласно примеру 9
Приблизит. размер	1 мкм	0,8 мкм
Удельный вес	0,81 г/см ³	0,15 г/см ³
Средний диаметр воздушного ядра*	0,64 мкм	0,76 мкм
Средняя толщина стенки	180 нм	20 нм

* Вычислено с $\delta_{\text{полимер}} = 1,1 \text{ г/см}^3$ и $\delta_{\text{воздух}} = 0 \text{ г/см}^3$.