



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 372**

51 Int. Cl.:
A61K 49/00 (2006.01)
A61K 49/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02076722 .4**
96 Fecha de presentación : **08.10.1993**
97 Número de publicación de la solicitud: **1226832**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.07.2002**

54 Título: **Preparación de agentes diagnósticos conteniendo cápsulas de ácido hialurónico.**

30 Prioridad: **10.10.1992 GB 9221329**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.04.2011

73 Titular/es: **QUADRANT DRUG DELIVERY LIMITED**
1 Mere Way, Ruddington
Nottingham, NG11 6JS, GB

72 Inventor/es: **Johnson, Richard Alan y**
Sutton, Andrew Derek

74 Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**

ES 2 356 372 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCION

La presente invención se refiere a la preparación de agentes de diagnóstico que comprenden microcápsulas huecas para mejorar la imaginología por ultrasonido.

5 El hecho que puedan usarse burbujas de aire en el cuerpo para ecocardiografía ha sido conocido hace algún tiempo. Los líquidos conteniendo burbujas pueden inyectarse en el torrente sanguíneo para este propósito (véase Ophir *et al* (1980) "*Ultrasonic Imaging*" 2, 67-77, quien estabilizó las burbujas en una membrana de colágeno, las patentes de los EE.UU. N° 4 446 442 (Schering) y EP-A-131 540 (Schering)), y las patentes de los EE.UU. N° 4 718 433, N° 4 774 958 y N° 4 844 882 revelan el uso de burbujas preparadas para aplicación del ultrasonido a una solución de albúmina. Sin embargo, la distribución del tamaño de burbujas, aparentemente, es ingobernable y las burbujas desaparecen cuando se someten a la presión que se experimenta en el ventrículo izquierdo (Shapiro *et al* (1990) *J. Am. Coll. Cardiology*, 16(7), 1603-1607).

10 La patente europea EP-A-52575 revela, para el mismo propósito, partículas sólidas que tienen gas entrado en éstas, siendo el gas liberado de las partículas en el torrente sanguíneo.

15 La patente europea EP 458 745 (*Sintetica*) revela un proceso para preparar microbalones, llenos de aire o de gas, por polimerización interfacial de polímeros sintéticos como poliláctidos y poliglicólidos. El documento WO 91/12823 (*Delta Biotechnology*) revela un proceso similar que usa albúmina. Wheatley *et al* (1990) *Biomaterials* 11, 713-717 revela la gelación ionotrópica de alginato para formar microburbujas de unos 30 µm de diámetro. El documento WO 91/09629 revela los liposomas para su uso como agentes de contraste en ultrasonido. Nuestra solicitud pendiente de patente PCT/GB92/00643 (publicada desde la fecha de prioridad de esta solicitud en el documento WO 92/18164) revela un método de secado por spray que brinda microesferas particularmente ventajosas, que presentan la resistencia mecánica requerida y una distribución de tamaños estrechamente controlada. Se revelan otros procesos de secado por spray, para propósitos diferentes, en Przyborowski *et al* (1982 *Eur. J. Nucl. Med.* 7, 71-72), a saber, la preparación de microesferas de albúmina de suero humana (HSA, por las siglas de su expresión inglesa, Human Serum Albumin) para el marcado por radiactividad y su uso posterior en imaginología por centelleo del pulmón.

25 El artículo de Przyborowski *et. al.* se refiere a dos descubrimientos más tempranos de métodos para obtener partículas de albúmina para centigrafía pulmonar. Aldrich & Johnston (1974) *Int. J. Appl. Rad. Isot.* 25, 15-18 descubrieron el uso de un disco giratorio para generar partículas de 3-70 µm de diámetro, las que se desnaturalizan luego en aceite caliente. El aceite se retiró y se marcaron las partículas con radioisótopos. En Raju *et al* (1978) *Isotopenpraxis* 14(2), 57-61 se usó la misma técnica de disco giratorio, pero se desnaturalizó la albúmina simplemente calentando las partículas. En ningún caso se mencionó que las microesferas fueran huecas, y las partículas preparadas no fueron convenientes para ecocardiografía.

30 Nosotros ahora hemos desarrollado nuestro anterior proceso de secado por spray (documento WO 92/18164) y se adaptó para producir productos aún más ventajosos.

35 Un aspecto de la presente invención proporciona un proceso que comprende atomizar una solución o dispersión en un portador líquido de un material para formación de pared en un gas a fin de obtener microcápsulas en evaporación del portador líquido.

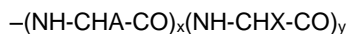
Preferentemente, el producto obtenido en dicho proceso se somete a un segundo paso de reducir la solubilidad en agua por lo menos la del exterior de dichas microesferas.

40 Dichos dos pasos pueden llevarse a cabo como un solo proceso, o el producto intermedio del primer paso puede recogerse y puede separadamente tratarse en el segundo paso. Estas dos posibilidades se refieren más adelante como los procesos de uno y de dos pasos.

45 Deben escogerse el material para la formación de una pared y las condiciones del proceso para que el producto sea lo suficientemente no tóxico y no inmunogénico en las condiciones de uso, lo que dependerá claramente de la dosis administrada y la duración del tratamiento. El material para la formación de una pared puede ser un derivado del almidón, un polímero sintético como poliglutamato de tert-butil-oxicarbonil-metilo (patente de los EE.UU. N° 4 888 398), o un polisacárido como polidextrosa o almidón.

50 Generalmente, el material para formación de la pared (en adición al ácido hialurónico) puede seleccionarse entre polímeros fisiológicamente compatibles, mayoritariamente hidrófilos, biodegradables. Entre tales polímeros se pueden citar polisacáridos de baja solubilidad en agua, poliláctidos y poliglicólidos y sus copolímeros, copolímeros de láctidos y lactonas como ε-caprolactona, δ-valerolactona, polipéptidos, y proteínas como gelatina, colágeno, globulinas y albúminas. Otros polímeros convenientes incluyen poli-(orto)ésteres (véanse, por ejemplo, las patentes de los EE.UU. N° A-4.093.709; EE.UU. A-4.131.648; EE.UU. A-4.138.344; EE.UU. A-4.180.646; el ácido poliláctico y poliglicólico y sus copolímeros, por ejemplo DEXON (véase J. Heller (1980) *Biomaterials* 1, 51; poli(DL-lactido-co-δ-caprolactona), poli(DL-lactido-co-δ-valerolactona), poli(DL-lactido-co-g-butirolactona), poli(alquil-ciano-acrilatos); poliamidas, poli-hidroxi-butilato; poli-di-oxanona; poli-β-aminocetonas (*Polymer* 23 (1982), 1693); polifosfacenos (*Science* 193 (1976), 1214); y polianhidridos. Pueden encontrarse referencias sobre polímeros biodegradables en Langer *et al* (1983) *Macromol. Chem. Phys.* C23, 61-125. También pueden usarse Poli(aminoácidos) como ácidos poliglutámico y poliaspártico, así como sus derivados, es decir, los ésteres parciales con alcoholes o glicoles inferiores. Un ejemplo útil de tales polímeros es el poli-

(t,butil-glutamato). También son posibles copolímeros con otros aminoácidos como metionina, leucina, valina, prolina, glicina, alamina, etc. Recientemente se han informado algunos nuevos derivados de ácidos poliglutámico y poliaspártico con una biodegradabilidad controlada (véanse los documentos WO 87/03891; la patente de los EE.UU. Nº 4.888.398 y EP 130 935 incorporados en la presente solicitud por referencia). Estos polímeros (y copolímeros con otros aminoácidos) tienen fórmulas del siguiente tipo:



en la que X designa la cadena lateral de un residuo de amino-ácido y A es un grupo de fórmula



siendo R¹ y R² un átomo de H o alquilo inferiores, y siendo R alquilo o arilo; ó R y R¹ se interconectan juntos por un miembro vinculante sustituido o no sustituido para proporcionar anillos de 5 ó 6 miembros.

El grupo A también puede representar grupos de fórmulas:



y



y los correspondientes anhídridos. En todas estas fórmulas n, m y p son números enteros bajos (no excediendo 5) así como x e y también son enteros, seleccionados por tener pesos moleculares no inferiores a 5000.

Los polímeros mencionados anteriormente son convenientes para confeccionar las microesferas según la presente invención y, dependiendo de la naturaleza de los sustituyentes R, R¹, R² y X, pueden controlarse las propiedades de la pared, por ejemplo, resistencia, elasticidad y biodegradabilidad. Por ejemplo, X puede ser metilo (alanina), isopropilo (valina), isobutilo (leucina e isoleucina) o bencilo (fenil-alanina).

Preferentemente, el material para la formación de la pared es proteínáceo. Por ejemplo, puede ser colágeno, gelatina o albúmina (suero), en cada caso preferentemente de origen humano (es decir, derivado de humanos o correspondiendo a la estructura de la proteína humana). Más preferentemente, es la albúmina de suero humana (HA, por las siglas de su expresión inglesa, Human Protein) derivada de donaciones de sangre o de la fermentación por microorganismos (incluyendo las líneas celulares) que se han transformado o transfectado para expresar la HA.

Las técnicas para expresar la HA (cuyo término incluye análogos y fragmentos de albúmina humana, por ejemplo, aquellos de la patente europea EP-A-322094, y los polímeros de albúmina monomérica) se revela, por ejemplo, en las patentes europeas EP-A-201239 y EP-A-286424. Todas cuyas referencias se han incluidas en la presente solicitud. Los términos "análogos y fragmentos" de la HA incluyen todos los polipéptidos: (i) los cuales sean capaces de formar microesferas en el proceso de la presente invención y (ii) de los cuales se cumpla que una región continua por lo menos de un 50% (preferentemente por lo menos 75%, 80%, 90% o 95%) de la secuencia de aminoácidos tenga por lo menos un 80% de identidad de secuencia (preferentemente, por lo menos 90%, 95% o 99% de identidad) con una región continua por lo menos de un 50% (preferentemente 75%, 80%, 90% o 95%) de albúmina humana. Se prefiere particularmente la HA que se produce por técnicas recombinantes de ADN. Así, la HA puede producirse expresando una secuencia de nucleótidos codificantes de la HA en la levadura o en otro microorganismo y purificando el producto, tal como es conocido en la técnica.

En la siguiente la descripción de realizaciones preferentes, se usa el término "proteína" ya que es el que nosotros preferimos, pero será entendido que pueden usarse otros materiales biocompatibles formadores de pared, como se ha discutido anteriormente.

La solución o dispersión de la proteína es preferentemente 0,1 a 50% p/v, más preferentemente aproximadamente 5,0 – 25,0% de proteína, particularmente cuando la proteína es albúmina. Aproximadamente 20% es lo óptimo. Pueden usarse mezclas de los materiales para formación de pared, en cuyo caso los porcentajes en las últimas dos frases se refieren al contenido total de material para formación de pared.

La preparación a ser aspersada puede contener sustancias de otro tipo que el material para formación de pared y el solvente o portador líquido. Así, la fase acuosa puede contener 1-20% en peso de compuestos hidrófilos solubles en agua como azúcares y polímeros como estabilizadores, por ejemplo, alcohol polivinílico (PVA, por las siglas de su expresión inglesa, Poly Vinyl Alcohol), polivinil pirrolidona (PVP, por las siglas de su expresión inglesa, Poly Vinyl Pyrrolidone), polietilenglicol (PEG), gelatina, ácido poliglutámico y polisacáridos como almidón, dextrana, agar, xantano y análogos. Pueden usarse fases acuosas similares como líquido portador, en el cual el producto final de microesferas estará suspendido antes de su uso. Pueden usarse emulsivos (0,1-5% en peso) incluyendo los emulsivos más aceptables fisiológicamente, por ejemplo, lecitina de huevo o lecitina de soja, o lecitinas sintéticas como las lecitinas sintéticas saturadas, por ejemplo, fosfatidilo de dimiristoil colina, fosfatidilo de dipalmitoil colina o fosfatidilo de distearoil colina o lecitinas sintéticas no saturadas, como fosfatidilo de dioleil colina o fosfatidilo de dilinoleil colina. Los emulsivos también

incluyen tensioactivos como ácidos grasos libres, ésteres de ácidos grasos con compuestos de polioxialquileno como polioxipropilenglicol y polioxietilenglicol; éteres de alcoholes grasos con glicoles de polioxialquileno; ésteres de ácidos grasos con sorbitan polioxialquilado; jabones; estearato de glicerol-polialquileno; ricinoleato de glicerol-polioxietileno; homo- y copolímeros de polialquilenglicoles; aceite de soja polietoxilado y aceite de castor así como derivados hidrogenados; éteres y ésteres de sacarosa u otros hidratos de carbono con ácidos grasos, alcoholes grasos, éstos siendo opcionalmente polioxialquilados; mono-, di- y triglicéridos de ácidos grasos saturados o no saturados, glicéridos de aceite de soja y sacarosa.

Los aditivos pueden incorporarse a la pared de las microesferas para modificar propiedades físicas como dispersabilidad, elasticidad y permeabilidad al agua.

Entre los aditivos útiles, se pueden citar compuestos que puedan "hidrofobizar" la pared para disminuir su permeabilidad al agua, como grasas, ceras e hidrocarburos de altos pesos moleculares. Los aditivos que mejoran la dispersabilidad de las microesferas en el líquido portador inyectable son los compuestos anfipáticos como fosfolípidos; ellos también aumentan la permeabilidad al agua y velocidad de biodegradabilidad.

Los aditivos que aumentan la elasticidad de la pared son plastificadores como el miristato de isopropilo y sus análogos. También, aditivos muy útiles son los constituidos por polímeros semejantes a los de la propia pared, pero con un peso molecular relativamente bajo. Por ejemplo, al usar copolímeros de tipo polilácticos / poliglicólicos como material para la formación de la pared, pueden modificarse ventajosamente las propiedades de la pared (una suavidad y biodegradabilidad mejorada) incorporando, como aditivos, poliglicólidos o poliláctidos de peso molecular bajo (1000 a 15,000 Dalton). También el polietilenglicol de PM medio a bajo (por ejemplo, PEG 2000) es un aditivo útil para reblandecimiento.

La cantidad de aditivos que debe ser incorporada en la pared es sumamente variable y depende de las necesidades. En algunos casos, no se usa en absoluto ningún aditivo; en otros casos, las cantidades de aditivos pueden alcanzar aproximadamente 20% en peso de la pared.

La solución o dispersión de proteína (preferentemente, la solución) lo que es denominado en adelante "preparación de la proteína", se atomiza y seca por spray, por cualquier técnica conveniente que produzca microesferas discretas de 1,00 – 50,0 µm de diámetro. Estos datos se refieren por lo menos a 90% de la población de microesferas, cuyo diámetro es medido con un Coulter Master Sizer II. El término "microesferas" denomina las partículas huecas que encierran un espacio que esté lleno con un gas o vapor, pero no con cualquier material sólido. No se conforman las partículas en forma de panales de abejas, que se parecen a productos de confitería, vendidas en el REINO UNIDO como "Maltesers" (TM.). No es necesario que el espacio sea totalmente encerrado (aunque se prefiere) y no es necesario que las microesferas sean precisamente esféricas, aunque éstas sean generalmente esféricas. Si las microesferas no son esféricas, entonces los diámetros, referidos anteriormente, se aplican al diámetro de las microesferas esféricas correspondientes, teniendo la misma masa y encerrando el mismo volumen de espacio vacío, que las microesferas no esféricas.

El proceso de atomizado comprende formar un aerosol para preparación de la proteína, por ejemplo, forzando a presión la preparación a través por lo menos de un orificio hacia, o usando un atomizador centrífugo en, una cámara de aire caliente u otro gas inerte. La cámara idealmente debiera ser lo bastante grande para que las gotas, proyectadas a la mayor distancia, no colisionen las paredes antes de secarse. El gas o vapor en la cámara es limpio (es decir, preferentemente estéril y libre de sustancias pirógenas) y no tóxico, cuando se administre en el torrente sanguíneo en cantidades concomitantes con la administración de microesferas en ecocardiografía. La velocidad de evaporación del líquido desde la preparación de la proteína, debe ser lo suficientemente alta como para formar microesferas huecas, pero no tan alta como para provocar el estallido de las microesferas. La velocidad de evaporación puede controlarse variando la velocidad de flujo del gas, la concentración de la proteína en la preparación de proteína, la naturaleza del portador líquido, la velocidad de alimentación de la solución y, lo más importante, la temperatura del gas encontrado por el aerosol. Con una concentración de albúmina de 15-25% en agua, una temperatura de gas de entrada por lo menos de aproximadamente 100°C, preferentemente por lo menos 110°C, es generalmente suficiente para asegurar la coqueidad y la temperatura puede ser tan alta como 250°C sin que las cápsulas estallen. Aproximadamente 180-240°C, preferentemente aproximadamente 210-230°C y más preferente aproximadamente 220°C, es la óptima, por lo menos para la albúmina. La temperatura puede, en la versión de un solo paso del proceso de la presente invención, ser por lo menos suficiente para como para insolubilizar parte (normalmente, el exterior) del material destinado a la formación de la pared y frecuentemente esencialmente a todo el material destinado a la formación de la pared. Ya que la temperatura del gas encontrado por el aerosol también dependerá de la velocidad a la que se suministre el aerosol, y del contenido del líquido de la preparación de proteína, puede supervisarse la temperatura de salida para asegurar una temperatura adecuada en la cámara. Se ha encontrado que es conveniente una temperatura de salida de 40-150°C. Aparte de este factor, sin embargo, el control de la velocidad de flujo no se ha encontrado que sea tan útil como el control de los otros parámetros.

En el proceso de dos pasos, las microesferas intermedias representativamente comprenden 96-98% de HA monomérico y tienen un tiempo de vida *in vivo* limitado para la imaginología de ultrasonido. Éstas pueden, sin embargo, lo mismo ser usadas para imaginología por ultrasonido (por lo menos, en algunos usos de las microesferas de la presente invención), o éstas pueden almacenarse y transportarse antes de que se lleve a cabo el segundo paso del proceso de dos pasos. Éstas forman, por consiguiente, un aspecto adicional de la invención.

5 En el segundo paso del proceso, las microesferas intermedias preparadas en el primer paso se fijan y se hacen menos solubles en agua para que éstas persistan un intervalo de tiempo más largo, aunque no siendo tan insolubles e inertes como para volverse no biodegradables. Este paso también fortalece las microesferas para que éstas puedan resistir bien los rigores de administración, presión de esquila vascular y ventricular. Si las microesferas estallaran, éstas se volverían menos ecogénicas. Schneider *et al* (1992) *Invest. Radiol.* 27, 134-139 mostraron que las microburbujas de albúmina, sonicadas según la técnica anterior, no tienen esta resistencia y rápidamente pierden su ecogenicidad, cuando se someten a las presiones típicas del ventrículo izquierdo. El segundo paso del proceso puede emplear calor (por ejemplo, calor por microondas, calor radiante o aire caliente, por ejemplo en un horno convencional), irradiación ionizante (por ejemplo, una dosificación de 10,0-100,0 kGy con rayos gamma), o puede emplear reticulación usando un agente químico como, por ejemplo, formaldehído, glutaraldehído, óxido de etileno u otros agentes para reticulación de proteínas, y este paso se lleva a cabo preferentemente en microesferas intermedias sustancialmente secas, conformadas en el primer paso, o en una suspensión de microesferas en un líquido, en el que las microesferas sean insolubles, por ejemplo, en un solvente conveniente. En la versión del proceso en un paso, puede rociarse un agente de reticulación como el glutaraldehído dentro de la cámara de secado por spray, o simplemente puede introducirse durante la preparación de la proteína, justamente río arriba de los medios de rociado. Alternativamente, la temperatura en la cámara puede ser lo bastante alta como para insolubilizar las microesferas.

20 Las microesferas pueden, si se desea, consistir en microesferas que tengan un diámetro de 0,05 a 50,0 µm (medido de la misma manera como en las microesferas intermedias), pero con el proceso de la presente invención son asequibles intervalos de 0,1 a 20,0 µm y sobre todo 1,0 a 8,0 µm, y éstos se prefieren para la ecocardiografía. Nosotros hemos encontrado que un intervalo de aproximadamente 0,5 a 3,0 µm puede ser especialmente conveniente para la producción de una imagen de bajo contraste y para su uso en la imaginología Doppler a color, considerando que un intervalo de aproximadamente 4,0 a 6,0 µm puede ser bueno para la producción de imágenes nítidas. Se necesita tener en cuenta el hecho, que para la determinación del tamaño producido en el primer paso, el segundo paso puede alterar el tamaño de las microesferas.

25 Se ha encontrado que el proceso de la presente invención puede controlarse para obtener microesferas con las características deseadas. Así, la presión a la que la solución de proteína se administra a la boquilla para spray puede variarse, por ejemplo de 1,0-10,0 x 10⁵ Pa, preferentemente 2,0-6,0 x 10⁵ Pa, y la más preferente aproximadamente 5 x 10⁵ Pa. Otros parámetros pueden variarse como se ha revelado anteriormente y se revela a continuación. De esta manera, pueden obtenerse nuevas microesferas.

30 Un aspecto adicional de la presente invención proporciona microesferas de las que al menos 90% son de 1,0 a 10,0 µm comprendiendo las paredes de las microcápsulas ácido hialurónico. Preferentemente, más de 30%, preferentemente más de 40%, 50%, o 60%, de microesferas tienen un diámetro dentro de un intervalo de 2 µm y al menos 90%, preferentemente al menos 95% o 99%, tienen un diámetro dentro del intervalo 1,0-8,0 µm.

Así, el intervalo intercuartil puede ser 2 µm, con un diámetro promedio de 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 o 6,5 µm.

35 Así, por lo menos 30%, 40%, 50% o 60% de las microesferas pueden tener diámetros dentro del intervalo 1,5-3,5 µm; 2,0-4,0 µm; 3,0-5,0 µm; 4,0-6,0 µm; 5,0-7,0 µm o 6,0-8,0 µm. Preferentemente dicho porcentaje de dichas microesferas tiene diámetros dentro de un intervalo de 1,0 µm, como 1,5-2,5 µm, 2,0-3,0 µm, 3,0-4,0 µm, 4,0-5,0 µm, 5,0-6,0 µm, 6,0-7,0 µm o 7,0-8,0 µm.

40 La microscopía electrónica de barrido de las microcápsulas muestra que éstas son esferas huecas sin ninguna materia sólida, excepto en las paredes. El espesor de pared puede medirse por microscopía o puede calcularse como se expone a continuación. La masa de material que forma las paredes en cada uno de las gotas aspersadas se da por la siguiente fórmula:

$$M = V \times C = 4/3 (\pi r_e^3 c) \quad (I)$$

45 en la que M: Masa; V: volumen de la gotita; c: concentración del material que forma las paredes en la solución aspersada, y r_e es el radio externo de la gotita.

Nuestros estudios han demostrado que la dimensión externa de la gota queda esencialmente inalterada, aunque el solvente se haya evaporado. La masa del material que forma las paredes en la microcápsula seca, por consiguiente, se da por:

$$M = 4/3 [\pi (r_e^3 - r_i^3) \rho] \quad (II)$$

50 En la que r_e es el radio externo de la microcápsula (el mismo que el de la gotita), r_i es el radio interior de la microcápsula y ρ es la densidad del material que forma la pared. El espesor de la pared entonces se representa por r_e - r_i. La cantidad r_e es conocida de la medida directa de las microcápsulas usando un contador Coulter, y r_i se obtiene de la ecuación (III)

$$r_i = [r_e^3 - (r_e^3 * c / \rho)]^{1/3} \quad (III)$$

De aquí, para un diámetro externo de 5 μm (radio externo de 2,5 μm), una concentración en la solución aspersada de 0,2 g/ml (20%) y una densidad de pared de 1,31 g/cm³ (determinable por picnometría con helio), el espesor de pared puede calcularse, siendo 134 nm.

5 Preferentemente, por lo menos un 75%, 90%, 95%, 98,0%, 98,5% o 99%, de la proteína en las microesferas de la invención está suficientemente reticulada como para ser resistente, durante 2 minutos, a la extracción con una solución de HCl al 1%. La proteína extraída se detecta usando el ensayo de proteína Blue Coomassie, Bradford. El contenido de proteína en los lavados se expresa como un porcentaje de la masa original de las microcápsulas.

10 El grado de reticulación es controlado variando el calentamiento, irradiación o tratamiento químico de la proteína. Durante el proceso de reticulación, el monómero de la proteína es reticulado y rápidamente se vuelve inaccesible a un proceso de disolución simple, como se ha descubierto por HPLC de permeación en gel o por electroforesis en gel, como se muestra posteriormente en el Ejemplo 8. El tratamiento continuado conlleva mayor reticulación del material ya reticulado de forma tal que se vuelve inaccesible a un proceso de extracción con HCl, el que ya se describió anteriormente. Durante el calentamiento a 175°C, las microesferas obtenidas de rHA de acuerdo con la invención, pierden aproximadamente 99% de la proteína extraíble por HCl en el transcurso de unos 20 minutos, mientras que, a 150°C, 20 minutos de calentamiento retiran sólo aproximadamente un 5% de la proteína extraíble por HCl, 30 min. retiran 47,5%, 40 min. 83%, 60 min. 93%, 80 min. 97% y 100 min. retiran 97,8% de la proteína de extraíble por HCl. Para lograr buenos niveles de reticulación, por consiguiente, las microesferas pueden calentarse a 175°C durante por lo menos 17 min. (preferentemente durante 20-40 min., lo más preferente 35-40 min.) a 150°C durante por lo menos 80 min. y a otras temperaturas correspondientemente durante tiempos más largos o más cortos. Nosotros hemos encontrado que la albúmina derivada del suero necesita menos tiempo para reticular que el rHA.

25 Las microesferas inyectables de la presente invención pueden guardarse secas en presencia, o en ausencia, de aditivos para mejorar la conservación y prevenir su coalescencia. Se pueden seleccionar fisiológicamente de 0,1 a 25% en peso de aditivos solubles en agua, de compuestos biológicamente aceptables como manitol, galactosa, lactosa o sacarosa, o de polímeros hidrófilos como dextrana, xantano, agar, almidón, PVP, ácido poliglutámico, polivinilalcohol (PVA, por las siglas de su expresión inglesa, Poly Vinyl Alcohol) y gelatina.

30 Para minimizar cualquier aglomeración de las microesferas, éstas pueden molerse con excipientes inertes convenientes usando un molino centrífugo de aguja Fritsch, equipado con una pantalla de 0,5 mm, o un molino a chorro por impacto de aire, Glen Creston. Los excipientes convenientes son polvos finamente molidos, inertes, y convenientes para uso intravenoso, como lactosa, glucosa, manitol, sorbitol, galactosa, maltosa o cloruro de sodio. Una vez molida, la mezcla de las microesferas / excipiente puede suspenderse en medio acuoso para facilitar la retirada de microesferas no funcionales / defectuosas. En la reconstitución en la fase acuosa, es deseable incluir una cantidad, trazas, de tensioactivo para prevenir la aglomeración. Los tensioactivos aniónicos, catiónicos y no iónicos convenientes para este propósito incluyen poloxámeros, ésteres de sorbitan, polisorbatos y lecitina.

35 La suspensión de las microesferas se puede luego dejar flotar o se puede centrifugar para sedimentar cualquier partícula defectuosa que tenga defectos en la superficie, que en su uso podría causar el llenado con líquido y no continuar siendo ecogénicas por más tiempo.

40 La suspensión de las microesferas puede luego ser remezclada para asegurar una distribución uniforme de partículas, se puede lavar y reconstituir en un búfer conveniente para inyección intravenosa, como 0,15 M de NaCl 0,01 mM Tris pH 7,0. Se pueden tomar alícuotas de la suspensión para su congelación y esterilización posterior, por ejemplo, por irradiación gamma, calor seco u óxido de etileno.

Un método alternativo para la deaglomeración de las microesferas, insolubilizadas o fijadas, es suspenderlas directamente en un medio acuoso que contenga un tensioactivo escogido entre poloxámeros, ésteres de sorbitan, polisorbatos y lecitina. Entonces puede lograrse la deaglomeración usando un homogenizador conveniente.

45 La suspensión de las microesferas se puede luego dejar flotar o se puede centrifugar para sedimentar las partículas defectuosas, como anteriormente se ha descrito, y adicionalmente se puede tratar como se ha expuesto anteriormente.

50 Aunque las microesferas de la presente invención pueden comercializarse en estado seco, más precisamente, cuando éstas se diseñan para un tiempo de vida limitado después de su inyección, puede también ser deseable vender las preparaciones ya listas, es decir suspensiones de las microesferas en un portador líquido acuoso, listo para su inyección.

El producto generalmente es, sin embargo, suministrado y almacenado como un polvo seco y será suspendido en un líquido conveniente estéril, no pirogénico, justo antes de su administración.

55 Preferentemente, al menos un 10% de las microesferas, cuando son suspendidas en agua, son capaces de sobrevivir durante 0,25 seg. a la aplicación de una presión de $2,66 \times 10^4$ Pa sin estallar, colapsar o llenarse con agua. La presión máxima transitoria en el ventrículo izquierdo humano es aproximadamente 200 mm Hg ($2,66 \times 10^4$ Pa).

Preferentemente, un 50%, 75%, 90% o 100% sobrevive durante 0,25 seg. a dicha aplicación de presión, $2,66 \times 10^4$ Pa, cuando se ensayan como anteriormente se describió, es decir, que siguen siendo ecogénicas. Preferentemente,

in vivo, en los mismos porcentajes seguirán siendo ecogénicas durante un paso a través de ambos ventrículos del corazón. Las microesferas de la invención pueden ser producidas controlando los parámetros del proceso de secado por spray. La concentración del material para la formación de pared, en el líquido que debe ser convertido a spray, puede ser igual, que para las microesferas descritas anteriormente, a saber 0,1-50,0% p/v (preferentemente aproximadamente 5,0-25,0%, sobre todo cuando el material para la formación de pared es la albúmina), como puede ser la temperatura en la cámara caliente (100-250°C, preferentemente 200-250°C) y el segundo paso del proceso, pero la presión de spray se reduce a menos de 2 bar (2×10^5 Pa), y preferentemente no es mayor que $1,8 \times 10^5$ Pa; $1,5 \times 10^5$ Pa; o $1,3 \times 10^5$ Pa. Se prefiere una presión mínima de 1×10^5 Pa.

Las microesferas de la invención pueden ser adecuadas para su uso como agente de contraste ecográfico de depósito para delinear áreas infraperfundidas de microcirculación. Nosotros hemos encontrado que las microesferas de tamaño promedio 15,0 μm tienen ecogénicidades superiores en unas $4,6 \times 10^4$ veces a la de las microesferas similares de tamaño promedio 5,0 μm . Así, puede usarse una dosis relativamente baja para obtener imagen de regiones en lo profundo del cuerpo, las cuales son inaccesibles a las técnicas normales de ultrasonido. Las microesferas pueden suministrarse por técnicas conocidas que usan catéteres para entregar las microesferas, por ejemplo, a los capilares del hígado, riñón o vasos sanguíneos coronarios. Una ventaja, comparado con los estudios clásicos usando microesferas radiomarcadas, es que, después de la administración arterial, retirada del catéter y estabilización del paciente, se pueden tomar imágenes planas múltiples para construir un mapa de perfusión en 3D del miocardio o de cama capilar similar. El flujo miocárdico regional de sangre se puede evaluar cualitativamente en pacientes con enfermedad de arterias coronarias en el momento de la angiografía por imagen del corazón, posterior a la inyección intracoronaria directa de las microesferas. Estas microesferas se atrapan en la microvasculatura del corazón durante la transmisión inicial a través de la circulación coronaria. No se espera ningún efecto hemodinámico o electrofisiológico adverso, que sea detectable, ya que sólo una fracción muy pequeña de los capilares o arteriolas son embolizados. Cuando el flujo de sangre nutriente a un segmento del miocardio ventricular izquierdo disminuye, como en una región de cicatriz miocárdica o en una región causada por una arteria coronaria ocluida o severamente estenótica, será reducido el número de microesferas entregadas a estos segmentos. Esto se aprecia como una reducción focal en la actividad, secundaria a una infraperfusión regional. Debido a que las microesferas se introducen en las arterias, se evita la necesidad de retirar las microesferas en los capilares del pulmón.

En el contexto de la angiografía, un catéter se pone dentro del ventrículo izquierdo vía inserción en la arteria femoral. Se inyectan tintes, opacos a los rayos X, tanto en el ventrículo izquierdo, como dentro de las propias arterias coronarias. La inyección de tales agentes permite la visualización de vasos al nivel de 100 μm de diámetro, proyectando la información en 3D hacia un plano de 2D. Actualmente la angiografía permite identificar la estenosis de las arterias coronarias mayores.

El uso de las microesferas de la invención con la tecnología de ultrasonido puede habilitar la generación de imágenes tomográficas múltiples y también la reconstrucción de imágenes en 3D. El depositar las microesferas durante un tiempo suficiente como para habilitar la reconstrucción de imágenes tomográficas o imágenes en 3D de la cama vascular, pueden delinearse las camas de perfusión. Por consiguiente, adjunto a la angiografía para identificar la lesión causal principal., un agente de contraste ecográfico de depósito, constituido por las microesferas grandes de la presente invención, puede permitir identificar territorios de perfusión en 3D

Gracias a la estabilidad frente a la presión de las microesferas preferentes, éstas retienen aire y la ecogenicidad durante un sustancial período de tiempo. Las microesferas se pueden depositar en la vasculatura a continuación de la administración del catéter, de una manera similar a los estudios clásicos con microesferas, reflejando la cantidad de flujo a cualquier territorio dado de perfusión. La imagen del territorio puede hacerse luego, después de la retirada del catéter y de la estabilización del paciente, para facilitar la captación de imágenes más óptimas en planos múltiples. La comparación con una imagen de base no reforzada facilita así la evaluación de perfusión, después de un procedimiento correctivo.

Las microesferas pueden adecuarse para uso intracoronario no sólo por modificación de su tamaño y estabilidad frente a la presión, sino también por su velocidad de biodegradación.

Para el uso intracoronario, es preferible reticular microcápsulas de 10-20 μm a 175°C durante un período de 18-60 minutos, más preferentemente 20-40 minutos, y lo más preferente durante 35-40 minutos. Ésto proporciona microcápsulas que son resistentes a la presión, pero que tienen una vida media del tejido acortada en comparación con las microcápsulas del documento WO 92/18164 y, por consiguiente, son más aplicables al usarlas en la microcirculación del miocardio. La vida media del tejido puede medirse por el marcado de las microcápsulas con ^{125}I por el método de la Cloramina T, y evaluando el contenido en microcápsulas del órgano por necropsia o la liberación del ^{125}I en la orina y heces.

Las microesferas de la invención se caracterizan por tener en sus paredes un material, concretamente ácido hialurónico, que dirige u orienta las microesferas hacia una situación deseada en el cuerpo.

Las microesferas de la invención pueden ser preparadas incluyendo dentro o sobre la pared de la microesfera un material que altere la carga eléctrica de la microesfera.

Así, se puede impartir una carga positiva o negativa aplicando un material cargado positiva o negativamente, respectivamente, o se puede reducir una carga positiva o negativa existente, o se la puede eliminar. Estos efectos pueden lograrse de una variedad de maneras. Las microesferas del producto final (es decir, resistentes a la presión) producidas por el proceso básico de uno o dos pasos, descrito anteriormente, se pueden molar como fue descrito con anterioridad y pueden ser resuspendidas a una concentración de microesferas de $1,0-250 \times 10^6/\text{ml}$ en: una solución 0,5-20,0% p/v (preferentemente 1,0-10,0% p/v, por ejemplo, aproximadamente 5% p/v) de un material cargado positiva o negativamente (si fuera polimérico, de 1-30 kD, preferentemente 5-15 kD), y pueden ser incubadas durante 5-60 horas (preferentemente aproximadamente 8-24 horas) a 5-30°C (preferentemente aproximadamente 20°C). Los ácidos poliaminados positivamente cargados incluyen polilisina, poliaspartamida, poliarginato y polihistidina. Los ácidos poliaminados negativamente cargados incluyen poliglutamato y poliaspartato. Otros polímeros negativamente cargados incluyen fosfolípidos, y ácido poliglucónico. Una ventaja de tales agentes recubiertos de contraste ecográfico es el aumentar la ecogenicidad del flujo de la sangre para lograr una mejora en las señales Doppler.

Alternativamente, y más preferente, las carga positivas o negativas sobre las microesferas pueden ser aumentadas incorporando el material a la alimentación de secado en spray en el intervalo de 1-30%, preferentemente 2-10% p/v. Este último método se prefiere particularmente para el poliglutamato y, generalmente, para los aditivos cargados negativamente.

Otros materiales, que pueden usarse de la misma manera para impartir una carga negativa, incluyen los anhídridos y cloruros de los ácidos orgánicos C_{1-10} , como acético, fumárico y ácidos succínicos. Generalmente, es adecuada una concentración final del cloruro o anhídrido de 5-1000 mg/ml, en un solvente no polar, como son la dimetilformamida o tetrahidrofurano. Es conveniente un tiempo de incubación de 0,5-5 horas, preferentemente aproximadamente 1 hora, a 5-30°C, preferentemente aproximadamente 20°C, seguido por un lavado con un exceso de agua.

Las cargas negativas existentes en las microesferas preparadas por el proceso básico de secado por spray pueden ser retiradas exponiendo las microesferas a un agente carbodiimida, como el clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetil-amino-propil)carbodiimida (EDC), a una concentración de aproximadamente 5-1000 mg/ml durante un período de aproximadamente 5-30 horas (preferentemente aproximadamente 16 horas) a 5-30°C (preferentemente aproximadamente 20°C). El exceso de reactivo se elimina entonces, por ejemplo, por lavado con etanolamina a una concentración equivalente durante una incubación adicional similar, antes de que las microesferas sean lavadas.

Puede evaluarse la movilidad de las microesferas en electroforesis en un aparato Malvern Zeta sizer o en una célula de minielectroforesis de un sistema Pen Kem System 3000 (EE.UU.), por ejemplo para 20 partículas en búferes de pH 4-10. Preferentemente, la movilidad en la electroforesis está en uno de los intervalos positivo o negativo de $0,001-5,0 \times 10^{-8}$ m/seg/v/cm. En estos intervalos, la carga sobre las microesferas altera su comportamiento circulatorio. Más preferentemente, la movilidad está en uno de los intervalos positivo o negativo desde 0,01 hasta $0,5 \times 10^{-8}$ m/seg/v/cm, adecuadamente en uno de los intervalos positivo o negativo desde 0,1 hasta $0,5 \times 10^{-8}$ m/seg/v/cm.

En todos estos métodos de alteración de carga sobre las microesferas, las microesferas resultantes pueden finalmente formularse para almacenamiento como se ha descrito anteriormente, suspendiéndolas por ejemplo en una solución manito l/ Pluronic F 68, sometiéndolas a una congelación instantánea y a su deshidratación por congelación.

La carga superficial de las microcápsulas puede afectar las propiedades de imaginología del producto a través de su influencia sobre el destino *in vivo* de las partículas. Por ejemplo, se sabe que después de una inyección intravenosa de las partículas negativamente cargadas del poliestireno se asimilan con alta eficacia por el hígado, mientras que las partículas con una carga positiva aumentan inicialmente en el pulmón. Adicionalmente, se sabe que la superficie celular endotelial esta recubierta con un glicocalyx que porta una carga negativa neta a valores fisiológicos de pH. Por consiguiente, la superficie interna del endotelio puede entintarse con partículas férricas coloidales que porten una carga positiva neta. Por consiguiente, en las áreas de flujo lento o débil, como las experimentadas en las camas capilares de la vasculatura periférica, hígado, riñón y miocardio, el aumento de la carga positiva neta en la corteza de las microcápsulas y del revestimiento endotelial puede conducir a un tránsito deprimido a través de la microcirculación. Esto crea la posibilidad de ventanas de imaginología extendidas o incluso al depósito de agentes de contraste ecográfico para el análisis de la microvasculatura posterior a su administración intravenosa.

Una suspensión de las microesferas de la presente invención generalmente se administra por inyección de aproximadamente 1,0-10,0 ml en una vena conveniente como la vena cubital u otro vaso sanguíneo. Es conveniente una concentración de microesferas desde aproximadamente $1,0 \times 10^5$ hasta $1,0 \times 10^{12}$ partículas/ ml, preferentemente desde aproximadamente $5,0 \times 10^5$ hasta $5,0 \times 10^9$.

Aunque la imagen ultrasónica es aplicable a sistemas de órganos del cuerpo de diversos animales y humanos, una de sus aplicaciones principales es la obtención de imágenes de tejidos del miocardio y modelos de perfusión o flujo de sangre.

Las técnicas usan equipo de examen ultrasónico que consiste en un escáner y aparato de tratamiento de imagen. El equipo produce imágenes visuales de un área predeterminada, en este caso, de la región del corazón de un cuerpo humano. Típicamente, el transductor se pone directamente sobre la piel encima del área a ser imaginada. El escáner aloja varios componentes electrónicos que incluyen transductores ultrasónicos. El transductor produce ondas

ultrasónicas que realizan un examen de un sector de la región del corazón. Los ultrasonidos se reflejan por las diversas porciones de la región del corazón, se reciben por el transductor receptor y se procesan de acuerdo con métodos de pulsos de eco, conocidos en la técnica. Después de procesadas, las señales se envían al aparato de tratamiento de imagen (también bien conocido en la técnica) para su visualización.

5 En el método de la presente invención, después de que el paciente esté "preparado" y el escáner esté en su lugar, se inyecta la suspensión de microesferas, por ejemplo a través de una vena del brazo. El agente de contraste fluye a través de la vena al lado venoso derecho del corazón, a través de la arteria pulmonar principal que lleva a los pulmones, por los pulmones, a través de los capilares, dentro de la vena pulmonar y finalmente dentro el atrio izquierdo y la cavidad ventricular izquierda del corazón.

10 Con las microesferas de la presente invención, pueden hacerse observaciones y diagnósticos con respecto a la cantidad de tiempo requerida para que la sangre atraviese los pulmones, los modelos de flujo de la sangre, el tamaño del atrio izquierdo, la competencia de la válvula mitral (que separa el atrio izquierdo y el ventrículo izquierdo), dimensiones de la cámara en la cavidad ventricular izquierda y anomalías de movimiento de la pared. En la eyección del agente del contraste desde el ventrículo izquierdo, también puede analizarse la competencia de la válvula aórtica, así como la fracción de eyección o porcentaje de volumen eyectado desde el ventrículo izquierdo. Finalmente, los modelos de contraste en el tejido indicarán cuáles áreas, si las hubiera, no están siendo adecuadamente perfundidas.

En resumen, un modelo tal de imágenes ayudará a diagnosticar las características inusuales del flujo de sangre dentro del corazón, la competencia valvular, dimensiones de cámara y movimientos de pared, y proporcionará un indicador potencial de perfusión miocárdica.

20 Las microesferas pueden permitir el tratamiento de imagen del corazón izquierdo a partir de inyecciones intravenosas. Las microesferas de albúmina, cuando se inyectan en una vena periférica, pueden ser capaces de un paso transpulmonar. Esto produce la opacificación ecocardiográfica de la cavidad del ventrículo izquierdo (LV), así como del tejido miocárdico.

25 Además del escáner brevemente descrito anteriormente, existen otros escáneres ultrasónicos, cuyos ejemplos se revelan en las patentes de los EE.UU. Nº 4.134.554 y 4.315.435, cuyas revelaciones están incorporadas a la presente solicitud como referencias. Básicamente, estas patentes se refieren a varias técnicas que incluyen la ecografía dinámica de sección transversal (DCE) para producir imágenes bidimensionales secuenciales de cortes transversales de anatomía animal o humana por medio de energía ultrasónica a una velocidad de trama suficiente como para habilitar la visualización dinámica de los órganos en movimiento. Generalmente los tipos de aparatos utilizados en DCE se denominan escáneres DCE, y transmiten y reciben pulsos cortos, sónicos, en forma de rayos o líneas estrechas. La fuerza de las señales reflejadas es una función del tiempo que se convierte a una posición, usando una velocidad nominal de sonido y se despliega en un tubo de rayos catódicos u otros dispositivos convenientes de manera algo análoga a los monitores de radar o sonar. Aunque la DCE puede usarse para producir imágenes de muchos sistemas de órganos incluyendo hígado, vesícula, páncreas y riñón, frecuentemente se usa para la visualización de tejido y vasos sanguíneos principales del corazón.

30 Las microesferas pueden usarse para la imaginología una variedad amplia de áreas, incluso cuando se inyectan a un sitio venoso periférico. Esas áreas incluyen (sin limitación): (1) sistema de drenaje venoso al corazón; (2) tejido miocárdico y características de la perfusión durante una prueba de ejercicios o análogas; y (3) tejido miocárdico después de una ingestión oral o inyección intravenosa de drogas diseñadas para aumentar el flujo de sangre al tejido. Adicionalmente, las microesferas pueden ser útiles delineando los cambios en la perfusión de tejido miocárdico, debidos a intervenciones como (1) injertos por venas de la arteria coronaria; (2) angioplastia de arteria coronaria (dilatación por globo de una arteria estrechada); (3) uso de agentes trombolíticos (como la estreptoquinasa) para disolver coágulos en las arterias coronarias; o (4) defectos o cambios de perfusión debido a un reciente ataque cardíaco.

35 Además, en el momento de un angiograma coronario (o de un angiograma de sustracción digital) una inyección de microesferas puede proporcionar datos con respecto a las características de perfusión del tejido que aumentarían y complementarían los datos obtenidos del procedimiento de angiograma que identifica la anatomía sólo de vasos sanguíneos.

40 A través del uso de las microesferas de la presente invención, otros sistemas de órganos no cardíacos incluyendo el hígado, bazo y riñón que son actualmente imaginados por técnicas ultrasónicas pueden ser adecuados para mejora de tales imágenes actualmente ya asequibles, y/o generación de nuevas imágenes que muestren las características de perfusión y flujo, que no habían sido previamente susceptibles a la imaginología usando la técnica anterior de imaginología ultrasónica.

Se describirán ahora aspectos preferentes de la presente invención por vía de ejemplo y con la referencia a:

45 La Figura 1 es una vista en perspectiva de un corte parcial frontal y un lado del aparato conveniente de secado por spray para la primera fase del proceso de la invención.

50 La Figura 2 es un gráfico que muestra cómo el grado de fijación de las paredes de las microesferas (en este caso, la albúmina) se puede controlar variando la temperatura y el tiempo de calentamiento en el segundo paso del proceso.

La Figura 3 es un gráfico que muestra cómo la resistencia a la presión de las microesferas se puede variar alterando la duración del tiempo de calentamiento en el segundo paso del proceso.

5 La Figura 4 es un gráfico que muestra cómo se puede variar la velocidad de biodegradación *in vitro*, variando la duración del tiempo de calentamiento en el segundo paso del proceso, evaluado por medida turbidimétrica para medir la desaparición de las microcápsulas.

Las figuras 5a y 5b todavía son respectivas copias para exhibición de cinta de video, mostrando la apariencia de miocardio de cerdo antes y después de la inyección de 4 millones de microcápsulas grandes de la presente invención en el ventrículo izquierdo.

EJEMPLO PREPARATIVO GENERAL N° 1

10 Los "Ejemplos Preparativos Generales" no pueden en sí mismos producir microcápsulas de la invención pero se incluyen para demostrar aspectos del proceso básico de atomización.

15 El secador de secado por spray adecuado (Figura 1) está disponible en A/S Niro Atomizer, Soeborg, Dinamarca bajo la denominación comercial "Mobile Minor". Detalles de su construcción se dan en la presente solicitud, inmediatamente antes de las reivindicaciones. Comprende un atomizador centrífugo (Tipo M-02/B Minor), manejado por una turbina a una presión mínima de aire 4 bar y máxima 6 bar. A unas 6 bar se alcanza una velocidad de rueda de atomizador de aprox. 33,000 rpm. Se suministra y retira el aire comprimido del atomizador por medio de una válvula colocada en el panel del instrumento. El consumo máximo de aire comprimido suministrado al atomizador es 17 Nm³/h a una presión de 6 bar. Todas las partes que entran en contacto con la alimentación líquida y el polvo están hechas de acero inoxidable AISI 316, excepto el tubo de la bomba de alimentación y la rueda del atomizador que están hechas de acero inoxidable AISI 329, confeccionado para resistir una alta fuerza centrífuga. El sistema 4 de tubería de interconexión de acero inoxidable puede fácilmente despojarse desde abajo para su limpieza.

20 La cámara de secado tiene un interior confeccionado de acero inoxidable AISI 316, bien aislado con Rockwool, y está recubierta por fuera con una chapa de acero al carbono. La cámara de secado se proporciona con una luz lateral y una hoja de vidrio de observación para su inspección durante el funcionamiento y los pasos 5 para acceso a la cima de la cámara. El tejado de la cámara de secado es confeccionado por dentro de acero inoxidable AISI 316 y por fuera de acero inoxidable AISI 304. Hay un interruptor 6 para una válvula de aire para activación del dispositivo de levantamiento neumático al levantar la tapa de la cámara.

25 Un distribuidor 2 de aire, confeccionado de acero inoxidable AISI 304, se emplea para la distribución del aire en la cámara de secado a fin de alcanzar el mejor efecto posible de secado. Se dirige el aire removido alrededor de un atomizador de disco con aspas. Un conducto de aire, confeccionado de acero inoxidable AISI 316, proporciona el transporte lateral del aire de descarga y del polvo al ciclón 7, confeccionado de acero inoxidable AISI 316 y diseñado para separar el polvo del aire

30 Una válvula de cierre del tipo mariposa, también está confeccionada de acero inoxidable AISI 316 y está provisto de una empaquetadura de caucho silicona, se usa para la descarga hermética del polvo desde debajo del ciclón hacia un frasco 8 de vidrio, colector de polvo, que se encuentra situado bajo el ciclón accionado por un dispositivo de muelle.

35 Un ventilador centrífugo 10 de descarga, confeccionado de silumin, completado con un motor trifásico de jaula de ardilla, 025 kV y cinta en forma de V, accionado por una cinta guardián, arrastra el aire y polvos a través de la cámara de secado y ciclón. Hay un interruptor 11 para el control de flujo de aire vía un regulador del tiro.

40 Un calentador eléctrico de aire 12 calienta el aire de secado (consumo total 7,5 kWh/h, variable continuo) y puede suministrar una temperatura de aire a la entrada de aproximadamente 350°C, aunque generalmente ésta es demasiado alta para la preparación de las microesferas de la presente invención.

La capacidad de evaporación es como sigue:

CAPACIDAD DE EVAPORACIÓN

Aire de secado	Temperatura del aire a la entrada, °C	Temperatura del aire a la salida, °C	Capacidad de evaporación kg/h
85	150	80	1,3
85	170	85	1,7
80	200	90	2,5
80	240	90	3,4
75	350	90	7,0

5 Pueden agregarse equipos para atomización simultánea de dos fluidos empleando una boquilla, que se confecciona de acero inoxidable AISI 316 y consiste en una tubería de entrada con un sostenedor de la boquilla y propiamente la boquilla, que debe ser localizada en el techo de la cámara de secado. El equipo incluye un separador aceite / agua, una válvula reductora y manómetro para el aire comprimido suministrado a la boquilla para dos fluidos. El consumo de aire comprimido es de 8-15 kg/h a una presión de 0,5-2,0 bar (0,5-2,0 x 10⁵ Pa).

10 Se emplea una bomba peristáltica adecuada para el transporte de la alimentación de la preparación destinada a la formación de las paredes de los gránulos, suministrada desde un recipiente 1 a la boquilla atomizadora 3. La bomba está provista de un motor (1 x 220V, 50 Hz, 0,18 Kw.) y un engranaje continuo variable para ajuste manual. Una tubería de alimentación confeccionada de manguera de silicona se extiende desde un tanque de alimentación (suministro local) 1 a través de la bomba de alimentación hasta el dispositivo de atomización 3 de tipo rotatorio o de boquilla.

Un filtro absoluto de aire, consistiendo en un prefiltro, el cuerpo de filtro, realizado en acero inoxidable, y el filtro absoluto de aire, se emplea para tratamiento del aire de secado entrante para abastecerlo completamente limpio. El aparato entero es controlado desde un panel 9 de instrumentos.

15 Una solución en agua al 20% de rHA estéril, libre de sustancias pirógenas, (adecuado para inyección) se bombea a la boquilla de un atomizador, provisto de boquilla para dos fluidos, montada en la unidad comercial de secado por spray descrita anteriormente. La velocidad de la bomba peristáltica se mantuvo a una tasa aproximadamente de 10 ml/minuto de forma que con una temperatura de entrada del aire de 220°C, la temperatura de salida del aire se mantuvo a 95°C.

20 Se suministró aire comprimido a la boquilla atomizadora para dos fluidos a una presión de 2,0-6,0 bar (2,0-6,0 x 10⁵ Pa). En este intervalo, se obtienen microesferas con un tamaño promedio de 4,25-6,2 µm.

Típicamente, un aumento en el tamaño promedio de partículas (por presión reducida de atomización) llevó a un aumento en la cantidad de microesferas con un tamaño superior a 10 µm (véase Tabla 1).

TABLA 1

EFFECTO DE LA PRESIÓN DE ATOMIZACIÓN SOBRE LA FRECUENCIA DE LAS MICROESFERAS CON DIÁMETRO SUPERIOR A 10 µM

25

Presión de atomización, (x 105 Pa)	Frecuencia de superiores a 10 µm, %
6,0	0,8
5,0	3,0
3,5	6,6
2,5	8,6
2,0	13,1

30 En el segundo paso del proceso, se calentaron 5 g de microesferas en un beaker, usando un horno Gallenkamp. Un calentamiento durante 1 hora a una temperatura de 175°C era suficiente para proporcionar microesferas con 100% de fijación, determinado por HPLC (por las siglas de su expresión inglesa, High Pressure Liquid Chromatography). El efecto de esta fijación por calentamiento fue el aumento *in vitro* de la vida media ecogénica desde unos segundo hasta más de 30 minutos. Alterando la temperatura y duración de la incubación es posible variar el grado de fijación entre aproximadamente 5% y 100%. Los ejemplos de los perfiles de fijación por calentamiento al variar las temperaturas se muestran en la Figura 2.

35 A continuación de la fijación por calentamiento, las microesferas fueron deaglomeradas y dispersadas en agua en una de las dos maneras. El Método 1 involucraba primero la mezcla de las esferas, fijadas por calor, con un peso igual de lactosa finamente molida (diámetro promedio 5 µm). La mezcla se pasó luego a través de un molino centrífugo Fritsch con una pantalla de 0,5 mM y un rotor de dientes 12. Las esferas molidas se recolectaban y se pasaban a través del molino una segunda vez para asegurar que había ocurrido un mezclado completo. El polvo molido era luego resuspendido en agua que contenía 1 mg.ml⁻¹ de Pluronic F68. Típicamente, se agregaban 10 g de microesferas y lactosa a 100 ml de agua. El Método 2 para la deaglomeración involucraba la adición de 5 g de las microesferas fijadas por calentamiento a 100 ml de agua que contenía 100 mg de Pluronic F68. Las microesferas se dispersaron usando un homogenizador Silverson (modelo L4R con una sonda tubular de homogenización de 2,54 centímetro y una pantalla de alto factor de esquila) y se homogenizaba la dispersión durante 60 segundos.

45 Las esferas resuspendidas fueron separadas en intactas (que contenían gas) y esferas rotas, usando una técnica de flotación. Las esferas que contenían gas fueron vistas flotar sobre la superficie durante un período de 1 hora y se decantaron de la fracción que se hundió, que no contenían el gas requerido.

El proceso de separación puede acelerarse por centrifugación. Unos 30 segundos de centrifugación a 5000 x g es suficiente para separar las dos fracciones.

5 A continuación de la separación, las microesferas intactas se deshidrataron por congelación en presencia de lactosa y Pluronic F68. Las condiciones óptimas para la deshidratación por congelación involucraban la resuspensión de 30 mg de microesferas en 5 ml de agua que contenía 50 mg de lactosa y 5 mg de Pluronic F68. Las microesferas deshidratadas por congelación pueden ser redispersadas en un líquido (es decir, agua o solución salina) para dar una distribución monodispersa.

EJEMPLO PREPARATIVO GENERAL 2

10 El proceso del Ejemplo 1 fue repetido, pero con las siguientes diferencias en el primer paso: se usó un atomizador centrífugo, en lugar de una boquilla para dos fluidos; la temperatura de entrada fue 150°C (con la temperatura del aire de salida todavía manteniéndose a 105°C); y se suministró aire comprimido a la boquilla a $1,0-6,0 \times 10^5$ Pa. La rueda giró a 20-40,000 rpm y proporcionó las gotas, y como consecuencia las microesferas, con un diámetro promedio numérico en el intervalo de 1,0-8,0 μm .

EJEMPLO PREPARATIVO GENERAL 3

15 El segundo paso del proceso del Ejemplo 1 o del 2 fue variado como sigue. Una alícuota pequeña de las microesferas (0,5 g) fue calentada en un horno de microonda que recibió 300-350 vatios horas de calor por microondas a 2500 MHz. Ésto dio microesferas en las que un 90-95% de la rHA monomérica resultó insoluble (determinada por cromatografía de permeación en gel) y, como resultado de esta fijación por calentamiento, su vida media ecogénica *in vitro* aumentó de unos segundos a más de 30 minutos.

EJEMPLO PREPARATIVO GENERAL 4

20 El segundo paso del proceso de Ejemplo 1 o 2 fue variado como sigue. Una alícuota pequeña de las microesferas (0,5 g) se selló en atmósfera de argón en un vial de vidrio. El vial se enfrió a 4°C y luego se irradió con una fuente de ^{60}Co de radiación gamma para proporcionar una dosis 15,0 kGy de rayos gamma. La irradiación provocó la formación de microesferas, en las que un 10-15% de la albúmina monomérica era insoluble.

EJEMPLO PREPARATIVO GENERAL 5

25 El segundo paso del proceso del Ejemplo 1 o del 2 fue variado como sigue. Una alícuota pequeña de las microesferas (0,5 g) se selló en atmósfera de argón en un vial de vidrio. El vial se enfrió a 4°C y luego se irradió con una fuente de ^{60}Co de radiación gamma para proporcionar una dosis 50,0 kGy de rayos gamma a las microesferas. A continuación de la irradiación, las microesferas se incubaron en oxígeno a 50°C durante 6 horas. La irradiación producía la formación de microesferas en las que 50-60% del rHA monomérica era insoluble.

EJEMPLO PREPARATIVO GENERAL 6

30 El segundo paso del proceso del Ejemplo 1 o del 2 fue variado como sigue:

35 Una alícuota pequeña de microesferas (0,5 g) se resuspendió en 5 ml de etanol, cloroformo o cloruro de metileno que contenían a) 1,5% de glutaraldehído, b) 2,0% de cloruro de diftalóilo o c) 5,0% de formaldehído. Las microesferas se agitaron durante tiempos diferentes desde 10 minutos hasta 3 horas. Las microesferas se retiraron por filtración y se lavaron completamente en el búfer orgánico original que contenía 5% de etanolamina para retirar el exceso del agente de reticulación. Finalmente, las microesferas se lavaron en el solvente orgánico y se secaron al vacío para retirar cualquier solvente residual. La magnitud de insolubilización puede variarse entre 5-100% por este método que resulta en la extensión de la vida media ecogénica *in vitro* desde 1-2 minutos hasta más de una hora.

EJEMPLO PREPARATIVO GENERAL 7

40 Pueden combinarse los dos pasos independientes de formación de las microesferas e insolubilización de la corteza en un solo proceso. En este ejemplo, la formación de las microesferas y la insolubilización del material polimérico se logran simultáneamente durante el proceso del secado por spray.

45 Una solución de rHA se alimentó por la bomba peristáltica a una cámara pequeña de reacción, con una línea separada de alimentación que proporciona una solución al 5% del agente conveniente de reticulación, por ejemplo, glutaraldehído, cloruro de diftalóilo o formaldehído. El tiempo de residencia en la cámara de reacción era tal que fue lograda la formación del aducto inicial entre el agente de reticulación y la proteína, pero fue prevenida la reticulación intraproteína. La salida de la vasija de reacción se dispuso directamente en los atomizadores de boquillas para dos fluidos montados en una unidad de secado por spray especialmente adaptada, capaz de manejar solventes volátiles. Las condiciones de secado por spray fueron como se precisó en el Ejemplo 1. Las microesferas se incubaron en seco a temperatura ambiente para permitir que tenga lugar la reticulación intraproteína y luego se suspendieron en etanol que contenía 5% de etanolamina para extinguir cualquier agente de reticulación remanente. Fue realizado el lavado completo de las microesferas y finalmente las microesferas fueron secadas al vacío para retirar el solvente residual.

EJEMPLO PREPARATIVO GENERAL 8: ENSAYO DE RHA MONOMÉRICA LIBRE EN MICROESFERAS

50 Un volumen de 1ml de etanol se agregó a 100 mg de microesferas en una botella de vidrio de 20 ml y se sometieron al ultrasonido durante 30 segundos. A esta suspensión se le agregaron 19 ml de H₂O.

La mezcla se centrifugó en una Microfuge de banco (Gilson) durante 20 segundos y se ensayó la fracción transparente. El ensayo se realizó cargando automáticamente 50 ml de la fracción dentro de un cromatógrafo líquido Shimadzu LC6A HPLC y se cromatografió en una columna TSK de permeación por gel a una velocidad de flujo de $1 \text{ ml} \cdot \text{minuto}^{-1}$, usando un búfer de fosfato de sodio (pH 7,0).

5 Se grabaron las alturas máximas que representan el monómero de rHA y se determinó la concentración del monómero, usando una curva normalizada entre 1 y $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ monómeros de rHA.

El % de rHA monomérica libre se calculó midiendo la concentración del monómero en las microesferas fijadas y representando este valor como un porcentaje de la concentración del monómero en las microesferas sin fijar. Los resultados se dan en la Figura 2.

10 Calentar en un horno (como está descrito en el Ejemplo 1) las microesferas secadas por spray resulta en una disminución de la cantidad de monómero que se puede detectar (véase la Figura 2). Esta disminución de la rHA monomérica detectable es debida a la desnaturalización y reticulación de la rHA monomérica a polímeros insolubles que no se pueden ensayar por el método mencionado de HPLC.

15 Usando el método de HPLC para evaluar los niveles de verificación de la rHA, queda claro de la Figura 2 que después de una incubación de 15 minutos no hay presente ninguna rHA monomérica libre en las microesferas de rHA. Sin embargo todavía es posible reticular aún más las microesferas de rHA calentándolas durante períodos más largos.

Este calentamiento prolongado resultó en un nivel incrementado de reticulación de las microesferas que a su vez produce microesferas de resistencia creciente que son correspondientemente de una mayor resistencia a la presión.

20 Por el control cuidadoso de la temperatura y del tiempo de incubación, es posible producir microesferas con un intervalo controlado de reticulación (y de su resistencia a la presión y velocidad de biodegradación).

EJEMPLO PREPARATIVO GENERAL 9: EFECTOS DEL TIEMPO DE INCUBACIÓN A 175°C SOBRE LA RESISTENCIA FRENTE A LA PRESIÓN DE LAS MICROESFERAS DE RHA

Un lote de microesferas de rHA del paso inicial de secado por spray del proceso fue dividido en alícuotas de 5 g y calentado a 175°C para diferentes duraciones de tiempo como se ha mostrado en la Figura 3.

25 A continuación de la fijación por calentamiento, fue determinada la cantidad de monómero libre tal como se ha descrito en el Ejemplo 8. Para cada una de las incubaciones mostradas, no se encontró ninguna rHA monomérica detectable.

30 Las microesferas fijadas por calor se desagregaron usando un molino centrífugo Fritsch (como se ha descrito anteriormente) y las microesferas intactas, conteniendo aire, se recuperaron por la técnica de flotación ya mencionada. Las microesferas recuperadas fueron suspendidas en H_2O conteniendo Pluronic F68 ($1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) a una concentración de $0,5 \times 10^8$ cápsulas $\cdot \text{ml}^{-1}$.

Las microesferas conteniendo aire se resuspendieron y se sometieron a una presión atmosférica aumentada, aplicando la presión con una jeringa de 50 ml, mientras que se contenía esta suspensión en un recipiente cerrado (recipiente de poliestireno de 25 ml).

35 Para cada una de las presiones evaluadas, la suspensión individual de microesferas se presurizó a la presión seleccionada y se mantuvo a esta presión durante 5 segundos antes de liberar la presión. Para cada suspensión analizada el aumento de presión se realizó 3 veces. La presión en el recipiente cerrado se evaluó por un manómetro portátil RS.

40 A continuación de la presurización, las suspensiones de las microesferas se evaluaron por microscopía visible y análisis de imagen y se evaluó el % de microesferas conteniendo aire respecto a las que no contenían aire. Este análisis se realiza ya que sólo las microesferas conteniendo aire son funcionales en la mejora del contraste ecográfico del ultrasonido.

Como puede verse en la Figura 3, las microesferas que fueron fijadas durante 60 minutos a 175°C, como se ha descrito en el Ejemplo 1, son estables a todas las presiones a las que se sometieron en este experimento.

45 Por el control cuidadoso de la duración de la incubación a esta temperatura particular (175°C) es posible producir lotes de microesferas con diferentes grados de reticulación, las que a su vez son resistentes a diferentes grados de incremento de la presión.

50 Usando este control cuidadoso de reticulación por el ajuste de la duración y de la temperatura de incubación es posible producir lotes de microesferas conteniendo aire diseñadas para resistir a un aumento de presión designado específicamente.

La temperatura usada para reticular las microesferas pueden variar infinitamente, como también lo puede la duración del tiempo de incubación.

EJEMPLO PREPARATIVO GENERAL 10: CLASIFICACIÓN DE MICROESFERAS

5 Una ventaja del proceso de la presente invención es que permite controlar el tamaño promedio y distribución del tamaño de las microesferas. Sin embargo, se pueden seleccionar los tamaños aún más deseados si se desea, por ejemplo por flotación. En una dispersión homogénea de microesferas, las partículas mayores subirán más rápidamente a la superficie, que las partículas menores, debido a la inferior densidad (más aire encapsulado) de las partículas mayores. Así que cuando se permite que la dispersión esté en reposo, la distribución del tamaño de partículas cambiará en cualquier nivel de la solución con respecto al tiempo.

10 Se dispersaron las microesferas en 2000 ml de solución acuosa que contenía 6% p/v de cloruro de sodio y 0,1% p/v de Pluronic F68 en una botella de vidrio que presenta una columna líquida de aproximadamente 165 mm. Un tubo de muestreo se colocó a 50 mm por debajo de la superficie superior del líquido para permitir la retirada de muestras a determinados intervalos de tiempo.

Al variar el tiempo de reposo y la concentración del cloruro de sodio, fue posible producir una variedad de distribuciones de tamaño de partículas y clasificar las microesferas por debajo de 2 μm .

15 Otras técnicas vía húmeda para la clasificación incluyen cromatografía hidrodinámica y fraccionamiento por flujo de campo. Las "Técnicas vía Seca", que usan los principios de elutriación y separación por flujo transversal, están comercialmente disponibles en forma de los aparatos clasificadores Microsplit (British Rem.), Zigzag (Alpine) y Turbo (Nissuin). El clasificador de codo a chorro producido por Nitetsu Mining Co usa un principio diferente (Efecto Coanda) que también podría lograr buenos resultados en la clasificación de microesferas.

EJEMPLO PREPARATIVO GENERAL 11

20 Una solución de albúmina humana (5% p/v) fue secada por spray a una temperatura de entrada de 220°C y una presión atmosférica de 1,5 bar como en el Ejemplo Preparativo General 1. Las partículas resultantes son fijadas por calor durante un período de 20 minutos a 175°C en un horno de aire. Las muestras fueron deaglomeradas moliendo con manitol, y las partículas fueron resuspendidas en una solución de 10 mg/ml de manitol y 0,06 mg/ml de Pluronic F68. Las partículas intactas se volvieron cremosas y se recogieron; la suspensión de microesferas se deshidrató por congelación.

25 Se produjeron partículas predominantemente de 10-20 μm que contenían aire y eran sustancialmente resistentes a la presión.

EJEMPLO PREPARATIVO GENERAL 12

30 Fue resuspendida polilisina a una concentración de 5% p/v con las microesferas del Ejemplo Preparativo General 2 (100 x 10⁶ partículas/ml) y se incubaron toda la noche a 20°C. Se les agregaron manitol y Pluronic F68 a la concentración descrita en el Ejemplo Específico 1 y a continuación la suspensión se sometió a congelación instantánea y se deshidrató por congelación.

EJEMPLO ESPECÍFICO 1

35 Ácido hialurónico a una concentración de 5% p/v se incubó durante toda la noche con microesferas resuspendidas, preparadas como en el Ejemplo Preparativo General 1 a 20°C (100 x 10⁶ microesferas/ml). Se agregaron manitol y Pluronic F68, a una concentración de 10 y 0,06 mg/ml respectivamente, y la suspensión luego se sometió a congelación instantánea y se deshidrató por congelación.

EJEMPLO PREPARATIVO GENERAL 13

40 Las microesferas fueron resuspendidas según el Ejemplo Preparativo General 3 en una solución de DMF (Dimetilformamida) a una concentración de 100 x 10⁶ partículas/ml. Fue agregado anhídrido acético para dar una concentración final del anhídrido ácido de 100 mg/ml. La mezcla de microesferas se incubó luego a 20°C durante 1 hora, diluida con agua y se filtró y lavó con agua en exceso sobre un período de 1 hora. Las microesferas se formularon en Manitol y Pluronic F68 como se ha descrito anteriormente. Este método imparte carga negativas.

EJEMPLO PREPARATIVO GENERAL 14

45 Las microesferas fueron resuspendidas según el Ejemplo Preparativo General 1 en una solución acuosa en una concentración de 100 x 10⁶ partículas/ml. Se agregó una solución acuosa de carbodimida a la suspensión de las microesferas para dar una concentración final de 100 mg/ml. Después de una incubación durante 16 horas a 20°C, el exceso de reactivo se eliminó por adición de glicina a una concentración equivalente, y se realizó una incubación adicional durante 16 horas a 20°C. Las microesferas se lavaron luego con agua formulada como se ha descrito anteriormente. Este procedimiento elimina las carga negativas.

50 EJEMPLO PREPARATIVO GENERAL 15

Se agregó Poli-L-lisina (15-25 kDa) a la alimentación de rHA (20% p/v) para una concentración final de 0,5% p/v antes del secado en spray. Fue seguido el método del Ejemplo General 2 para obtener en la corteza de las microcápsulas un incremento de carga positiva.

EJEMPLO PREPARATIVO GENERAL 16

Se agregó Poli-L-glutamato (15-30 kDa) a la alimentación de rHA (20% p/v) para una concentración final de 0,5% p/v antes del secado en spray. Fue seguido el método del Ejemplo Preparativo General 2 para obtener en la corteza de las microcápsulas un incremento de carga negativa.

5 EJEMPLO PREPARATIVO GENERAL 17

Las microesferas del Ejemplo Preparativo General 11 pueden usarse en un análisis *in vivo* para establecer la viabilidad de delinear territorios de perfusión en el miocardio de un corazón de cerdo.

10 Un cerdo Yorkshire de 25 kg se anestesió y se ventiló totalmente según la metodología perfilada en Ten Cate *et al* (1992) *Cardiovascular Research* 26, 32-39. A 5. Se insertó un catéter 5 French vía la arteria femoral, aorta ascendente y raíz aórtica dentro del ventrículo izquierdo. Se realizó una inyección de 4 millones de microcápsulas del Ejemplo Específico 1, y para evaluar la perfusión regional se usó la ecocardiografía transtorácica bidimensional en el plano del eje corto usando un Hewlett Packard sono 1000, provisto con un transductor de 3,5 MHz. Fue observada una opacificación intensa del miocardio (véase la Figura 5), mostrando que no ocurrió ninguna redistribución de microcápsulas huecas sobre un período de 2 horas. Las inyecciones posteriores de microcápsulas en el ventrículo izquierdo produjeron una aclaración secuencial del miocardio, dependiente de las dosis. Se supervisaron los parámetros hemodinámicos y éstos no mostraron ningún efecto adverso de la inyección a estos bajos niveles de microcápsulas.

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un proceso de preparación de microcápsulas, el proceso comprendiendo atomizar una solución o dispersión de al menos un material para formación de pared en un portador líquido dentro de un gas para obtener microcápsulas por evaporación de dicho portador líquido, en donde el material para formación de pared comprende ácido hialurónico.
2. Microcápsulas de las cuales al menos 90% son de 1,0 a 10,0 en diámetro, las paredes de las microcápsulas comprendiendo ácido hialurónico.
3. Una preparación estéril, libre de pirógenos, de microcápsulas según la Reivindicación 2 o microcápsulas hechas por el proceso de la Reivindicación 1.
- 10 4. Microcápsulas según la Reivindicación 2 o hechas por el proceso de la Reivindicación 1 para uso en medicina.
5. Microcápsulas según la Reivindicación 2 o hechas por el proceso de la Reivindicación 1 en la preparación de un agente diagnóstico de contraste.
- 15 6. Un método de generar una imagen para subsiguiente inspección, comprendiendo (a) inyectar en el cuerpo de un mamífero microcápsulas según la Reivindicación 2 o hechas por el proceso de la Reivindicación 1, (b) someter el mamífero o parte del mismo a una radiación ultrasónica adecuada y (c) detectar radiación ultrasónica reflejada, transmitida, resonada o modulada en frecuencia por dichas microcápsulas.

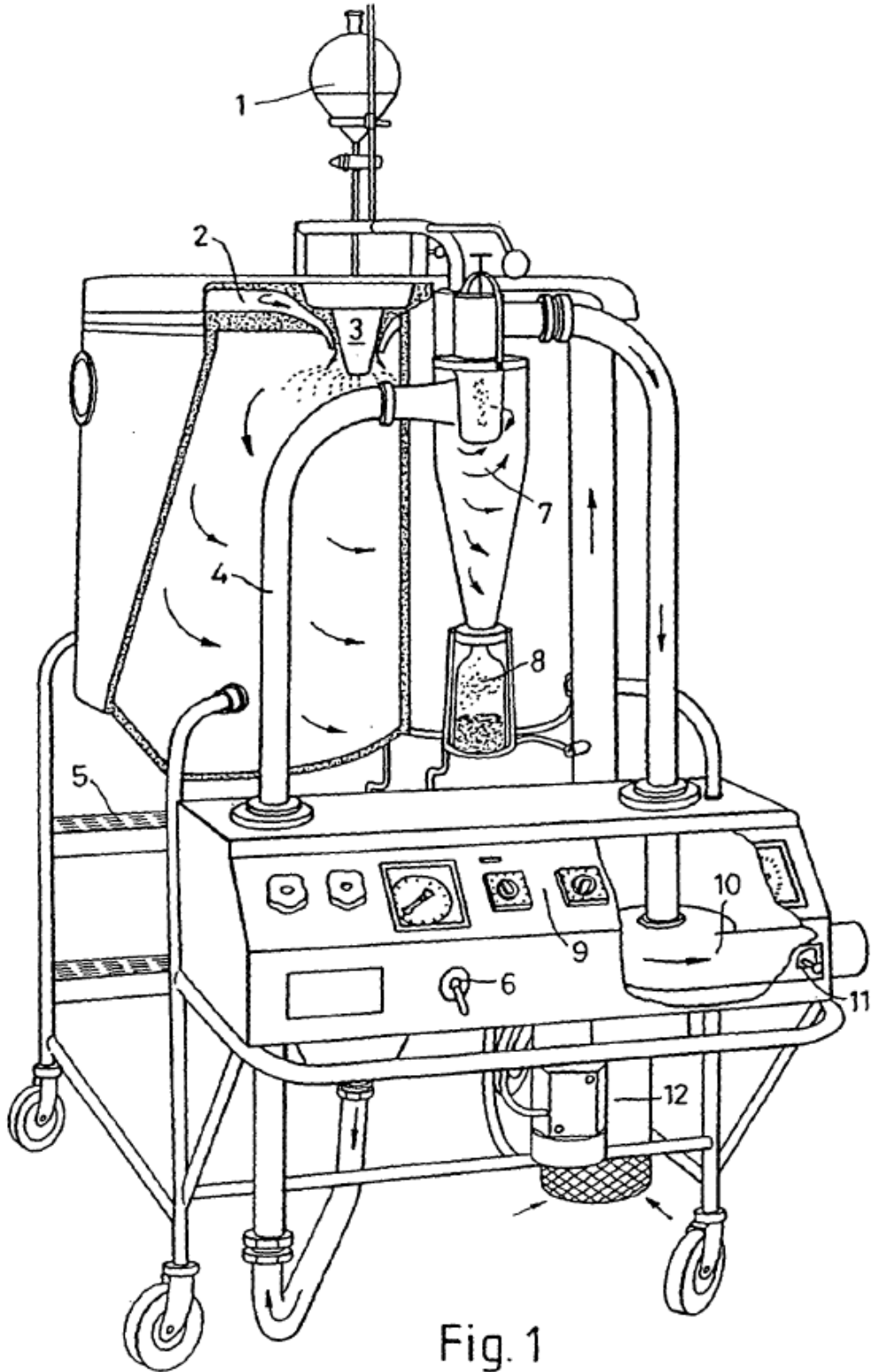
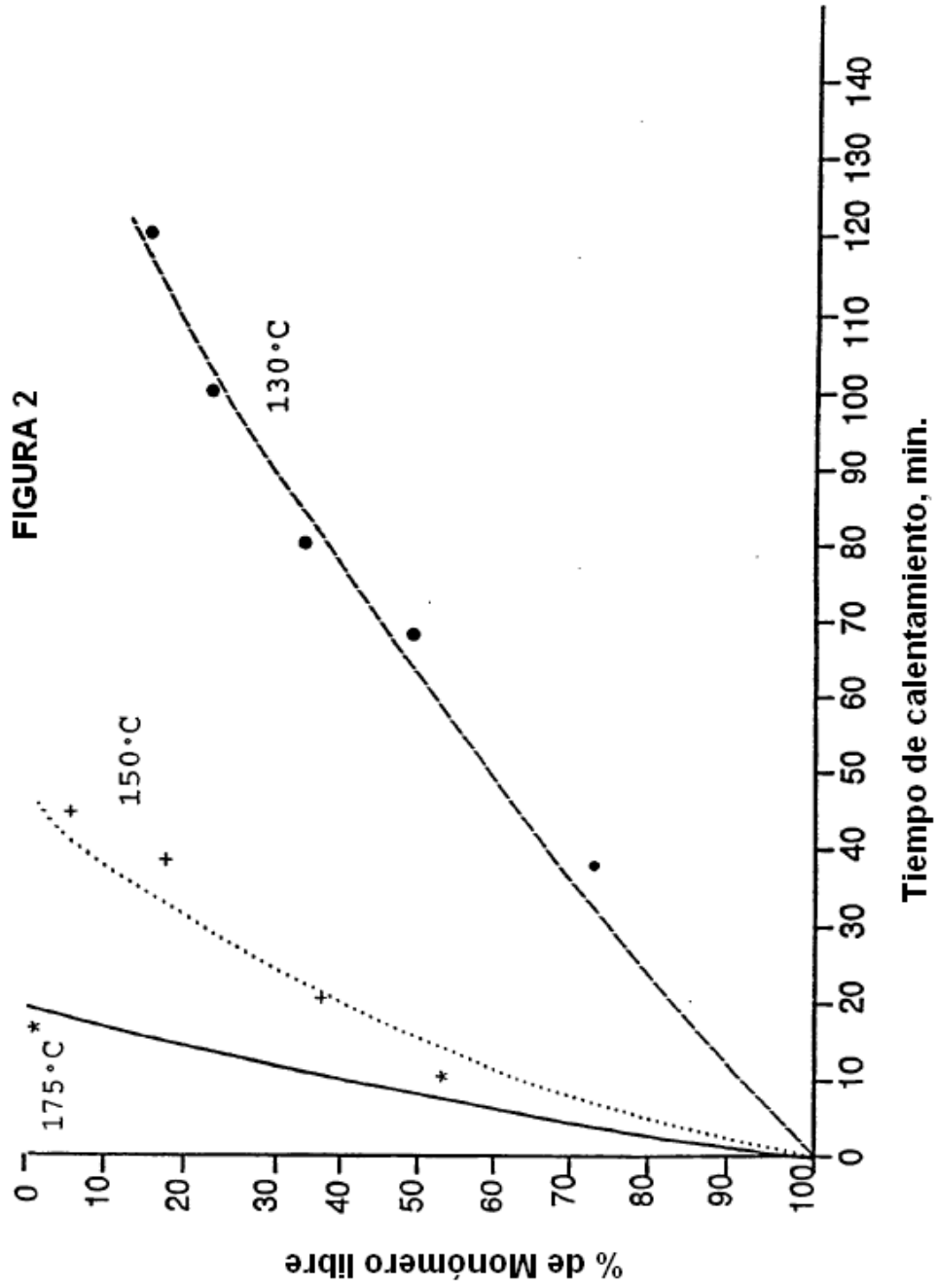


Fig. 1



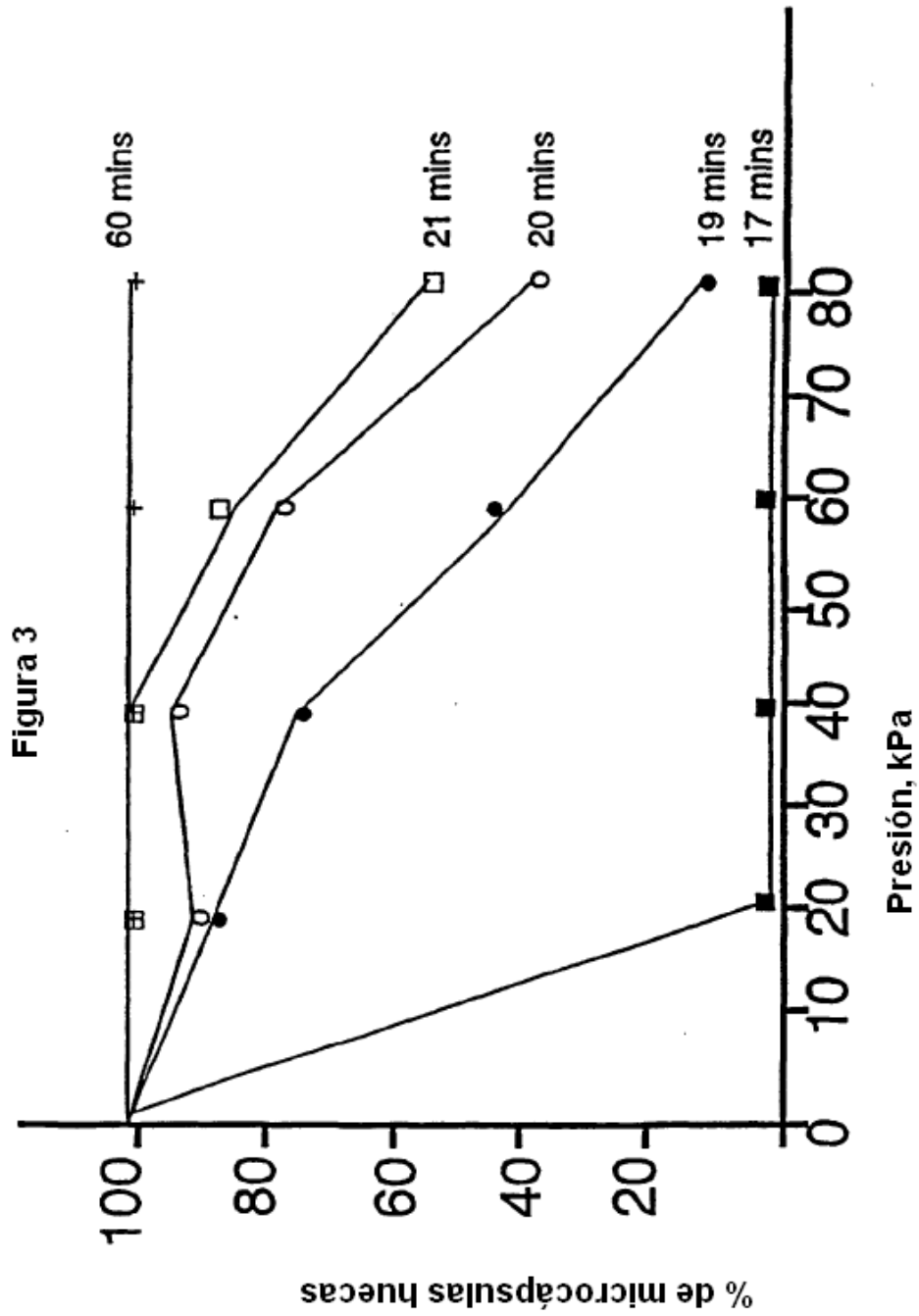


Figura 4

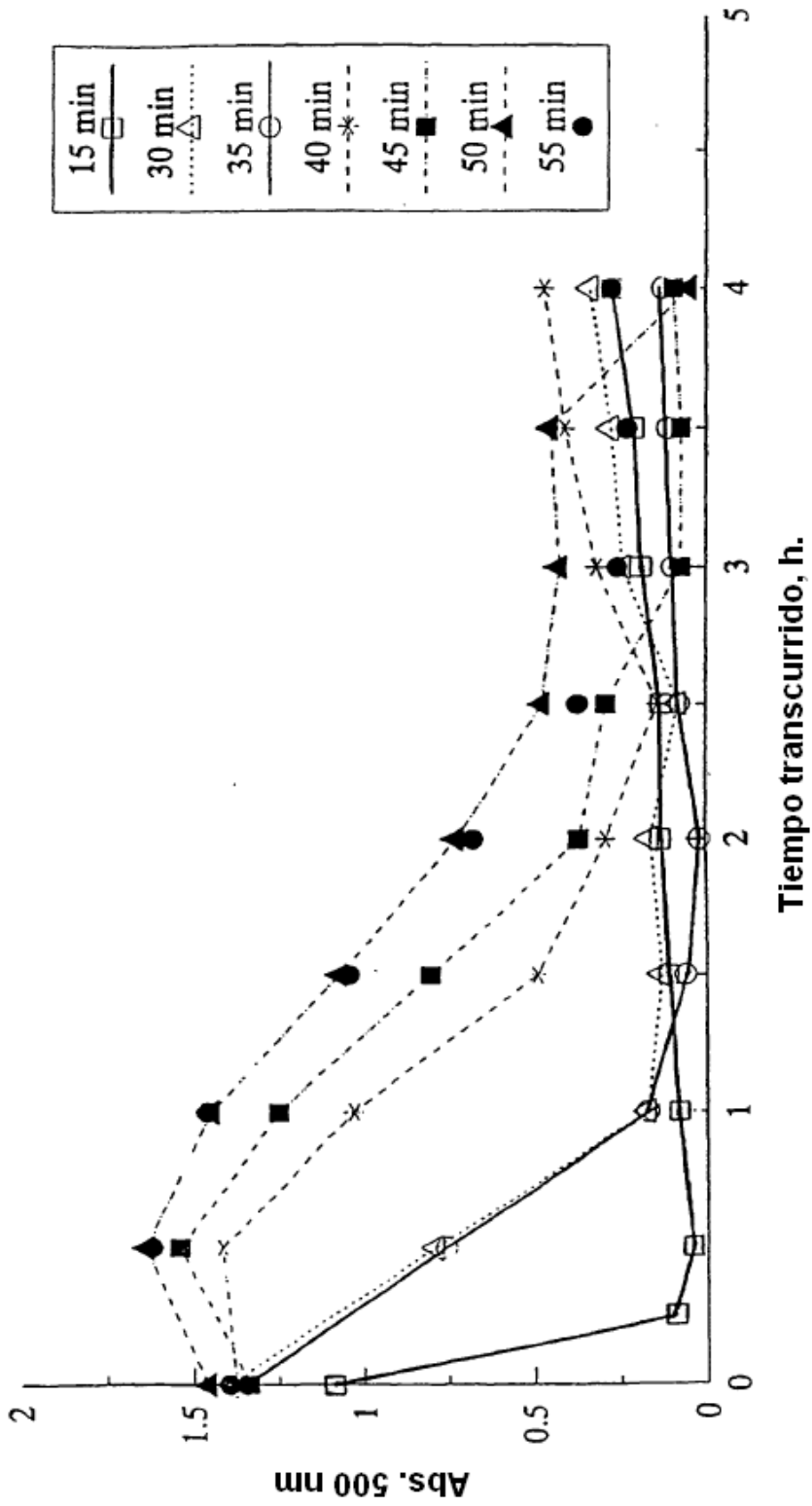


FIGURA 5A

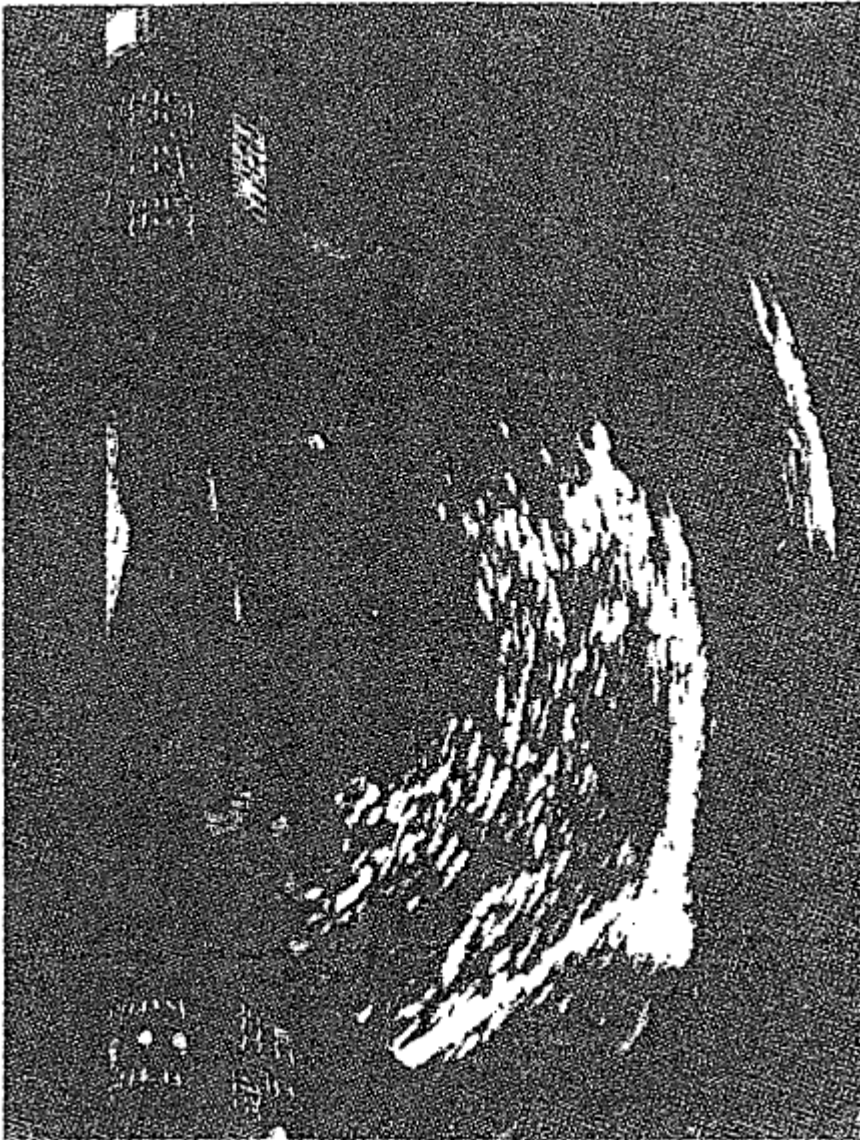


FIGURA 5B

