

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290663** (13) **A2**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.05.31

(51) Int. Cl. *A61K 49/22* (2006.01)
A61K 49/18 (2006.01)
A61K 49/08 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2015.12.28

(54) **КОМПОЗИЦИИ МИКРОСФЕР С ИНКАПСУЛИРОВАННЫМ В ЛИПИДЕ ГАЗОМ И
СООТВЕТСТВУЮЩИЕ СПОСОБЫ**

(31) 62/098,453

(32) 2014.12.31

(33) US

(62) 201791437; 2015.12.28

(71) Заявитель:
ЛАНТЕУС МЕДИКАЛ ИМЭДЖИНГ,
ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Робинсон Саймон П., Сиглер
Роберт У., Онтанк Дэвид С., Нгуен
Нунг Туйет (US)

(74) Представитель:

Костюшенкова М.Ю., Угрюмов В.М.,
Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина Е.М.,
Строкова О.В., Христофоров А.А.,
Джермакян Р.В., Парамонова К.В.
(RU)

(57) Изобретение относится, *inter alia*, к улучшенным липидным составам, используемым для создания микросфер с инкапсулированным в липиде газом, а также к способам их применения.

202290663

A2

A2

202290663

КОМПОЗИЦИИ МИКРОСФЕР С ИНКАПСУЛИРОВАННЫМ В ЛИПИДЕ ГАЗОМ И СООТВЕТСТВУЮЩИЕ СПОСОБЫ

ОПИСАНИЕ

Ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет согласно 35 U.S.C. § 119(e) в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США с серийным № 62/098453, поданной 31 декабря 2014 года, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится, отчасти, к новым и улучшенным составам для получения ультразвуковых контрастных средств, а также к препаратам этих ультразвуковых контрастных средств. Такие составы являются менее сложными по своей композиции, способу их изготовления и способу их применения и, что удивительно, более надежны, чем известные в уровне техники составы, используемые для получения ультразвуковых контрастных средств, в том числе более стабильны при комнатной температуре в течение длительных периодов времени. Такие составы могут быть использованы для получения ультразвуковых контрастных средств, что удивительно, без сложной манипуляции.

В настоящем документе представлены эти новые составы, наборы, содержащие эти новые составы, способы применения этих составов, в том числе способы применения этих составов для получения ультразвуковых контрастных средств, а также композиции или препараты самих микросфер с инкапсулированным в липиде газом. Такие новые составы включают в себя неводные смеси, описываемые более подробно в настоящем документе.

Согласно одному аспекту в настоящем документе представлена композиция, состоящая из или состоящая преимущественно из неводной смеси DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE в пропиленгликоле с глицерином и буфере.

Согласно другому аспекту в настоящем документе представлена композиция, состоящая из или состоящая преимущественно из неводной смеси DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE в пропиленгликоле и буфере.

Согласно другому аспекту в настоящем документе представлена композиция, состоящая из или состоящая преимущественно из неводной смеси DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE в глицерине и буфере.

Буфером может быть без ограничения ацетатный буфер (например, комбинация натрия ацетата и уксусной кислоты), или бензоатный буфер (например, комбинация натрия бензоата и бензойной кислоты), или салицилатный буфер (например, комбинация натрия салицилата и салициловой кислоты).

Вышеупомянутые композиции могут быть представлены в стерильном контейнере, необязательно с перфторуглеродным газом и, кроме того, необязательно с инструкциями по применению, в том числе с инструкциями по активации таких композиций в присутствии перфторуглеродного газа и необязательно в присутствии водного разбавителя с целью создания микросфер с инкапсулированным в липиде газом. Композиция, подлежащая активации, может содержать водный разбавитель в качестве второй фазы и, таким образом может быть неомогенной перед активацией.

Согласно другому аспекту в настоящем документе представлена композиция, содержащая неводную смесь DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE в пропиленгликоле и глицерине и перфторуглеродный газ.

Согласно некоторым вариантам осуществления массовое отношение (масса/масса/масса) DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE (объединенных) к пропиленгликолю к глицерину находится в диапазоне от приблизительно 1:50:50 до приблизительно 1:1000:1000 или от приблизительно 1:100:100 до приблизительно 1:600:700. Согласно некоторым вариантам осуществления отношение масса/масса/масса DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE (объединенных) к пропиленгликолю к глицерину составляет от приблизительно 1:120:120 до приблизительно 1:400:400, или от приблизительно 1:120:120 до приблизительно 1:300:300, или от приблизительно 1:120:120 до приблизительно 1:250:250. Согласно некоторым вариантам осуществления отношение масса/масса/масса DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE (объединенных) к пропиленгликолю к глицерину составляет от приблизительно 1:100:150 до приблизительно 1:150:200. Согласно некоторым вариантам осуществления отношение масса/масса/масса DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE (объединенных) к пропиленгликолю к глицерину составляет от приблизительно 1:250:300 до приблизительно 1:300:350.

Согласно некоторым вариантам осуществления отношение масса/масса/масса DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE (объединенных) к пропиленгликолю к глицерину составляет от приблизительно 1:500:600 до приблизительно 1:600:700. Согласно некоторым вариантам осуществления отношение масса/масса/масса DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE (объединенных) к пропиленгликолю к глицерину составляет приблизительно 1:138:168, или приблизительно 1:276:336, или приблизительно 1:552:673.

Согласно некоторым вариантам осуществления отношение масса/масса/масса DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE (объединенных) к пропиленгликолю к глицерину составляет приблизительно 0,75 мг:103,5 мг:126,2 мг. Согласно некоторым вариантам осуществления отношение масса/масса/масса DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE (объединенных) к пропиленгликолю к глицерину составляет приблизительно 0,375 мг:103,5 мг:126,2 мг. Согласно некоторым вариантам осуществления отношение масса/масса/масса DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE (объединенных) к пропиленгликолю к глицерину составляет приблизительно 0,1875 мг:103,5 мг:126,2 мг.

Согласно другому аспекту в настоящем документе представлена композиция, содержащая неводную смесь DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE в пропиленгликоле и перфторуглеродный газ.

Согласно некоторым вариантам осуществления отношение масса/масса DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE (объединенных) к пропиленгликолю находится в диапазоне от приблизительно 1:10 до приблизительно 1:2000, или от приблизительно 1:10 до приблизительно 1:1500, или от приблизительно 1:10 до приблизительно 1:1000, или от приблизительно 1:20 до приблизительно 1:2000, или от приблизительно 1:50 до приблизительно 1:1000, или от приблизительно 1:50 до приблизительно 1:600, или от приблизительно 1:100 до приблизительно 1:600.

Согласно некоторым вариантам осуществления отношение масса/масса DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE (объединенных) к пропиленгликолю составляет от приблизительно 1:100 до приблизительно 1:200 или от приблизительно 1:100 до приблизительно 1:150. Согласно некоторым вариантам осуществления отношение масса/масса DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE (объединенных) к пропиленгликолю составляет от приблизительно 1:200 до приблизительно 1:350 или от приблизительно 1:250 до приблизительно 1:300. Согласно некоторым вариантам осуществления отношение масса/масса DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE (объединенных) к пропиленгликолю составляет от приблизительно 1:500 до приблизительно 1:600 или приблизительно 1:525 до приблизительно 1:575. Согласно некоторым вариантам

осуществления отношение масса/масса DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE (объединенных) к пропиленгликолю составляет приблизительно 1:138, или приблизительно 1:276, или приблизительно 1:552.

Согласно некоторым вариантам осуществления отношение масса/масса DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE (объединенных) к пропиленгликолю составляет приблизительно 0,75 мг:103,5 мг, или приблизительно 0,375 мг:103,5 мг, или приблизительно 0,1875 мг:103,5 мг.

Согласно другому аспекту в настоящем документе представлена композиция, содержащая неводную смесь DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE в глицерине и перфторуглеродный газ.

Согласно некоторым вариантам осуществления отношение масса/масса DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE (объединенных) к глицерину находится в диапазоне от приблизительно 1:10 до приблизительно 1:2000, или от приблизительно 1:15 до приблизительно 1:1500, или от приблизительно 1:50 до приблизительно 1:1000, или от приблизительно 1:50 до приблизительно 1:7000, или от приблизительно 1:100 до приблизительно 1:700. Согласно некоторым вариантам осуществления отношение масса/масса DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE (объединенных) к глицерину составляет от приблизительно 1:100 до приблизительно 1:200 или от приблизительно 1:125 до приблизительно 1:175. Согласно некоторым вариантам осуществления отношение масса/масса DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE (объединенных) к глицерину составляет от приблизительно 1:250 до приблизительно 1:400 или от приблизительно 1:300 до приблизительно 1:350. Согласно некоторым вариантам осуществления отношение масса/масса DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE (объединенных) к глицерину составляет от приблизительно 1:550 до приблизительно 1:700 или от приблизительно 1:650 до приблизительно 1:700. Согласно некоторым вариантам осуществления отношение масса/масса DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE (объединенных) к глицерину составляет приблизительно 1:168, или приблизительно 1:336, или приблизительно 1:673.

Согласно некоторым вариантам осуществления отношение масса/масса DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE (объединенных) к глицерину составляет приблизительно 0,75 мг:126,2 мг, или приблизительно 0,375 мг:126,2 мг, или приблизительно 0,1875 мг:126,2 мг.

Согласно другим аспектам в настоящем документе представлен контейнер, содержащий любую из вышеупомянутых композиций.

Согласно некоторым вариантам осуществления контейнером является однокамерный контейнер.

Согласно некоторым вариантам осуществления контейнер содержит первую и вторую камеры, и при этом неводная смесь находится в первой камере, а перфторуглеродный газ находится во второй камере.

Согласно другим аспектам в настоящем документе представлен контейнер, содержащий любую из вышеупомянутых композиций в первой камере и водный разбавитель во второй камере.

Согласно другим аспектам в настоящем документе представлен контейнер, содержащий любую из вышеупомянутых композиций и водный разбавитель, при этом неводная смесь представлена в первой камере, перфторуглеродный газ обеспечен во второй камере, а водный разбавитель представлен в третьей камере.

Согласно некоторым вариантам осуществления водным разбавителем является водный солевой раствор. Согласно некоторым вариантам осуществления водным разбавителем является водный буферный раствор. Согласно некоторым вариантам осуществления водным разбавителем является водный буферный солевой раствор.

Согласно другому аспекту в настоящем документе представлена композиция, содержащая смесь DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE в твердой форме и перфторуглеродный газ. Смесь DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE в твердой форме может быть смешанной твердой формой (например, относительно гомогенная смесь липидов), или она может быть комбинацией твердых форм каждого липида (например, которая может быть или может не быть гомогенной смесью липидов). Согласно другому аспекту в настоящем документе представлен контейнер, содержащий вышеупомянутую композицию в твердой форме. Согласно некоторым вариантам осуществления контейнером является контейнер, имеющий одну камеру. Согласно некоторым вариантам осуществления контейнером является контейнер, имеющий две камеры, при этом первая камера содержит DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE в твердой форме, а вторая камера содержит перфторуглеродный газ. Согласно некоторым вариантам осуществления контейнером является контейнер, имеющий две камеры, при этом первая камера содержит DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE в твердой форме и перфторуглеродный газ, а вторая камера содержит (a) пропиленгликоль, (b) пропиленгликоль и глицерин или (c) глицерин. Отношения масса/масса/масса объединенных липидов к пропиленгликолю и/или к глицерину могут быть такими, как указано выше. Согласно некоторым вариантам осуществления контейнером является

контейнер, имеющий три камеры, при этом первая камера содержит DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE в твердой форме, вторая камера содержит перфторуглеродный газ, а третья камера содержит (а) пропиленгликоль, (b) пропиленгликоль и глицерин или (с) глицерин. Согласно некоторым вариантам осуществления контейнером является контейнер, имеющий дополнительную камеру, содержащую водный разбавитель.

Согласно другому аспекту в настоящем документе представлена композиция, содержащая микросферы с инкапсулированным в липиде газом, содержащие DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE и перфторуглеродный газ, в неводном растворе, содержащем пропиленгликоль и глицерин.

Согласно другому аспекту в настоящем документе представлена композиция, содержащая микросферы с инкапсулированным в липиде газом, содержащие DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE, в неводном растворе, содержащем пропиленгликоль.

Согласно другому аспекту в настоящем документе представлена композиция, содержащая микросферы с инкапсулированным в липиде газом, содержащие DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE и перфторуглеродный газ, в неводном растворе, содержащем глицерин.

Согласно некоторым вариантам осуществления микросферы с инкапсулированным в липиде газом имеют средний диаметр, варьирующий от приблизительно 1,0 микрона до приблизительно 2,0 микрона. Согласно некоторым вариантам осуществления микросферы с инкапсулированным в липиде газом имеют средний диаметр, варьирующий от приблизительно 1,2 микрона до приблизительно 2,0 микрона. Согласно некоторым вариантам осуществления микросферы с инкапсулированным в липиде газом имеют средний диаметр от приблизительно 1,4 до 1,8 микрона.

Согласно некоторым вариантам осуществления микросферы с инкапсулированным в липиде газом представлены в композиции при концентрации более 10^8 /мл.

Далее следуют различные варианты осуществления, применимые в равной степени к вышеупомянутым композициям.

Согласно некоторым вариантам осуществления неводная смесь содержит менее 5% воды по массе (т.е. масса воды по отношению к массе комбинации липида и пропиленгликоля и/или глицерина). Согласно некоторым вариантам осуществления неводная смесь содержит 1-4% воды по массе. Согласно некоторым вариантам осуществления неводная смесь содержит менее 1% воды по массе.

Согласно некоторым вариантам осуществления композиция не содержит соль, что означает, что она может содержать противоионы к липидам в композиции, но не содержит других ионов. Липидные противоионы, как правило, представляют собой катионы, такие как катион натрия. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления композиция не содержит анионы. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция не содержит натрия хлорид. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция не содержит ионы хлорида.

Согласно некоторым вариантам осуществления композиция дополнительно содержит буфер. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция дополнительно содержит не являющийся фосфатным буфер. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция дополнительно содержит ацетатный буфер, или бензоатный буфер, или салицилатный буфер.

Согласно некоторым вариантам осуществления объединенные DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE представлены в концентрации от приблизительно 0,9 до приблизительно 8 мг липида на мл неводной смеси, от приблизительно 0,9 мг до приблизительно 7,5 мг липида на мл неводной смеси, от приблизительно 2 мг до приблизительно 7,5 мг липида на мл неводной смеси или от приблизительно 2 мг до приблизительно 4 мг липида на мл неводной смеси. Согласно некоторым вариантам осуществления объединенные DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE представлены в концентрации от приблизительно 0,94 мг до приблизительно 7,5 мг липида на мл неводной смеси или от приблизительно 1,875 мг до приблизительно 7,5 мг липида на мл неводной смеси, в том числе от приблизительно 1,875 мг до приблизительно 3,75 мг липида на мл неводной смеси и от приблизительно 3,75 до приблизительно 7,5 мг липида на мл неводной смеси. Согласно некоторым вариантам осуществления DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE представлены в отношении приблизительно 10:82:8 (мол. %).

Согласно некоторым вариантам осуществления неводная смесь, отдельно или в комбинации с перфторуглеродным газом, содержит менее 5% примесей при хранении при комнатной температуре в течение приблизительно 3 месяцев. Согласно некоторым вариантам осуществления неводная смесь, отдельно или в комбинации с перфторуглеродным газом, содержит меньшее количество примесей, чем DEFINITY[®], при хранении их при комнатной температуре (т.е. если композицию и DEFINITY[®] хранят при комнатной температуре).

Согласно некоторым вариантам осуществления перфторуглеродным газом является перфторпропановый газ.

Согласно некоторым вариантам осуществления PEG5000-DPPE представляет собой MPEG5000-DPPE.

Согласно некоторым вариантам осуществления композиция обеспечена во флаконе. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция обеспечена во флаконе с фактическим объемом, равным приблизительно 3,8 мл или меньше.

Согласно некоторым вариантам осуществления композиция обеспечена во флаконе с V-образным дном. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция обеспечена во флаконе с плоским дном. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция обеспечена во флаконе с закругленным дном. Согласно некоторым вариантам осуществления флаконом является стеклянный флакон. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция, содержащая неводную смесь объединенных DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE в пропиленгликоле с глицерином и перфторуглеродный газ, представлена в 2-мл флаконе Nipro (Wheaton) при концентрации липида приблизительно 3,75 мг/мл. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция, содержащая неводную смесь объединенных DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE в пропиленгликоле с глицерином и перфторуглеродный газ, представлена в 2-мл флаконе Schott при концентрации липида приблизительно 3,75 мг/мл.

Согласно некоторым вариантам осуществления композиция обеспечена в однокамерном контейнере. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция обеспечена в многокамерном контейнере. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция обеспечена в первой камере, а водный разбавитель обеспечен во второй камере. Водным разбавителем может быть солевой раствор, или он может не содержать солевой раствор. Водным разбавителем может быть буферный раствор, или он может не содержать буфер. Водным разбавителем может быть буферный солевой раствор.

Согласно другому аспекту в настоящем документе представлен набор, содержащий любую из вышеупомянутых композиций в контейнере. Согласно некоторым вариантам осуществления контейнером является однокамерный контейнер.

Согласно некоторым вариантам осуществления набор содержит второй контейнер. Согласно некоторым вариантам осуществления второй контейнер содержит водный разбавитель. Согласно некоторым вариантам осуществления вторым контейнером является предварительно заполненный шприц.

Согласно некоторым вариантам осуществления контейнером является многокамерный контейнер. Согласно некоторым вариантам осуществления первый контейнер содержит липиды (т.е. DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE) в твердой форме, а второй контейнер содержит пропиленгликоль, или глицерин, или пропиленгликоль и глицерин. Третий контейнер может содержать водный разбавитель.

Согласно некоторым вариантам осуществления первый контейнер содержит липиды в пропиленгликоле, а второй контейнер содержит глицерин или водный разбавитель. В качестве альтернативы, второй контейнер содержит глицерин, а третий контейнер содержит водный разбавитель.

Согласно некоторым вариантам осуществления первый контейнер содержит липиды в глицерине, а второй контейнер содержит пропиленгликоль или водный разбавитель. В качестве альтернативы, второй контейнер содержит пропиленгликоль, а третий контейнер содержит водный разбавитель.

Согласно некоторым вариантам осуществления первый контейнер содержит липиды в пропиленгликоле и глицерине, а второй контейнер содержит водный разбавитель.

Согласно некоторым вариантам осуществления набор, кроме того, содержит устройство для активации, такое как без ограничения устройство VIALMIX[®].

В соответствии с настоящим изобретением было обнаружено, что некоторые из неводных смесей (т.е. некоторые из этих модифицированных липидных составов) могут быть использованы для создания микросфер с инкапсулированным в липиде газом с помощью процесса, называемого в настоящем документе «активацией», либо в виде неводной смеси, либо после простого добавления водного разбавителя без учета степени гомогенности объединенного раствора. Это удивительно, поскольку некоторые имеющиеся на рынке контрастные средства получают путем активации предварительно составленной однофазной смеси, содержащей липиды в избыточном водном растворе. До настоящего изобретения не было известно, что инкапсулированные в липиде микросферы подходящего размера и количества могут быть созданы либо без предварительного составления липида в водном растворе, либо в отсутствие водного раствора.

Таким образом, согласно другому аспекту в настоящем документе представлен способ получения ультразвукового контрастного средства, предусматривающий активацию любой из вышеупомянутых неводных смесей в присутствии

перфторуглеродного газа и в присутствии или отсутствии водного разбавителя с образованием микросфер с инкапсулированным в липиде газом.

Согласно другому аспекту в настоящем документе представлен способ получения ультразвукового контрастного средства, предусматривающий объединение любой из вышеупомянутых неводных смесей с водным разбавителем в присутствии перфторуглеродного газа и активацию комбинации с образованием микросфер с инкапсулированным в липиде газом. Водный разбавитель может быть добавлен в неводную смесь со взбалтыванием или без взбалтывания или с другой модификацией (например, нагреванием и т.д.), и такая объединенная смесь может быть активирована в присутствии перфторуглеродного газа независимо от того, является ли она однофазной смесью (т.е. липидная и водная фазы были, по сути, перемешаны, и/или смесь выглядит относительно гомогенной) или двухфазной смесью (т.е. липидная и водная фазы не были, по сути, перемешаны, и/или смесь не выглядит относительно гомогенной).

Согласно другому аспекту в настоящем документе представлен способ получения ультразвукового контрастного средства, предусматривающий объединение некоторых из вышеупомянутых неводных смесей с пропиленгликолем отдельно или с пропиленгликолем и водным разбавителем (одновременно или последовательно) и активацию комбинации в присутствии перфторуглеродного газа с образованием микросфер с инкапсулированным в липиде газом.

Согласно другому аспекту в настоящем документе представлен способ получения ультразвукового контрастного средства, предусматривающий объединение некоторых из вышеупомянутых неводных смесей с глицерином отдельно или с глицерином и водным разбавителем (одновременно или последовательно) и активацию комбинации в присутствии перфторуглеродного газа с образованием микросфер с инкапсулированным в липиде газом.

Неводные смеси могут находиться при комнатной температуре и/или могут храниться при комнатной температуре до применения. Хранение при комнатной температуре может варьировать от суток до месяцев и нескольких лет.

Согласно некоторым вариантам осуществления активация происходит в течение 20-45 секунд. Согласно некоторым вариантам осуществления активация происходит в течение 60-120 секунд.

Согласно некоторым вариантам осуществления способ, кроме того, предусматривает разбавление микросфер с инкапсулированным в липиде газом дополнительным водным разбавителем.

Согласно некоторым вариантам осуществления способ, кроме того, предусматривает введение микросфер с инкапсулированным в липиде газом субъекту при необходимости контрастной ультразвуковой визуализации.

Согласно некоторым вариантам осуществления композиция находится во флаконе. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция находится в шприце. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция находится в однокамерном контейнере. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция находится в многокамерном контейнере.

Согласно следующим аспектам в настоящем документе представлены способы выявления и/или измерения содержания примесей в любой из композиций, описываемых в настоящем документе. Такие способы особенно применимы для оценки целостности композиции и могут быть использованы для определения того, что композиция подходит для применения или должна быть отброшена. Способы могут быть выполнены в отношении заново изготовленной партии композиций, описываемых в настоящем документе, или они могут быть выполнены в отношении партии, которая находилась в доставке или на хранении в течение определенного периода времени после ее изготовления.

Способ предусматривает выявление и идентификацию компонентов образца. Согласно некоторым вариантам осуществления способ, кроме того, предусматривает отделение компонентов на основе физико-химических свойств, таких как без ограничения заряд и липофильность, необязательно перед выявлением и идентификацией. Согласно некоторым вариантам осуществления отделение выполняют перед выявлением и образец разбавляют солевым раствором до отделения. Согласно некоторым вариантам осуществления образец смешивают до получения гомогенного раствора. Методики отделения на основе физико-химических свойств известны в уровне техники и предусматривают без ограничения HPLC, такую как обращенно-фазовая HPLC. Затем примеси выявляют и необязательно измеряют с использованием методики, такой как без ограничения с использованием детектора заряженного аэрозоля (CAD). Согласно другому варианту осуществления после отделения может быть использовано выявление по светорассеянию испаренного образца (ELSD). Пример такого выявления описывается более подробно в настоящем документе.

Эти и другие аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения будут описаны более подробно в настоящем документе.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлена стабильность состава смешанный липид/пропиленгликоль (LB/PG) по сравнению с DEFINITY®.

На фиг. 2 представлена стабильность состава смешанный липид/пропиленгликоль/глицерин (LB/PG/G) по сравнению с DEFINITY®.

На фиг. 3 представлена стабильность состава смешанный липид/пропиленгликоль/глицерин/буфер (LB/PG/G/буфер) по сравнению с DEFINITY®.

Подробное описание изобретения

В соответствии с настоящим изобретением было обнаружено, что липидные составы для создания микросфер с инкапсулированным в липиде газом, подлежащих использованию в качестве средств ультразвуковой визуализации, могут выдерживаться при комнатной температуре, в том числе при комнатной температуре в течение длительных периодов времени, без существенного разложения. Ранее предполагали, что липидные составы, подлежащие использованию для той же цели, должны храниться при 4°C во избежание разложения. В соответствии с настоящим изобретением было обнаружено, что хранение таких модифицированных липидных составов при комнатной температуре в течение нескольких месяцев дает менее 5% примесей, что ниже содержания, присутствующего в имеющемся в настоящее время на рынке ультразвуковом контрастном средстве при хранении при комнатной температуре в течение того же периода времени.

Важно отметить, что хранение таких модифицированных липидных составов, рассматриваемых как содержащие липид неводные смеси, при комнатной температуре, в том числе длительное хранение при комнатной температуре, не влияет негативно на их способность образовывать микросферы для применения в качестве ультразвуковых контрастных средств, что подтверждается способностью образовывать микросферы размера и количества, сопоставимых с таковыми у имеющихся в настоящее время на рынке ультразвуковых контрастных средств. Поэтому, такие модифицированные липидные составы являются более надежными, чем некоторые имеющиеся на рынке липидные составы, по меньшей мере с учетом такой повышенной стабильности.

Новые липидные составы, описываемые в настоящем документе, легче применять, чем некоторые существующие составы, по меньшей мере отчасти,

поскольку они не требуют замораживания. Напротив, некоторые имеющиеся в настоящее время на рынке липидные составы должны быть замороженными на протяжении периода их хранения, но затем вводятся пациентам при комнатной температуре. Это означает, что такие составы сначала должны быть нагреты от приблизительно 4°C до приблизительно комнатной температуры перед их применением. Напротив, модифицированные липидные составы, представленные в настоящем документе, могут быть использованы, по сути, «в готовом виде» без ожидания в течение необходимого периода времени для нагревания до комнатной температуры. Это облегчает применение таких модифицированных составов, а также обеспечивает их немедленное применение, например, в неотложных ситуациях.

Кроме того, из-за изначально более прочной природы модифицированных липидных составов, меньше вероятность того, что их целостность будет нарушена до применения, в том числе, например, во время транспортировки и хранения. В современной практике, если некоторые из имеющихся на рынке составов хранили в течение какого-либо значительного периода времени при комнатной температуре, то такие составы могут иметь сомнительное качество и, таким образом, должны быть выброшены. С новыми составами конечному потребителю можно не волноваться по поводу истории или обработки состава. Таким образом, помимо повышенной простоты применения, также меньше модифицированных липидных составов будет выброшено из-за проблем с целостностью.

Такие модифицированные липидные составы предназначены для применения в качестве ультразвуковых контрастных средств или в качестве их промежуточных продуктов. В таком качестве, и как описывается в настоящем документе, при обеспечении вместе с газом они могут быть активированы с образованием микросфер с инкапсулированным в липиде газом с водным разбавителем или без такового. Более того, если используют водный разбавитель, то такие составы могут быть активированы после простого добавления водного разбавителя без какой-либо потребности в предварительном составлении или предварительном смешивании неводной смеси и водного разбавителя. В качестве примера, добавление водного разбавителя может дать гетерогенную или двухфазную смесь, и эта двухфазная смесь может быть активирована. Некоторые имеющиеся на рынке ультразвуковые контрастные средства представлены в виде предварительно составленных, относительно гомогенных, однофазных смесей липидов, составленных в водной матрице и активированных в такой, по сути, составленной в воде форме. Напротив, модифицированные липидные

составы, представленные в настоящем документе, могут быть активированы в их неводной форме или могут быть активированы после простого добавления водного разбавителя без необходимости предварительного составления липида(ов) и водного разбавителя или гомогенности смеси. Это, в свою очередь, означает, что объем липидного состава может быть много меньше во время активации (а также во время транспортировки и хранения), и при необходимости его можно разбавить непосредственно перед применением. Это также означает, что целостность состава подвержена меньшей вероятности ухудшения, поскольку можно активировать без добавления водного разбавителя, а затем, если состав не используется, просто хранить состав для последующего применения. Если бы вместо этого неводную смесь нужно было бы объединять с водным раствором для активации, то в таком случае этот тип гибкости был бы утрачен, и состав пришлось бы выбросить, что опять привело бы к ненужным отходам.

Следовательно, настоящее изобретение основано, отчасти, на неожиданном и удивительном открытии того, что липиды, используемые для получения микросфер с инкапсулированным в липиде газом, которые сами по себе подходят в качестве ультразвуковых контрастных средств, при составлении в неводной смеси можно хранить в течение длительных периодов времени при комнатной температуре без существенного разложения. Неводная смесь может содержать пропиленгликоль, или глицерин, или смесь пропиленгликоля и глицерина. Важно отметить, что липидные составы, представленные в настоящем документе, дают микросферы с инкапсулированным в липиде газом, сравнимыми с полученными с помощью имеющегося в настоящее время на рынке ультразвукового контрастного средства, DEFINITY[®], в частности, в отношении концентрации и размера микросфер, которые влияют на акустические свойства микросфер. Такие липидные составы являются более надежными и нечувствительными к хранению, в том числе длительному хранению, при комнатной температуре, чем DEFINITY[®].

DEFINITY[®] представляет собой ультразвуковое контрастное средство, которое одобрено FDA для применения у субъектов с субоптимальными эхокардиограммами для обеспечения контрастности камеры левого желудочка и улучшения очерчивания эндокардиальной границы левого желудочка. DEFINITY[®] представлено во флаконе, содержащем однофазный раствор, содержащие DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE в мол. % отношении 10:82:8 в водном растворе, и свободный объем, содержащий перфторпропановый газ. Перед введением субъекту DEFINITY[®] активируют

посредством механизированного встряхивания (далее называемое «активированным DEFINITY®»). Активация приводит к образованию достаточного количества микросфер с инкапсулированным в липиде газом со средним диаметром от 1,1 до 3,3 микрона. DEFINITY®, однако, должно быть заморожено до момента применения. Это ограничивает его применимость, особенно в условиях без надлежащего замораживания, в частности, во время периода хранения.

В настоящем документе представлены, *inter alia*, композиции для применения в изготовлении микросфер с инкапсулированным в липиде газом, а также композиции и применения самих микросфер с инкапсулированным в липиде газом. Настоящее изобретение, кроме того, относится к способам изготовления таких микросфер.

Хранение составов

Данные новые составы содержат неводную смесь одного или нескольких липидов и пропиленгликоля (PG), или глицерина (G), или пропиленгликоля и глицерина (PG/G). Выяснили, что в соответствии с настоящим изобретением, эти составы можно хранить при более высоких температурах в течение более длительных периодов времени, чем было возможно ранее с использованием имеющихся составов ультразвукового контрастного средства, без существенного разложения. Данные композиции, поэтому, можно использовать в более широком диапазоне условий без особой озабоченности по поводу того, как состав был обработан до применения.

Повышенная стабильность этих новых составов демонстрируется в примерах, в которых показано, что липидные составы в пропиленгликоле или пропиленгликоле и глицерине могут быть выдержаны в течение 3 месяцев или дольше с меньшим разложением, чем наблюдается в составе DEFINITY®, выдерживаемом при комнатной температуре. Примеры демонстрируют, что эти составы можно хранить в течение приблизительно 3-6 месяцев без существенного разложения.

Неводная смесь липидов в пропиленгликоле, или глицерине, или пропиленгликоле и глицерине предполагает смесь, содержащую 5% воды по массе или меньше (т.е. масса воды к массе комбинации липидов и пропиленгликоля и/или глицерина). В некоторых случаях неводная смесь содержит менее 5% воды (масса/масса), 1-4% воды (масса/масса), 1-3% воды (масса/масса), 2-3% воды (масса/масса) или 1-2% воды (масса/масса). В некоторых случаях неводная смесь содержит менее 1% воды (масса/масса). Содержание воды может быть измерено в конце изготовления (и перед длительным хранением), или оно может быть измерено

после хранения, в том числе длительного хранения, и непосредственно перед применением.

Неводная смесь также может не содержать соль, что означает, что она не содержит никакие соли, отличные от липидных противоионов. Более конкретно и в качестве примера, липиды, такие как DPPA и DPPE, как правило, представлены в виде солей натрия. Используемая в настоящем документе бессолевая неводная смесь может содержать такие противоионы (например, натрия, если используются DPPA и/или DPPE), но они не содержат другие ионы. В некоторых случаях неводная смесь не содержит натрия хлорид или хлорид.

Неводная смесь может содержать буфер. Буфером может быть ацетатный буфер, бензоатный буфер или салицилатный буфер, без ограничения ими. Не являющиеся фосфатными буферы являются предпочтительными в некоторых случаях благодаря их профилям растворения в неводных смесях, представленных в настоящем документе. В некоторых случаях может быть использован фосфатный буфер (например, после добавления водного разбавителя или одновременно с таковым).

Согласно некоторым вариантам осуществления неводная смесь содержит, состоит из, или состоит, по сути, из (a) одного или нескольких липидов, (b) пропиленгликоля, или глицерина, или пропиленгликоля/глицерина, а также (c) не являющегося фосфатным буфера. Такие неводные смеси могут быть обеспечены вместе с газом, таким как перфторуглеродный газ, или они могут быть обеспечены отдельно (т.е. в отсутствие газа). Такие неводные смеси могут быть обеспечены в количествах для разового применения и/или в контейнерах для разового применения, с газом или без такового. Такие контейнеры, как правило, будут стерильными.

Не являющимся фосфатным буфером может быть без ограничения ацетатный буфер, бензоатный буфер, салицилатный буфер, диэтаноламиновый буфер, триэтаноламиновый буфер, боратный буфер, карбонатный буфер, глутаматный буфер, сукцинатный буфер, малатный буфер, тартратный буфер, глутаратный буфер, аконитный буфер, цитратный буфер, ацетатный буфер, лактатный буфер, глицератный буфер, глюконатный буфер и трис-буфер. В некоторых случаях буфером является фосфатный буфер. Специалист в данной области сможет определить и оптимизировать концентрацию буфера для каждого типа буфера.

Используемый в настоящем документе термин «комнатная температура» означает температуру 15-30°C, в том числе 18-25°C и 20-25°C и все температуры между

ними. Комнатную температуру можно контролировать (например, поддерживать термостатически), чтобы она была такой температурой, без ограничения.

Липиды

Данные новые составы содержат один и, как правило, более чем один липид. Используемые в настоящем документе термины «липиды», или «суммарный липид», или «объединенные липиды» означают смесь липидов.

Липиды могут быть обеспечены в их отдельных твердых формах (например, порошковых). В качестве альтернативы, липиды могут быть обеспечены в виде смешанного липида. Способы получения смешанного липида включают в себя описанные в патенте США № 8084056 и в опубликованной РСТ заявке WO 99/36104. Используемый в настоящем документе термин «смешанный липид» означает представление двух или более липидов, которые были смешаны с обеспечением в результате более гомогенной липидной смеси, что в ином случае могло быть достигнуто путем простого смешивания липидов в их отдельной порошковой форме. Смешанный липид обычно имеет форму порошка. Смешанный липид может быть получен с помощью процесса лиофилизации водной суспензии или процесса растворения в органическом растворителе и осаждения с использованием органических растворителей. В процессе лиофилизации водной суспензии желаемые липиды суспендируют в воде при повышенной температуре, а затем концентрируют путем лиофилизации.

Способ растворения в органическом растворителе предусматривает следующие стадии.

(а) Введение в контакт желаемых липидов (например, DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE) с системой первого неводного растворителя. Данная система, как правило, представляет собой комбинацию растворителей, например, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ и толуол/ MeOH . Предпочтительно первым неводным растворителем является смесь толуола и метанола. Может быть желательным нагревание липидного раствора до температуры, достаточной для достижения полного растворения. Такая температура предпочтительно составляет приблизительно $25\text{-}75^\circ\text{C}$, более предпочтительно приблизительно $35\text{-}65^\circ\text{C}$. После растворения нерастворенные посторонние вещества могут быть удалены путем горячего фильтрования или охлаждения до комнатной температуры, а затем фильтрования. Могут быть

использованы известные способы фильтрования (например, гравитационное фильтрование, вакуумное фильтрование или фильтрование под давлением).

(b) Раствор затем концентрируют до густого геля/полутвердого вещества. Концентрирование предпочтительно осуществляют с помощью вакуумной дистилляции. Также могут быть использованы другие способы концентрирования раствора, такие как ротационное выпаривание. Температура на данной стадии предпочтительно составляет приблизительно 20-60°C, более предпочтительно 30-50°C.

(c) Затем густой гель/полутвердое вещество диспергируют во втором неводном растворителе. Смесь суспендируют предпочтительно при температуре, близкой к окружающей (например, 15-30°C). Применимыми вторыми неводными растворителями являются такие, которые вызывают осаждение липидов из фильтрованного раствора. Вторым неводным растворителем предпочтительно является метил-трет-бутиловый эфир (МТБЕ). Могут быть использованы другие эфиры и спирты.

(d) Твердые вещества, полученные при добавлении второго неводного растворителя, затем собирают. Предпочтительно собранные твердые вещества промывают другой порцией второго неводного растворителя (например, МТБЕ). Сбор может быть выполнен путем вакуумного фильтрования или центрифугирования, предпочтительно при окружающей температуре. После сбора предпочтительно сушить твердые вещества в вакууме при температуре от приблизительно 20 до 60°C.

Содержание патента США № 8084056 и опубликованной РСТ заявки WO 99/36104, относящихся к способу получения смешанного липида, включено в настоящий документ посредством ссылки.

Процесс растворения в органическом растворителе и осаждения предпочтительнее процесса водной суспензии/лиофилизации по ряду причин, как подчеркивается в патенте США № 8084056 и в опубликованной РСТ заявке WO 99/36104, в том числе благодаря однородно распределенному твердому липиду в результате использования способа растворения в органическом растворителе.

В качестве альтернативы, липиды могут быть обеспечены в виде отдельных порошков, которые растворяют вместе или отдельно непосредственно в пропиленгликоле, глицерине или пропиленгликоле/глицерине с образованием неводной смеси.

Используемый в настоящем документе термин «липидный раствор» представляет собой раствор, содержащий смесь липидов. Подобным образом, термин «липидный состав» представляет собой состав, содержащий один или несколько

липидов. Липидами могут быть катионные, анионные или нейтральные липиды. Липиды могут иметь натуральное, синтетическое или полусинтетическое происхождение, в том числе, например, жирные кислоты, фторированные липиды, нейтральные жиры, фосфатиды, масла, фторированные масла, гликолипиды, поверхностно-активные средства (сурфактанты и фторсурфактанты), алифатические спирты, воски, терпены и стероиды.

По меньшей мере одним из липидов может быть фосфолипид, и, таким образом, смешанный липид может рассматриваться как смешанный фосфолипид. Используемый в настоящем документе термин «фосфолипид» означает жирное вещество, содержащие масляную (гидрофобную) углеводородную цепь(и) с полярной (гидрофильной) фосфорной концевой группой. Фосфолипиды являются амфифильными. Они спонтанно формируют границы и закрытые везикулы в водных средах.

Предпочтительно все липиды являются фосфолипидами, предпочтительно 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолином (DPPC); 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидной кислотой (DPPA) и 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтаноламином (DPPE). DPPA и DPPE могут быть обеспечены в виде моновалентных солевых форм.

В некоторых случаях липидные компоненты могут быть модифицированы с целью снижения способности микросферы реагировать с окружающей средой, в том числе с *in vivo* окружающей средой, что тем самым продлевает ее период полураспада. Несущие липиды полимеры, такие как хитин, гиалуроновая кислота, поливинилпирролидон или полиэтиленгликоль (PEG), также могут быть использованы для этой цели. Липиды, конъюгированные с PEG, называются в настоящем документе пегилированными липидами. Предпочтительно пегилированным липидом является DPPE-PEG или DSPE-PEG.

Конъюгация липида с полимером, таким как PEG, может быть осуществлена с помощью ряда соединений или связей, таких как без ограничения амидная, карбаматная, аминная, сложноэфирная, эфирная, тиоэфирная, тиоамидная и дисульфидная (сложнотиоэфирная) связи.

Концевыми группами в PEG могут быть без ограничения гидрокси-PEG (HO-PEG) (или его реакционноспособное производное), карбокси-PEG (COOH-PEG), метокси-PEG (MPEG) или другая группа низшего алкила, например, как в изопропокси-PEG или трет-бутокси-PEG, amino-PEG (NH₂PEG) или тиол-PEG (SH-PEG).

Молекулярная масса PEG может варьировать от приблизительно 500 до приблизительно 10000, в том числе от приблизительно 1000 до приблизительно 7500 и от приблизительно 1000 до приблизительно 5000. Согласно некоторым важным вариантам осуществления молекулярная масса PEG составляет приблизительно 5000. Следовательно, DPPE-PEG5000 или DSPE-PEG5000 относится к DPPE или DSPE с присоединенным к нему полимером PEG, имеющим молекулярную массу приблизительно 5000.

Процентное отношение пегилированных липидов относительно общего количества липидов в липидном растворе, исходя из молей, составляет от приблизительно 2% до приблизительно 20%. Согласно различным вариантам осуществления процентное отношение пегилированных липидов относительно общего количества липидов составляет от 5 мольных процентов до приблизительно 15 мольных процентов.

Предпочтительно липидами являются 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (DPPC), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидная кислота, моонатриевая соль (DPPA) и N-(полиэтиленгликоль5000-карбамоил)-1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтанолламин, моонатриевая соль (PEG5000-DPPE). Полиэтиленгликоль5000-карбамоилом может быть метокси-полиэтиленгликоль5000-карбамоил. Согласно некоторым важным вариантам осуществления липидом может быть один, два или все три из DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE. PEG5000-DPPE может представлять собой MPEG5000-DPPE или HO-PEG5000-DPPE.

Широкий ряд липидов, таких как описанные у Unger et al., патент США № 5469854, может быть использован в данном процессе. Подходящие липиды включают в себя, например, жирные кислоты, лизолипиды, фторированные липиды, фосфохолины, такие как ассоциированные с факторами активации тромбоцитов (PAF) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, Ala), в том числе 1-алкил-2-ацетоил-sn-глицеро-3-фосфохолины и 1-алкил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолины; фосфатидилхолин как с насыщенными, так и с ненасыщенными липидами, в том числе диолеоилфосфатидилхолин; димиристоил-фосфатидилхолин; дипентадеканоилфосфатидилхолин; дилауроилфосфатидилхолин; 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (DPPC); дистеароилфосфатидилхолин (DSPC) и диарахидонилфосфатидилхолин (DAPC); фосфатидилэтанолламины, такие как диолеоил-фосфатидилэтанолламин, 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-

фосфатидилэтаноламин (DPPE) и дистеароил-фосфатидилэтаноламин (DSPE); фосфатидилсерин; фосфатидилглицерины, в том числе дистеароилфосфатидилглицерин (DSPG); фосфатидинозитол; сфинголипиды, такие как сфингомиелин; гликолипиды, такие как ганглиозид GM1 и GM2; глюколипиды; сульфатиды; гликосфинголипиды; фосфатидные кислоты, такие как 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидная кислота (DPPA) и дистеароилфосфатидная кислота (DSPA); пальмитиновая кислота; стеариновая кислота; арахидоновая кислота и олеиновая кислота.

Другие подходящие липиды включают в себя фосфатидилхолины, такие как диолецилфосфатидилхолин, димиристоилфосфатидилхолин, дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC) и дистеароилфосфатидилхолин; фосфатидилэтаноламины, такие как дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (DPPE), диолеоилфосфатидилэтаноламин и N-сукцинил-диолеоилфосфатидилэтаноламин; фосфатидилсерины; фосфатидил-глицерины; сфинголипиды; гликолипиды, такие как ганглиозид GM1; глюколипиды; сульфатиды; гликосфинголипиды; фосфатидные кислоты, такие как дипальмитоилфосфатидная кислота (DPPA); пальмитиновые жирные кислоты; стеариновые жирные кислоты; арахидоновые жирные кислоты; лауриновые жирные кислоты; миристиновые жирные кислоты; лауролеиновые жирные кислоты; тетрадеценовые жирные кислоты; миристолеиновые жирные кислоты; пальмитолеиновые жирные кислоты; петроселиновые жирные кислоты; олеиновые жирные кислоты; изолауриновые жирные кислоты; изомиристиновые жирные кислоты; изопальмитиновые жирные кислоты; изостеариновые жирные кислоты; холестерин и производные холестерина, такие как холестерингемисукцинат, холестеринсульфат и холестерил(4'-триметиламмоний)бутаноат; сложные полиоксиэтиленовые эфиры жирной кислоты; полиоксиэтиленовые спирты жирной кислоты; сложные полиоксиэтиленовые эфиры спирта и жирной кислоты; сложные полиоксиэтилированные эфиры сорбита и жирной кислоты; глицерол-полиэтиленгликоль-оскистеарат; глицерол-полиэтиленгликоль-рицинолеат; этоксилированные соевые стеролы; этоксилированное касторовое масло; полимеры полиоксиэтилен-полиоксипропиленовая жирная кислота; полиоксиэтиленовой жирной кислоты стеараты; 12-(((7'-диэтиламино-кумарин-3-ил)карбонил)метиламино)октадекановую кислоту; N-[12-(((7'-диэтиламино-кумарин-3-ил)карбонил)метил-амино)октадеcanoил]-2-амино-пальмитиновую кислоту; 1,2-диолеоил-sn-глицерин; 1,2-дипальмитоил-sn-3-сукцинилглицерин; 1,3-дипальмитоил-2-

сукцинил-глицерин и 1-гексадецил-2-пальмитоил-глицерофосфоэтаноламин и пальмитоилгомоцистеин; лаурилтриметиламмония бромид (лаурил=додецил-); цетилтриметиламмония бромид (цетрил=гексадецил-); миристилтриметиламмония бромид (миристил=тетрадецил-); алкилдиметилбензиламмония хлориды, такие, в которых алкил представляет собой C₁₂-, C₁₄- или C₁₆-алкил; бензилдиметилдодециламмония бромид; бензилдиметилдодециламмония хлорид, бензилдиметилгексадециламмония бромид; бензилдиметилгексадециламмония хлорид; бензилдиметилтетрадециламмония бромид; бензилдиметилтетрадециламмония хлорид; цетилдиметилэтиламмония бромид; цетилдиметилэтиламмония хлорид; цетилпиридиния бромид; цетилпиридиния хлорид; N-[1-2,3-диолеоилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмония хлорид (DOTMA); 1,2-диолеоилокси-3-(триметиламмоний)пропан (DOTAP) и 1,2-диолеоил-е-(4'-триметиламмоний)бутаноил-sn-глицерин (DOTB).

Согласно некоторым вариантам осуществления, если используют DPPA, DPPC и DPPE, их молярные процентные отношения могут составлять приблизительно 77-90 мол. % DPPC, приблизительно 5-15 мол. % DPPA и приблизительно 5-15 мол. % DPPE, в том числе DPPE-PEG5000. Предпочтительные отношения каждого липида включают в себя описываемые в разделе Примеры, такие как массовое % отношение 6,0 к 53,5 к 40,5 (DPPA:DPPC:MPEG5000-DPPE) или мол. % отношение 10 к 82 к 8 (10:82:8) (DPPA:DPPC:MPEG5000-DPPE).

Концентрация липидов в неводных смесях, предназначенных для длительного хранения при комнатной температуре, может варьировать в зависимости от варианта осуществления. В некоторых случаях концентрация липидов может варьировать от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 20 мг на мл неводной смеси, в том числе от приблизительно 0,9 мг до приблизительно 10 мг на мл неводной смеси и от приблизительно 0,9 мг до приблизительно 7,5 мг на мл неводной смеси. Согласно некоторым вариантам осуществления концентрация липидов может варьировать от приблизительно 0,94 мг до приблизительно 7,5 мг липида на мл неводной смеси, в том числе от приблизительно 1,875 мг до приблизительно 7,5 мг липида на мл неводной смеси или от приблизительно 3,75 мг до приблизительно 7,5 мг липида на мл неводной смеси. В некоторых случаях концентрация липидов составляет от приблизительно 0,94 мг до приблизительно 1,875 мг на мл неводной смеси, от приблизительно 1,875 мг до приблизительно 3,75 мг на мл неводной смеси или от приблизительно 3,75 мг до приблизительно 7,5 мг суммарного липида на мл неводной смеси.

В качестве примера, концентрация липидов может варьировать от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 10 мг липида на мл пропиленгликоля/глицерина (объединенных), в том числе от приблизительно 1 мг до приблизительно 5 мг липида на мл пропиленгликоля/глицерина (объединенных). В некоторых случаях концентрация липидов составляет от приблизительно 0,94 мг до приблизительно 3,75 мг липида на мл пропиленгликоля/глицерина (объединенных).

В качестве другого примера, концентрация липидов может варьировать от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 20 мг липида на мл пропиленгликоля, в том числе от приблизительно 1 мг до приблизительно 10 мг липида на мл пропиленгликоля, или от приблизительно 2 мг до приблизительно 7,5 мг липида на мл пропиленгликоля, или от приблизительно 3,75 мг до приблизительно 7,5 мг липида на мл пропиленгликоля. Согласно некоторым вариантам осуществления концентрация липидов составляет от приблизительно 1,875 мг до приблизительно 7,5 мг липида на мл пропиленгликоля, в том числе от приблизительно 3,75 мг до приблизительно 7,5 мг липида на мл пропиленгликоля.

В качестве следующего примера, концентрация липидов может варьировать от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 20 мг липида на мл глицерина, в том числе от приблизительно 1 мг до приблизительно 10 мг липида на мл глицерин, или от приблизительно 2 мг до приблизительно 7,5 мг липида на мл глицерина, или от приблизительно 3,75 мг до приблизительно 7,5 мг липида на мл глицерина. В некоторых случаях концентрация липидов составляет от приблизительно 1,875 мг до приблизительно 7,5 мг липида на мл глицерина, в том числе от приблизительно 3,75 мг до приблизительно 7,5 мг липида на мл глицерина.

Способность создавать композиции микросфер с инкапсулированным в липиде газом, которые применимы в качестве ультразвуковых контрастных средств, с использованием меньших количеств липида, по сравнению с имеющимися на рынке липидными составами ультразвуковых контрастных средств, полезна, поскольку это снижает максимальное количество липидов (и других компонентов), которые могли бы вводиться субъекту из одного флакона со снижением тем самым вероятности передозировки для субъекта.

Пропиленгликоль является жидким при комнатной температуре и имеет плотность 1,035 г/мл при 20°C. Глицерин является жидким при комнатной температуре и имеет плотность 1,26 г/мл при 20°C.

Суммарный объем неводных смесей, пригодных для длительного хранения при комнатной температуре, может варьировать в зависимости от конечного предполагаемого применения. В качестве примера, объемы могут варьировать от приблизительно 0,05 до приблизительно 10 мл, или от приблизительно 0,1 до приблизительно 10 мл, или от приблизительно 0,1 до приблизительно 5 мл, или от приблизительно 0,25 до приблизительно 5 мл, или от приблизительно 0,5 до приблизительно 1 мл, или от приблизительно 0,1 до приблизительно 1,0 мл.

Следует учитывать, что эти неводные смеси, как правило, будут разбавленными, например, водным раствором перед активацией, как описывается ниже, и/или перед введением субъекту. Суммарное разбавление может быть от приблизительно 1-кратного до приблизительно 100-кратного, в том числе от приблизительно 5-кратного до приблизительно 30-кратного, в том числе приблизительно 5-кратным, приблизительно 10-кратным, приблизительно 20-кратным и приблизительно 50-кратным.

Согласно некоторым вариантам осуществления липидные составы, содержащие липид, пропиленгликоль и глицерин, могут быть разбавлены в приблизительно 5 раз перед активацией. Согласно некоторым вариантам осуществления липидные составы, содержащие липид и пропиленгликоль, могут быть разбавлены в приблизительно 10 раз перед активацией. Согласно некоторым вариантам осуществления липидные составы, содержащие липид и глицерин, могут быть разбавлены в приблизительно 10 раз перед активацией. Впоследствии разбавленная композиция может быть дополнительно разбавлена в приблизительно 1 раз - приблизительно 50 раз, в том числе в приблизительно 10 раз - приблизительно 50 раз, в том числе в приблизительно 10 раз.

Следовательно, вышеупомянутые композиции липида, пропиленгликоля и глицерина будут изменяться при разбавлении. Например, в случаях, если разбавление является приблизительно 10-кратным, то концентрации липидов в конечном составе снижаются в приблизительно 10 раз до тех, которые указаны выше. Подобные снижения будут происходить в концентрациях пропиленгликоля и/или глицерина.

Газ

Неводные смеси могут быть обеспечены с газом. Например, неводные смеси могут быть обеспечены в контакте с газом, или они могут быть обеспечены в одном и том же контейнере или корпусе, что и газ, но не в контакте с газом (т.е. неводная смесь и газ могут быть физически отделены друг от друга).

До настоящего времени не было известно или не предполагалось, что такие неводные смеси могут стабильно храниться в течение длительного времени при комнатной температуре в контакте с газом, таким как перфторуглеродный газ. Также не было известно или не предполагалось, что такие неводные смеси могут быть активированы с образованием микросфер с инкапсулированным в липиде газом. Кроме того, в соответствии с настоящим изобретением обнаружили, что некоторые из таких неводных смесей могут быть использованы для формирования микросфер в достаточном количестве и достаточного размера (что выражено, например, в диаметре) для клинического применения.

Газ предпочтительно является практически нерастворимым в липидных составах, представленных в настоящем документе, таких как неводная смесь. Газом может быть нерастворимый фторированный газ, такой как гексафторид серы или перфторуглеродный газ. Примеры перфторуглеродных газов включают в себя перфторпропан, перфторметан, перфторэтан, перфторбутан, перфторпентан, перфторгексан. Примеры газов, которые могут быть использованы в микросферах в соответствии с настоящим изобретением, описаны в патенте США № 5656211 и включены в настоящий документ посредством ссылки. Согласно важному варианту осуществления газом является перфторпропан.

Примеры газов включают в себя без ограничения гексафторацетон, изопропилацетилен, аллен, тетрафтораллен, бора трифторид, 1,2-бутадиен, 1,3-бутадиен, 1,2,3-трихлорбутадиен, 2-фтор-1,3-бутадиен, 2-метил-1,3-бутадиен, гексафтор-1,3-бутадиен, бутадиин, 1-фторбутан, 2-метилбутан, декафторбутан (перфторбутан), декафторизобутан (перфторизобутан), 1-бутен, 2-бутен, 2-метил-1-бутен, 3-метил-1-бутен, перфтор-1-бутен, перфтор-1-бутен, перфтор-2-бутен, 4-фенил-3-бутен-2-он, 2-метил-1-бутен-3-ин, бутилнитрат, 1-бутин, 2-бутин, 2-хлор-1,1,1,4,4,4-гексафтор-бутин, 3-метил-1-бутин, перфтор-2-бутин, 2-бром-бутиральдегид, карбонилсульфид, кротононитрил, циклобутан, метилциклобутан, октафторциклобутан (перфторциклобутан), перфторизобутан, 3-хлорциклопентен, циклопропан, 1,2-диметилциклопропан, 1,1-диметилциклопропан, этилциклопропан, метилциклопропан, диацетилен, 3-этил-3-метилдиазирин, 1,1,1-трифтордiazозтан, диметиламин, гексафтордиметиламин, диметилэтиламин, бис-(диметилфосфин)амин, 2,3-диметил-2-норборнан, перфтор-диметиламин, диметилоксоний хлорид, 1,3-диоксолан-2-он, 1,1,1,1,2-тетрафторэтан, 1,1,1-трифторэтан, 1,1,2,2-тетрафторэтан, 1,1,2-трихлор-1,2,2-трифторэтан, 1,1-дихлорэтан, 1,1-дихлор-1,2,2,2-тетрафторэтан, 1,2-дифторэтан, 1-

хлор-1,1,2,2,2-пентафторэтан, 2-хлор-1,1-дифторэтан, 1-хлор-1,1,2,2-тетрафтор-этан, 2-хлор-1,1-дифторэтан, хлорэтан, хлорпентафторэтан, дихлортрифторэтан, фторэтан, нитропентафторэтан, нитрозопентафтор-этан, перфторэтан, перфторэтиламин, этилвиниловый эфир, 1,1-дихлорэтилен, 1,1-дихлор-1,2-дифтор-этилен, 1,2-дифторэтилен, метан, метан-сульфонил-хлорид-трифтор, метан-сульфонил-фторид-трифтор, метан-(пентафтортио)трифтор, метан-бром-дифтор-нитрозо, метан-бром-фтор, метан-бром-хлор-фтор, метан-бром-трифтор, метан-хлор-дифтор-нитро, метан-хлор-динитро, метан-хлор-фтор, метан-хлор-трифтор, метан-хлор-дифтор, метан-дибром-дифтор, метан-дихлор-дифтор, метан-дихлор-фтор, метан-дифтор, метан-дифтор-йод, метан-дисилано, метан-фтор, метан-йодметан-йод-трифтор, метан-нитро-трифтор, метан-нитрозо-трифтор, метан-тетрафтор, метан-трихлор-фтор, метан-трифтор, метансульфенилхлорид-трифтор, 2-метилбутан, метиловый эфир, метилизопропиловый эфир, метиллактат, метилнитрит, метилсульфид, метилвиниловый эфир, неопентан, азот (N_2), оксид азота, 1,2,3-нонадекантрикарбоновой кислоты сложный 2-гидроксикриметиловый эфир, 1-нонен-3-ин, кислород (O_2), кислород 17 ($^{17}O_2$), 1,4-пентадиен, н-пентан, додекафторпентан (перфторпентан), тетрадекафторгексан (перфторгексан), перфторизоопентан, перфторнеопентан, 2-пентанон-4-амино-4-метил, 1-пентен, 2-пентен {цис}, 2-пентен {транс}, 1-пентен-3-бром, 1-пентен-перфтор, фталевая кислота-тетрахлор, пиперидин-2,3,6-триметил, пропан, пропан-1,1,1,2,2,3-гексафтор, пропан-1,2-эпокси, пропан-2,2-дифтор, пропан-2-амино, пропан-2-хлор, пропан-гептафтор-1-нитро, пропан-гептафтор-1-нитрозо, перфторпропан, пропен, пропилен-1,1,1,2,3,3-гексафтор-2,3-дихлор, пропилен-1-хлор, пропилен-хлор {транс}, пропилен-2-хлор, пропилен-3-фтор, пропилен-перфтор, пропин, пропин-3,3,3-трифтор, стирол-3-фтор, гексафторид серы, (ди)-декафторид серы (S_2F_{10}), толуол-2,4-диамино, трифторацетонитрил, трифторметилпероксид, трифторметилсульфид, вольфрама гексафторид, винилацетилен, виниловый эфир, неон, гелий, криптон, ксенон (особенно обогащенный рубидием гиперполяризованный ксеноновый газ), диоксид углерода, гелий и воздух.

Предпочтительными являются фторированные газы (то есть газ, содержащий одну или несколько молекул фтора, такой как гексафторид серы), фторуглеродные газы (то есть фторированный газ, который представляет собой фторированный углерод или газ) и перфторуглеродные газы (то есть фторуглеродный газ, который является полностью фторированным, такой как перфторпропан и перфторбутан).

Газ, такой как перфторуглеродный газ, как правило, присутствует при концентрации, ниже обычной концентрации при комнатной температуре, из-за включения воздуха при получении. Предполагают, что концентрация перфторпропана, находящегося во флаконе, содержащем неводную смесь и газ свободного объема, составляет приблизительно 6,52 мг/мл при давлении приблизительно одна атмосфера. Концентрации других газов, как известно из уровня техники, будут подобным образом разбавленными из-за включения воздуха при получении.

Настоящее изобретение предусматривает, что неводные смеси, представленные в настоящем документе, либо в контакте с газом, либо физически отделенные от газа, такого как перфторуглеродный газ, можно хранить при температуре в диапазоне от приблизительно 4°C до приблизительно 40°C, от приблизительно 4°C до приблизительно 30°C, от приблизительно 4°C до приблизительно 25°C, от приблизительно 10°C до приблизительно 40°C, от приблизительно 15°C до приблизительно 40°C от или приблизительно 15°C до приблизительно 30°C.

Настоящее изобретение, кроме того, предусматривает, что неводные смеси, представленные в настоящем документе, либо в контакте с газом, либо физически отделенные от газа, такого как перфторуглеродный газ, можно хранить в течение от приблизительно 1 месяца до приблизительно 6 месяцев, от приблизительно 1 месяца до приблизительно 1 года или от приблизительно 1 месяца до приблизительно 2 лет. Таким образом, неводные смеси, представленные в настоящем документе, либо в контакте с газом, либо физически отделенные от газа, такого как перфторуглеродный газ, можно хранить в течение от приблизительно 1 месяца до приблизительно 2 лет при температуре, варьирующей от приблизительно 15°C до приблизительно 30°C, в качестве неограничивающего примера.

Контейнеры и конфигурации камер

Неводные смеси могут быть обеспечены в контейнере (или корпусе). Контейнером может быть однокамерный или многокамерный контейнер, такой как без ограничения двухкамерный контейнер.

Согласно некоторым вариантам осуществления контейнером является флакон. Флакон может быть сделан из любого материала, в том числе без ограничения из стекла или пластика. Стеклом может быть стекло фармацевтической категории. Контейнер может быть закупорен пробкой, такой как резиновая пробка. Согласно некоторым вариантам осуществления контейнером является 0,5-10-мл контейнер. Контейнером

может быть 1-5-мл контейнер или 1- или 2-мл контейнер. Такие объемы относятся к объему обычно помещаемой в контейнер жидкости (называемому объем наполнения жидкости). Это отличается от всего внутреннего объема контейнера, который будет выше объема наполнения жидкости. Примерами объемов наполнения жидкости и внутренних объемов являются следующие: 2-мл (объем наполнения жидкости) флакон Schott, имеющий внутренний объем 2,9 мл; 3-мл (объем наполнения жидкости) флакон Schott, имеющий внутренний объем 4,5 мл; и 1-мл (объем наполнения жидкости) V-образный флакон Wheaton, имеющий внутренний объем 1,2 мл.

Как будет понятно из контекста настоящего раскрытия, внутренний объем контейнера может быть занят неводной смесью и газом. Примером подходящего контейнера является 2-мл стеклянный флакон Wheaton (коммерчески доступный, например, от Nipрго, № по каталогу 2702, В33ВА, 2 см³, 13 мм, тип I, трубчатый флакон из бесцветного стекла), имеющий фактический внутренний объем приблизительно 3,75 мл. Примером подходящей пробки является серая силиконизированная пробка Butyl Lyo West (№ по каталогу V50, 4416/50, 13 мм). Примером подходящего колпачка является отгибающийся алюминиевый колпачок West (№ по каталогу 3766, белый, 13 мм). Контейнеры предпочтительно являются стерильными и/или стерилизуются после введения липидного раствора и/или газа, как описано в опубликованной РСТ заявке WO 99/36104.

Согласно некоторым вариантам осуществления контейнером является плоскодонный контейнер, такой как плоскодонный флакон. Подходящие флаконы включают в себя плоскодонные боросиликатные флаконы, в том числе флаконы Wheaton. Согласно некоторым вариантам осуществления контейнером является неплюскодонный контейнер или флакон. Согласно некоторым вариантам осуществления контейнером является контейнер с V-образным дном, такой как флакон с V-образным дном. Согласно некоторым вариантам осуществления контейнером является круглодонный контейнер, такой как круглодонный флакон. Согласно некоторым вариантам осуществления контейнер имеет суживающиеся стенки так, что площадь поверхности его дна (или диаметр поверхности дна) меньше площади поверхности (или диаметра) его верхушки (отверстия) или меньше какого-либо диаметра между ними (например, диаметра корпуса). Для наглядности, контейнер или флакон с V-образным дном имеет суживающиеся стенки, и площадь поверхности его дна значительно меньше какой-либо из площадей поверхности верхушки или корпуса.

Согласно некоторым вариантам осуществления контейнером является шприц. Неводная смесь может быть обеспечена в предварительно заполненном шприце, необязательно в физическом контакте с газом.

Согласно некоторым вариантам осуществления контейнером является однокамерный контейнер, такой как флакон. В такой одной камере неводная смесь и газ, если присутствуют, могут находиться в физическом контакте друг с другом.

Согласно некоторым вариантам осуществления контейнеры содержат две или более камер. Содержимое двух камер физически отделяется одно от другого, например, во время хранения. Однако при использовании содержимое двух камер объединяется и перемешивается. Таким образом, контейнер дополнительно содержит барьер, который физически отделяет содержимое первой и второй камер, но который может быть «удален» с целью объединения их содержимого, в конечном счете. Настоящее раскрытие предусматривает любое возможное средство удаления такого барьера, в том числе давление, механическое прокалывание или продавливание, растворение и т.п.

Двухкамерные устройства, такие как двухкамерные шприцы или двухкамерные тубы, известны в уровне техники и коммерчески доступны. Неограничивающие примеры включают в себя двухкамерные шприцы Vetter и двухкамерные тубы NeoPak.

Согласно некоторым вариантам осуществления неводная смесь, состоящая из или состоящая преимущественно из одного или нескольких липидов, пропиленгликоля, или глицерина, или пропиленгликоля/глицерина и не являющегося фосфатным буфера, обеспечена в контейнере, таком как однокамерный контейнер. Такая смесь может быть обеспечена с газом, таким как перфторуглеродный газ, или без такового. При обеспечении с газом газ может находиться в той же камере, что и неводная смесь, или в отдельной камере многокамерного контейнера, как представлено ниже.

Контейнер может иметь две камеры, при этом первая камера содержит неводную смесь, содержащую липид(ы), такой как DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE, в пропиленгликоле и глицерине, или в пропиленгликоле, или в глицерине, а вторая камера содержит газ, такой как перфторуглеродный газ. Неводная смесь может содержать буфер, такой как не являющийся фосфатным буфер.

Согласно другому варианту осуществления контейнер может иметь две камеры, при этом первая камера содержит

(i) неводную смесь, содержащую

(a) липид(ы), такой как DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE, и

(b) пропиленгликоль и глицерин, или пропиленгликоль, или глицерин, и

(ii) газ, такой как перфторуглеродный газ,
а вторая камера содержит водный разбавитель.

Неводная смесь может содержать буфер, такой как не являющийся фосфатным буфер. В качестве альтернативы, водный раствор может содержать буфер, такой как фосфатный буфер.

Согласно другому варианту осуществления контейнер может иметь две камеры, при этом первая камера содержит

(i) неводную смесь, содержащую

(a) липид(ы), такие как DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE, и

(b) пропиленгликоль и глицерин, или пропиленгликоль, или глицерин, и

вторая камера содержит

(i) водный разбавитель и

(ii) газ, такой как перфторуглеродный газ.

Согласно другому варианту осуществления контейнер может иметь по меньшей мере три камеры, при этом первая камера содержит неводную смесь, содержащую DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE в пропиленгликоле, или в глицерине, или в пропиленгликоле и глицерине, вторая камера содержит газ, такой как перфторуглеродный газ, а третья камера содержит водный раствор.

Согласно другому варианту осуществления контейнер может содержать первую камеру, которая содержит неводную смесь, содержащую липиды и пропиленгликоль, и вторую камеру, которая содержит глицерин. Согласно другому варианту осуществления контейнер может содержать первую камеру, которая содержит неводную смесь, содержащую липиды и глицерин, и вторую камеру, которая содержит пропиленгликоль.

Водный разбавитель может содержать соли, такие как без ограничения натрия хлорид, и, таким образом, может рассматриваться как солевой раствор. Водный разбавитель может содержать буфер, такой как фосфатный буфер, и, таким образом, может рассматриваться как буферный водный разбавитель. Водным разбавителем может быть буферный солевой раствор. Неводная смесь может содержать буфер, такой как не являющийся фосфатным буфер, примеры которого представлены в настоящем документе. Как неводная смесь, так и водный разбавитель могут содержать буфер. Согласно типичным вариантам осуществления либо неводная смесь, либо водный разбавитель содержит буфер, но не оба. Концентрация буфера будет варьировать в зависимости от типа используемого буфера, что специалист в данной области сможет

понять и определить. Концентрация буфера в неводном липидном составе может варьировать от приблизительно 1 мМ до приблизительно 100 мМ. В некоторых случаях концентрация буфера может составлять от приблизительно 1 мМ до приблизительно 50 мМ, или от приблизительно 1 мМ до приблизительно 20 мМ, или от приблизительно 1 мМ до приблизительно 10 мМ, или от приблизительно 1 мМ до приблизительно 5 мМ, в том числе приблизительно 5 мМ.

Конечный состав, подлежащий введению, как правило, внутривенно, субъекту, в том числе субъекту-человеку, может иметь рН в диапазоне 4-8 или в диапазоне 4,5-7,5. В некоторых случаях рН может находиться в диапазоне от приблизительно 6 до приблизительно 7,5 или в диапазоне от 6,2 до приблизительно 6,8. В других случаях рН может составлять приблизительно 6,5 (например, 6,5 +/- 0,5 или +/- 0,3). В некоторых случаях рН может находиться в диапазоне от 5 до 6,5, или в диапазоне от 5,2 до 6,3, или в диапазоне от 5,5 до 6,1, или в диапазоне от 5,6 до 6, или в диапазоне от 5,65 до 5,95. В следующих случаях рН может находиться в диапазоне от приблизительно 5,7 до приблизительно 5,9 (например, +/- 0,1, или +/- 0,2, или +/- 0,3 на одном конце или на обоих концах диапазона). В другом случае рН может составлять приблизительно 5,8 (например, 5,8 +/- 0,15 или 5,8 +/- 0,1).

Согласно некоторым вариантам осуществления водный разбавитель содержит глицерин, буфер, такой как фосфатный буфер, соль(и) и воду. Такой водный разбавитель может быть использован с неводной смесью, не содержащей глицерин. Согласно некоторым вариантам осуществления липидный раствор дополнительно содержит солевой раствор (объединенные соль(и) и вода) и глицерин в массовом отношении 8:1.

Согласно некоторым вариантам осуществления водный разбавитель содержит пропиленгликоль, буфер, такой как фосфатный буфер, соль(и) и воду. Такой водный разбавитель может быть использован с неводной смесью, которая не содержит пропиленгликоль.

Согласно некоторым вариантам осуществления водный разбавитель содержит буфер, такой как фосфатный буфер, соль(и) и воду. Такой водный разбавитель может быть использован с неводной смесью, которая содержит как пропиленгликоль, так и глицерин.

В настоящем документе представлен способ, предусматривающий помещение неводной смеси липидов и пропиленгликоля, а также газа в контейнер, при этом способ предусматривает помещение неводной смеси липидов и глицерина, а также газа в

контейнер, и способ предусматривает помещение неводной смеси липидов и пропиленгликоля с глицерином, а также газа в контейнер. Согласно любому из данных способов газ может быть помещен в контейнер путем обмена с газом свободного объема. В уровне техники известны газообменники, подходящие для этой цели. Пример газообменного устройства является лиофилизирующая камера. Такие контейнеры затем можно хранить при от приблизительно 10 до приблизительно 50°C, или от приблизительно 15 до приблизительно 40°C, или от приблизительно 20 до приблизительно 30°C до 2 лет, или в течение 1-12 месяцев, или в течение 1-30 суток. Согласно другому аспекту контейнер может быть обеспечен инструкциями по хранению при вышеупомянутых температурах, необязательно в течение вышеупомянутых периодов времени, или, в качестве альтернативы, без инструкций по хранению при 4°C или при замораживании.

В настоящем документе представлен способ, предусматривающий объединение первой композиции, содержащей неводный раствор липидов в пропиленгликоле и перфторуглеродный газ, со второй композицией, содержащей водный разбавитель, способ, предусматривающий объединение первой композиции, содержащей неводный раствор липидов в глицерине и перфторуглеродный газ, со второй композицией, содержащей водный разбавитель, и способ, предусматривающий объединение первой композиции, содержащей неводный раствор липидов в пропиленгликоле с глицерином и перфторуглеродный газ, со второй композицией, содержащей водный разбавитель.

Первая и вторая композиции могут быть обеспечены в первой и второй камерах контейнера, соответственно, и объединение может предусматривать нарушение перегородки между первой и второй камерами. Первая композиция может быть обеспечена во флаконе, а вторая композиция может быть обеспечена в шприце, при этом содержимое шприца добавляют к содержимому флакона. В качестве альтернативы, вторая композиция может быть обеспечена во флаконе, а первая композиция может быть обеспечена в шприце, при этом содержимое шприца добавляют к содержимому флакона.

Следует учитывать, что любая комбинация или вариация вышеупомянутых вариантов осуществления предусматривается и охватывается настоящим раскрытием, и что вышеупомянутые примеры не следует рассматривать как ограничивающие, если явно не указано.

Любые из вышеупомянутых вариантов осуществления контейнера могут быть обеспечены дополнительным корпусом или без такового, инструкциями по хранению

при температуре выше 4°C (или без замораживания) или инструкциями, в которых не упоминается температура хранения. Следует учитывать, что составы, представленные в настоящем документе, можно хранить при 4°C, но не обязательно их хранить при этой температуре. В инструкциях, кроме того, может упоминаться длительное хранение, например, хранение в течение суток, месяцев или даже лет, и, кроме того, может упоминаться, что длительное хранение происходит при комнатной температуре или приближенной к таковой (например, 18-25°C).

Согласно некоторым вариантам осуществления композиция находится в контейнере, таком как флакон, и такой контейнер снабжен этикеткой. Контейнер может иметь этикетку, зафиксированную на одной или нескольких его внешних поверхностях. Такой этикеткой может быть бумажная этикетка или другая такая этикетка, которую конечный потребитель увидит и сможет прочесть и понять без дополнительной помощи или устройства. В качестве альтернативы, этикеткой может быть этикетка, которая считывается машиной или устройством. Примеры считываемых машиной или устройством этикеток включают в себя магнитные полосы, чипы, штрих-коды, в том числе линейные, матричные и 2D штрих-коды, метки радиочастотной идентификации (RFID) и т.п. Штрих-коды, такие как линейные штрих-коды, могут быть такими, которые соответствуют или отвечают требованиям стандартам Совета по единому коду или стандартам Совета по деловой коммуникации в сфере здравоохранения. Такие этикетки, в свою очередь, могут считываться, например, устройством, таким как устройство считывания магнитной полосы, устройство считывания чипов, сканер или устройство считывания штрих-кода, устройство считывания меток RFID и т.п. Практически любая технология маркировки, которая использовалась для целей аутентификации и/или «отслеживания и контроля», может использоваться в сочетании с контейнерами, представленными в настоящем документе.

Этикетка может обеспечивать конечного потребителя или работника, осуществляющего промежуточные манипуляции с контейнером, различной информацией, в том числе без ограничения об источнике и/или изготовителе композиции, содержащейся в нем, в том числе, например, название компании или дочерней компании, которая изготовила композицию, и/или которая произвела компоненты композиции, дата изготовления композиции, физическое местоположение, где была изготовлена композиция, дата транспортировки контейнера, обработка контейнера, в том числе, например, хранили ли его в удаленном местоположении, а также условия и длительность такого хранения, дата доставки контейнера, средство

доставки, национальный код лекарственных средств (NDC), предусматриваемый FDA, содержимое контейнера, доза и способ применения, в том числе путь введения и т.д.

Этикетка может служить одной или нескольким целям, в том числе, например, для аутентификации контейнера и композиции, содержащейся в нем. Аутентификация означает возможность идентифицировать или маркировать контейнер как полученный и изготовленный уполномоченной стороной и позволяет конечному потребителю или другой стороне идентифицировать контейнер и композиции, полученные от другой неуполномоченной стороны. Этикетка также может быть использована для отслеживания и контроля контейнера. Эта возможность может быть использована, чтобы следить за контейнером и композицией, содержащейся в нем, после изготовления и вплоть до введения субъекту. В этом отношении информация о перемещении контейнера в течение этого периода времени может храниться в базе данных, и необязательно такая база данных может быть доступна конечному потребителю для гарантии целостности композиции.

Этикетка также может быть комбинированной этикеткой, предназначенной для содержания информации, которая считывается с использованием двух разных способов. Например, этикетка может содержать информацию, которая является видимой и доступной невооруженному глазу (например, в ней может упоминаться название изготовителя в словах), и другую информацию, которая считывается машиной, такую как встроенная RFID или встроенная штрих-кодовая информация.

Этикетка также может быть этикеткой двойного назначения, что означает, что она может служить двум или более целям. Например, этикетка может содержать информацию, которая идентифицирует композицию, и дополнительную информацию, которая идентифицирует изготовителя и/или дату изготовления. Данная информация может передаваться в том же формате или с использованием другого формата (например, одна может быть обеспечена в этикетке с использованием RFID, а другая может быть обеспечена в этикетке с использованием штрих-кода).

Этикетка может представлять содержание, которое является видимым и понятным человеку, такое как, например, название изготовителя. В качестве альтернативы или дополнения, этикетка может содержать информацию, которая, хотя и хорошо видна человеческому глазу, тем не менее, не содержит значимой информации без таблицы поиска или другой формы базы данных, на которую должна быть сделана ссылка. Такая информация, например, может быть представлена в виде буквенно-цифрового кода.

Активация

Любая из вышеупомянутых композиций может быть использована для образования микросфер с инкапсулированным в липиде газом, которые, в свою очередь, могут быть использованы в качестве ультразвукового контрастного средства. Используемый в настоящем документе термин «микросферы с инкапсулированным в липиде газом» означает сферы с внутренним объемом, который преимущественно заполнен газом и который инкапсулирован липидной оболочкой. Липидная оболочка может быть составлена как однослойная структура или двухслойная структура, в том числе одноламеллярные или мультиламеллярные двухслойные структуры. Данные микросферы применимы в качестве ультразвуковых контрастных средств.

Микросферы получают из неводных смесей с помощью процесса активации. Активация, как описывается более подробно в настоящем документе, относится к энергичному встряхиванию липидного раствора (такого как неводный раствор) с целью получения микросфер с инкапсулированным в липиде газом. Активация, как правило, дает по меньшей мере 1×10^7 микросфер на мл раствора, 5×10^7 микросфер на мл раствора, или по меньшей мере $7,5 \times 10^7$ микросфер на мл раствора, или по меньшей мере 1×10^8 микросфер на мл раствора, или приблизительно 1×10^9 микросфер на мл раствора.

Настоящее раскрытие предусматривает, что некоторые неводные смеси, представленные в настоящем документе, могут быть использованы для образования микросфер с инкапсулированным в липиде газом в присутствии газа. Стало неожиданностью, что данные неводные смеси могли быть активированы.

Активация может быть выполнена путем энергичного взбалтывания, в том числе встряхивания, в течение определенного периода времени. Как описывается выше, активация может происходить в присутствии или отсутствии водного разбавителя. Используемый в настоящем документе термин «активация» означает движение, которое взбалтывает липидный раствор так, что газ вводится из свободного объема в липидный раствор. Любой тип движения, который взбалтывает липидный раствор и приводит к введению газа, может быть использован для встряхивания. Взбалтывание должно быть достаточно сильным для обеспечения формирования пены после определенного периода времени. Предпочтительно взбалтывание является достаточно сильным, так что пена формируется в течение короткого периода времени, например, в течение 30 минут, предпочтительно в течение 20 минут и более предпочтительно в течение 10 минут. Согласно некоторым вариантам осуществления активация может

происходить в течение менее 5 минут, менее 4 минут, менее 3 минут, менее 2 минут, в течение приблизительно 75 секунд, менее минуты или в течение приблизительно 45 секунд. Взбалтывание может осуществляться с помощью микроэмульгирования, с помощью микрофлюидизации, например, откручивания (такого как с помощью вортекса), движения из стороны в сторону или вверх и вниз. Различные типы движения могут быть объединены. Взбалтывание может происходить за счет встряхивания контейнера, содержащего липидный раствор или за счет встряхивания липидного раствора в контейнере без встряхивания самого контейнера. Кроме того, встряхивание может осуществляться вручную или автоматически. Механические шейкеры, которые могут быть использованы, включают в себя, например, аппарат для встряхивания, такой как аппарат для встряхивания VWR Scientific (Cerritos, Calif.), микрофлюидизатор Wig-L-Bug™ (Crescent Dental Manufacturing, Inc., Lyons, Ill.), а также механический смеситель для краски VIALMIX® или любое из устройств, описанных в примере 12. Энергичное встряхивание определяют как по меньшей мере приблизительно 60 встряхивающих движений в минуту. Это является предпочтительным в некоторых случаях. Откручивание на вортексе по меньшей мере при 1000 оборотах в минуту является примером энергичного встряхивания и является более предпочтительным в некоторых случаях. Откручивание на вортексе при 1800 оборотах в минуту является еще более предпочтительным в некоторых случаях.

VIALMIX® описывается в патенте США № 6039557. Контейнеры, такие как флаконы, могут быть достаточно взболтаны с использованием VIALMIX® в течение упомянутых выше диапазонов времени, в том числе, например, 45 секунд. Активация с использованием VIALMIX® может осуществляться в течение менее 1 минуты или дольше, в том числе в течение 30 секунд, 45 секунд, 60 секунд, 75 секунд, 90 секунд, 105 секунд, 120 секунд или дольше.

Дополнительные примеры способов активации представлены в примере 12.

Неводные смеси, содержащие липиды и пропиленгликоль с глицерином могут быть активированы в присутствии газа без добавления других растворов. В качестве альтернативы, данная смесь сначала может быть объединена с водным разбавителем, а затем активирована в присутствии газа.

Неводные смеси, содержащие липиды и пропиленгликоль, могут быть сначала объединены с глицерином и необязательно водным разбавителем, а затем активированы в присутствии газа.

Неводные смеси, содержащие липиды и глицерин, могут быть сначала объединены с пропиленгликолем и необязательно водным разбавителем, а затем активированы в присутствии газа.

В других случаях липиды в твердой форме, либо в виде смешанного липида, либо нет, могут быть растворены в пропиленгликоле отдельно, или в глицерине отдельно, или в пропиленгликоле и глицерине, или в пропиленгликоле, глицерине и водном разбавителе, который, в свою очередь, может содержать соль(и) и буфер. Любая из данных смесей может быть активирована, а в некоторых случаях может быть дополнительно разбавлена водным разбавителем, перед применением.

Таким образом, в настоящем документе представлена композиция, содержащая микросферы с инкапсулированным в липиде газом, содержащие DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE в неводной смеси, содержащей пропиленгликоль и глицерин, и перфторуглеродный газ, композиция, содержащая микросферы с инкапсулированным в липиде газом, содержащие DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE в неводной смеси, содержащей пропиленгликоль, и перфторуглеродный газ, и композиция, содержащая микросферы с инкапсулированным в липиде газом, содержащие DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE в неводной смеси, содержащей глицерин, и перфторуглеродный газ.

Настоящее раскрытие также предусматривает образование микросфер в присутствии водного разбавителя, такого как без ограничения водный буферный солевой раствор. Водный разбавитель может содержать соль(и), буфер(ы), пропиленгликоль, глицерин и воду.

Согласно некоторым вариантам осуществления активированная композиция, содержащая микросферы с инкапсулированным в липиде газом, может содержать солевой раствор, глицерин и пропиленгликоль в мас. % отношении 8:1:1.

После образования микросферы могут быть разбавлены водным разбавителем, а затем введены субъекту. Водный солевой раствор, как правило, будет фармацевтически приемлемым и может не содержать консервантов (что называется в настоящем документе безконсервантным). Водным разбавителем может быть солевой раствор (т.е. он может содержать соль, такую как без ограничения натрия хлорид), и/или он может содержать буфер, такой как без ограничения фосфатный буфер.

Микросферы с инкапсулированным в липиде газом могут быть разбавлены от приблизительно 5 до приблизительно 50-кратно или от приблизительно 35 до приблизительно 45-кратно. Разбавленные микросферы с инкапсулированным в липиде

газом могут быть введены в виде болюсной или непрерывной инфузии субъекту при необходимости ультразвуковой контрастной визуализации.

Микросферы имеют средний диаметр в микронном диапазоне. Согласно некоторым вариантам осуществления микросферы имеют средний диаметр, варьирующий от приблизительно 1,0 до приблизительно 2,0 микрона или от приблизительно 1,2 микрона до приблизительно 1,8 микрона. Согласно некоторым вариантам осуществления микросферы имеют средний диаметр приблизительно 1,6 микрона.

Согласно некоторым вариантам осуществления большинство микросфер могут иметь диаметр в диапазоне от приблизительно 1,0 до приблизительно 3,0 микрона, или от приблизительно 1,0 до приблизительно 2,0 микрона, или от приблизительно 1,2 до приблизительно 2,0 микрона, предпочтительно в диапазоне от приблизительно 1,2 до приблизительно 1,8 микрона. Большинство микросфер означает по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 80% и еще более предпочтительно по меньшей мере 90% измеряемых микросфер с инкапсулированным в липиде газом в композиции. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере 50%, или по меньшей мере 60%, или по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95% выявляемых микросфер с инкапсулированным в липиде газом в композиции имеют диаметр в коком-либо из вышеупомянутых диапазонов.

Средний диаметр представляет собой средний диаметр всех выявляемых микросфер в композиции. Диаметр микросфер, как правило, измеряют с использованием измерительной аппаратуры, известной и доступной в уровне техники, в том числе без ограничения устройство для измерения размера частиц Malvern FPIA-3000 Sysmex. Как будет понятно из уровня техники, такая измерительная аппаратура, как правило, имеет размеры отсечения как для нижнего, так и для верхнего предела. Это означает, что микросферы ниже или выше этих отсечений, соответственно, не учитываются (и не включаются в расчет концентрации микросфер), а их диаметр не измеряется (и не учитывается при определении среднего диаметра микросфер). Измерительная аппаратура, используемая в примерах, имела 1,0-микронный нижний предел отсечения и 40,0-микронный верхний предел отсечения. Большинство учитываемых или выявляемых микросфер с использованием нижнего предела отсечения 1,0 микрона и верхнего предела отсечения 40,0 микрона имеют диаметр в диапазоне 1,0-20,0 микрона. Следует учитывать, что в настоящем раскрытии термины

«размер микросфер» и «диаметр микросфер» используются взаимозаменяемо. Таким образом, если не указано иное, размер микросфер относится к диаметру микросфер.

Композиция, представленная в настоящем документе, в том числе активированные композиции, может дополнительно содержать другие компоненты, такие как стабилизирующие материалы или средства, модификаторы вязкости, регулирующие тоничность средства, покрывающие средства и суспендирующие средства. Примеры каждого класса средств известны в уровне техники и представлены, например, в патенте США № 5656211, в опубликованной РСТ заявке WO 99/36104, а также в опубликованной заявке на выдачу патента США № 2013/0022550.

Композиция, представленная в настоящем документе, в том числе активированные композиции, может содержать один или несколько буферов, в том числе без ограничения ацетатный буфер, бензоатный буфер, салицилатный буфер и/или фосфатный буфер.

pH композиции может составлять от приблизительно 6,2 до приблизительно 6,8. В некоторых случаях pH может находиться в диапазоне от 5 до 6,5, или в диапазоне от 5,2 до 6,3, или в диапазоне от 5,5 до 6,1, или в диапазоне от 5,6 до 6, или в диапазоне от 5,65 до 5,95. В следующих случаях pH может находиться в диапазоне от приблизительно 5,7 до приблизительно 5,9 (например, +/- 0,1, или +/- 0,2, или +/- 0,3 либо на одном, либо на обоих концах диапазона). В другом случае pH может составлять приблизительно 5,8 (например, 5,8 +/- 0,15 или 5,8 +/- 0,1). Такие диапазоны могут быть достигнуты, например, с использованием состава ацетатного буфера, разбавленного водой.

Согласно некоторым вариантам осуществления каждый мл конечной композиции (после разбавления неводного раствора водным разбавителем) содержит 0,75 мг липидов (состоящих из 0,045 мг DPPA, 0,401 мг DPPC и 0,304 мг DPPE-PEG5000), 103,5 мг пропиленгликоля, 126,2 мг глицерина, 2,34 мг натрия фосфата одноосновного моногидрата, 2,16 мг натрия фосфата двухосновного гептагидрата и 4,87 мг натрия хлорида в воде.

Согласно некоторым вариантам осуществления каждый мл конечной композиции содержит приблизительно 0,43 мг липидов (состоящих из 0,0225 мг DPPA, 0,2 мг DPPC и 0,152 мг DPPE-PEG5000), 103,5 мг пропиленгликоля, 126,2 мг глицерина, 2,34 мг натрия фосфата одноосновного моногидрата, 2,16 мг натрия фосфата двухосновного гептагидрата и 4,87 мг натрия хлорида в воде.

Согласно некоторым вариантам осуществления каждый мл конечной композиции (после разбавления неводного раствора солевым раствором) содержит 0,75 мг липидов (состоящих из 0,045 мг DPPA, 0,401 мг DPPC и 0,304 мг DPPE-PEG5000), 103,5 мг пропиленгликоля, 126,2 мг глицерина, 0,074 мг натрия ацетата, 0,006 мг уксусной кислоты и 7,20 мг натрия хлорид в воде.

Примеси и стабильность

Настоящее изобретение, кроме того, относится к способу оценивания содержания примесей в липидном растворе, таком как неводный раствор. Такой способ предусматривает анализ липидного раствора на предмет присутствия примесей с использованием любого из ряда аналитических способов, таких как без ограничения выявления заряженного аэрозоля (CAD), необязательно в сочетании с одной или несколькими методиками отделения, такими как HPLC. Липидным раствором может быть неводный раствор, содержащий липиды и пропиленгликоль, или глицерин, или пропиленгликоль и глицерин. Липидный раствор может дополнительно содержать буфер, такой как не являющийся фосфатным буфер. Липидный раствор может дополнительно содержать соль(и) и/или воду. Наличие примеси выше порогового уровня может означать, что липидный раствор не хранили надлежащим образом, что его стабильность ухудшена, и, таким образом, что липидный раствор следует выбросить и не вводить субъекту. Такой способ может быть использован в целях контроля качества.

В примере 2 представлен способ измерения содержания примесей в неводном растворе. Содержание примесей представляют в виде % примеси относительно вводимого (или теоретического, или номинального) количества липида, что означает, что примесь выражается в виде процентного отношения суммарного количества присутствующего липида при отсутствии потери липида.

Модифицированные липидные составы могут содержать менее 10%, менее 5% или менее 2% примесей при хранении при комнатной температуре в течение периода времени, в том числе, например, приблизительно 1 месяц, приблизительно 2 месяца, приблизительно 3 месяца, приблизительно 6 месяцев или дольше, в том числе приблизительно 1 год или приблизительно 2 года.

Следует отметить, что модифицированные липидные составы могут содержать меньшее количество примесей, чем DEFINITY[®], при хранении обоих составов при комнатной температуре (т.е. если композицию и DEFINITY[®] хранят при комнатной

температуре). Такое снижение уровня чистоты может составлять приблизительно 1%, приблизительно 2%, приблизительно 3%, приблизительно 4% или приблизительно 5% или больше.

Применения и использования

Настоящее изобретение относится к способам применения микросфер и композиций микросфер. Микросферы предусматриваются как ультразвуковые контрастные средства, и они могут быть использованы *in vivo* для людей, или отличных от человека субъектов, или *in vitro*. Композиции в соответствии с настоящим изобретением могут быть использованы для диагностических, или терапевтических целей, или для объединенных диагностических и терапевтических целей.

При использовании в качестве ультразвуковых контрастных средств для субъектов-людей композиции активируют, как описывается в настоящем документе, для формирования значительного числа микросфер, необязательно разбавленных в большем объеме, и вводят одной или несколькими болюсными инъекциями или непрерывной инфузией. Введение, как правило, представляет собой внутривенную инъекцию. Сразу же после этого осуществляют визуализацию. Применение визуализации может быть направлено на сердце, или оно может предусматривать другой участок организма, который является чувствительным к ультразвуковой визуализации. Визуализацией может быть визуализация одного или нескольких органов или участков организма, в том числе без ограничения сердца, кровеносных сосудов, сердечной сосудистой сети и печени.

Субъекты в соответствии с настоящим изобретением включают в себя без ограничения людей и животных. Люди являются предпочтительными в некоторых случаях.

Липидные композиции вводят в эффективных количествах. Эффективным количеством будет такое количество, которое облегчает или обеспечивает предполагаемый *in vivo* ответ и/или применение. В контексте применения в визуализации, такого как ультразвуковое применение, эффективным количеством может быть количество липидных микросфер, которое обеспечивает визуализацию субъекта или участка у субъекта.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Получение образца

Коммерческое, одобренное FDA ультразвуковое контрастное средство DEFINITY® (Lantheus Medical Imaging) использовали для сравнения. Каждый флакон содержит следующее: 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (DPPC; 0,401 мг/мл), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидную кислоту (DPPA; 0,045 мг/мл) и N-(метоксиполиэтиленгликоль5000 карбамоил)-1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтанолламин (MPEG5000-DPPE; 0,304 мг/мл) в матрице из 103,5 мг/мл пропиленгликоля, 126,2 мг/мл глицерина и 2,34 мг/мл натрия фосфата одноосновного моногидрата, 2,16 мг/мл натрия фосфата двухосновного гептагидрата и 4,87 мг/мл натрия хлорида в воде для инъекции. pH составляет 6,2-6,8. Номинальный объем наполнения липидного раствора составляет приблизительно 1,76 мл в стеклянном флаконе Wheaton 2 см³ с приблизительным объемом 3,80 мл и, таким образом, со свободным пространством над продуктом приблизительно 2,04 мл, содержащим перфторпропановый газ (PFP, 6,52 мг/мл).

Новые составы получали следующим образом.

Смешанный липид (LB), содержащий DPPC, DPPA, MPEG500 DPPE, получали, как описано в патенте США № 8084056, содержание которого тем самым включено в настоящий документ посредством ссылки и может быть использовано для процесса в соответствии с настоящим изобретением. Составы LB получали путем смешивания порошка LB в пропиленгликоле (PG), или в пропиленгликоле/глицерине (PG/G) 1:1 объем/объем, или в глицериновом носителе при 55°C. В некоторых исследованиях в носителе растворяли 0,005 М ацетатного, бензоатного или салицилатного буфера, полученного при отношениях соли к кислоте 90/10, 75/25, 50/50, 25/79 и 10/90. В некоторых случаях фосфатный буфер включали в водный или солевой раствор.

Пример 2. Стабильность липида

Образцы смешанного липида нового состава из примера 1 в пропиленгликоле помещали в стеклянные флаконы Wheaton 2 см³, свободный объем замещали PFP газом, вставляли серую пробку Butyl Lyo West и флакон обжимали алюминиевым колпачком. Флаконы хранили в камере-имитаторе внешних воздействий при 25°C для представления хранения при комнатной температуре или нагревали до 130°C в сушильном шкафу для представления конечной стерилизации. В соответствующие

моменты времени флаконы с образцами забирали с хранения, разгерметизировали, добавляли солевой раствор во флакон и смешивали для обеспечения гомогенного раствора. Образец переносили во флакон для HPLC и анализировали с помощью отделения обращенно-фазовой HPLC и выявления заряженного аэрозоля Corona (CAD; HPLC With Charged Aerosol Detection for the Measurement of Different Lipid Classes, I.N. Acworth, P.H. Gamache, R. McCarthy and D. Asa, ESA Biosciences Inc., Chelmsford, MA, USA; J. Waraska and I.N. Acworth, American Biotechnology Laboratory, January 2008) на предмет примесей.

Результаты для флаконов DEFINITY®, хранящихся 3 месяца при 25°C, представлены для сравнения. Для анализа использовали градиентную обращенно-фазовую HPLC с выявлением по светорассеянию испаренного образца (ELSD) с использованием колонки C18 и подвижной фазы, содержащей воду, метанол, аммония ацетат и триэтиламин. В таблицах 1 и 2 представлена суммарная примесь в виде процентного отношения суммарного содержания липида во флаконе при 25°C и 130°C.

Таблица 1. Данные по примеси для состава смешанного липида (LB) в пропиленгликоле (PG), хранящегося при 25°C

	7,50 мг смешанного липида/мл PG*	DEFINITY® (0,75 мг смешанного липида/мл)
Число суток при 25°C	96 суток (приблизительно 3 месяца)	3 месяца
Суммарная примесь в процентах	2,1	11,86

* 177 мг PG, содержащего LB (0,72 мас. % LB; отношение 1:138 для LB:PG).

Таблица 2. Данные по примеси для состава смешанного липида (LB) в пропиленгликоле (PG) и DEFINITY®, обрабатываемых при 130°C в течение 30 минут

	7,50 мг смешанного липида/мл PG*	3,75 мг смешанного липида/мл PG**	DEFINITY® (0,75 мг смешанного липида/мл)
Суммарная примесь в процентах	0,334	0,818	4,230

* 89 мг PG, содержащего LB (0,72 мас. % LB; отношение 1:138 для LB:PG).

** 177 мг PG, содержащего LB (0,36 мас. % LB; отношение 1:276 для LB:PG).

На фиг. 1 показаны уровни суммарной примеси как функция времени для DEFINITY® при 2-8°C и 25°C и для 7,5 мг LB/мл PG при 25°C. Уровень суммарной примеси в DEFINITY®, хранящемся при 2-8°C, был подобен таковому состава 7,5 мг LB/мл PG, хранящегося при 25°C. Если DEFINITY® хранили при 25°C, однако, уровень суммарной примеси резко увеличивался.

Эти данные демонстрируют, что состав 7,5 мг LB/мл PG является гораздо более надежным, чем состав DEFINITY® при более высоких температурах. Это наблюдение было неожиданным.

Пример 3. Стабильность состава смешанный липид/пропиленгликоль/глицерин (LB/PG/G)

Образцом смешанного липида нового состава из примера 1 в пропиленгликоле/глицерине 1:1 (объем:объем) заполняли стеклянный флакон Wheaton 2 см³, свободный объем замещали PFP газом, вставляли серую пробку Butyl Lyo West и флакон обжимали алюминиевым колпачком. Флаконы хранили в камере-имитаторе внешних воздействий при 25°C для представления хранения при комнатной температуре или нагревали до 130°C в печи для представления конечной стерилизации. Флаконы, хранящиеся при 25°C, получали и анализировали, как описано в примере 2. Флаконы, нагреваемые при 130°C, получали, как описано в примере 2, но анализировали с использованием системы HPLC, как описано для DEFINITY® в примере 2. В таблицах 3 и 4 представлена суммарная примесь в виде процентного отношения суммарного содержания липида во флаконе при 25°C и 130°C. Результаты для DEFINITY®, анализируемые как описано в примере 2, представлены для сравнения.

Таблица 3. Данные по примеси для состава 3,75 мг смешанного липида (LB) на мл PG/G, хранящегося 25°C

	3,75 мг смешанного липида/мл PG/G*	DEFINITY® (0,75 мг смешанного липида/мл)
Число суток при 25°C	87 суток (приблизительно 3 месяца)	3 месяца
Суммарная примесь в процентах	1,747	11,86

* 391 мг PG/G, содержащего LB (0,33 мас. % LB:44,9 мас. % PG:54,8 мас. % G; отношение 1:138:168 для LB:PG:G).

Таблица 4. Данные по примеси для состава смешанного липида (LB) в PG/G и DEFINITY[®], обрабатываемого при 130°C в течение 30 минут

	3,75 мг смешанного липида/мл PG/G*	DEFINITY[®] (0,75 мг смешанного липида/мл)
Суммарная примесь в процентах	2,558	4,150

* 391 мг PG/G, содержащего LB (0,33 мас. % LB:44,9 мас. % PG:54,8 мас. % G; отношение 1:138:168 для LB:PG:G).

На фиг. 2 показаны уровни суммарной примеси как функция времени для DEFINITY[®], хранящегося при 2-8°C и 25°C, и для состава 3,75 мг LB/мл PG/G, хранящегося при 25°C. Уровень суммарной примеси в DEFINITY[®], хранящемся при 2-8°C, был подобен таковому состава 3,75 мг LB/мл PG/G, хранящегося при 25°C. Если DEFINITY[®] хранили при 25°C, однако, уровень суммарной примеси резко увеличивался.

Эти данные демонстрируют, что состав 3,75 мг LB/мл PG/G является гораздо более надежным, чем состав DEFINITY[®] при более высоких температурах. Это наблюдение было неожиданным.

Пример 4. Стабильность забуференного состава смешанный липид/пропиленгликоль/глицерин

Образцом смешанного липида нового состава из примера 1 в пропиленгликоле/глицерине 1:1 (объем:объем), содержащего 0,005 М ацетатного (75/25 натрия ацетата/уксусной кислоты), бензоатного (75/25 натрия бензоата/бензойной кислоты) или салицилатного (90/10 натрия салицилата/салициловой кислоты) буфера, заполняли стеклянный флакон Wheaton 2 см³, свободный объем замещали PFP газом, вставляли серую пробку Butyl Lyo West и флакон обжимали алюминиевым колпачком. Флаконы, хранящиеся при 25°C, получали и анализировали, как описано в примере 2. Результаты для DEFINITY[®], анализируемые как описано в примере 2, представлены для сравнения. В таблице 5 представлена суммарная примесь в виде процентного отношения суммарного содержания липида во флаконе при 25°C.

На фиг. 3 показаны уровни суммарной примеси как функция времени. Если DEFINITY[®] хранили при 25°C, однако, уровень суммарной примеси резко увеличивался. Эти данные демонстрируют, что состав 3,75 мг забуференного LB/мл

PG/G является гораздо более надежным, чем состав DEFINITY[®], при более высоких температурах. Это наблюдение было неожиданным.

Таблица 5. Данные по примеси для состава 3,75 мг смешанного липида/мл забуференного PG/G, хранящегося при 25°C

	Состав 3,75 мг смешанного липида/мл забуференного* PG/G			DEFINITY [®] (0,75 мг смешанного липида/мл)
	75/25 ацетат	75/25 бензоат	90/10 салицилат	
Число суток при 25°C	50	50	50	2 месяца
Суммарная примесь	0,562	0,658	1,475	8,94

* 5 мМ буфера в 391 мг PG/G, содержащего LB (0,33 мас. % LB; 44,9 мас. % PG; 54,8 мас. % G; отношение 1:138:168 для LB:PG:G). Отношения представляют натрия ацетат к уксусной кислоте, натрия бензоат к бензойной кислоте, натрия салицилат к салициловой кислоте.

Пример 5. Стабильность состава смешанного липида с глицерином

Образцом смешанного липида нового состава из примера 1 в глицерине заполняли стеклянный флакон HPLC, свободный объем замещали PFP газом и флакон закрывали навинчивающимся колпачком, содержащим перегородку. Флаконы, хранящиеся при 25°C, получали и анализировали, как описано в примере 2.

Результаты для DEFINITY[®], анализируемые как описано в примере 2, представлены для сравнения. В таблице 6 представлены результаты суммарной примеси для данного эксперимента. Эти данные демонстрируют, что состав 7,5 мг забуференного LB/мл G является гораздо более надежным, чем состав DEFINITY[®], при более высоких температурах. Это наблюдение было неожиданным.

Таблица 6. Данные по примеси для состава* 7,50 мг смешанного липида/мл глицерина (G), хранящегося при 25°C

	7,5 мг смешанного липида/мл G	DEFINITY [®] (партия № 4519M) (0,75 мг смешанного липида/мл)
Число суток при 25°C	149 суток (приблизительно 5 месяцев)	6 месяцев
Суммарная примесь в процентах	2,478	23,17

* 215 мг G, содержащего LB, 0,59 мас. % LB (отношение 1:168 для LB:G).

Пример 6. Стабильность порошка смешанного липида

Порошок LB хранили в бутылке из желтого стекла с покрытым PTFE колпачком при 25°C. Образцы получали в растворе метанола (50%), пропиленгликоля (10%), глицерина (10%), аммония ацетата (30%, 5 мМ). Раствор переносили во флакон для HPLC и анализировали с использованием градиентной обращенно-фазовой HPLC с выявлением по светорассеянию испаренного образца (ELSD) с использованием колонки C18 и подвижной фазы, содержащей воду, метанол, аммония ацетат и триэтиламин.

В таблице 7 представлены данные стабильности для порошка смешанного липида по сравнению с DEFINITY[®], хранящимся при 25°C.

Эти данные демонстрируют, что порошок смешанного липида является гораздо более надежным, чем состав DEFINITY[®], при более высоких температурах.

Таблица 7. Данные по примеси для порошка смешанного липида

	Порошок LB	DEFINITY [®] (0,75 мг смешанного липид/мл)
	25°C	25°C
Число суток при 25°C	87 суток (приблизительно 3 месяца)	3 месяца
Суммарная примесь в процентах	1,747	11,86

Пример 7. Активация DEFINITY[®]

Коммерчески доступное, одобренное FDA ультразвуковое контрастное средство DEFINITY[®] (Lantheus Medical Imaging, Inc.) приводили в активную форму («активировали») посредством механизированного встряхивания (описанного в патенте США № 6039557, содержание которого тем самым включено в настоящий документ посредством ссылки и может быть использовано для процесса в соответствии с настоящим изобретением) раствора PFP/липид с использованием VIALMIX[®]. Это приводило к включению газа в липидные микросферы и обеспечивало активный продукт (см. предписывающую информацию для DEFINITY[®]). Оптимальная активация с помощью VIALMIX[®] для DEFINITY[®] постоянно обеспечивала наполненные газом микросферы, которые могли быть анализировали на предмет количества и

распределения размеров с использованием устройства для измерения размера частиц (Malvern FPIA-3000 Sysmex) при разбавлении соответствующим раствором для покрытия оболочкой (см. таблицу 8) с нижним и верхним пределами отсечения 1 и 40 микрон.

Таблица 8. Количество и размер пузырьков DEFINITY®, анализируемые с использованием Malvern FPIA-3000 Sysmex

Образец DEFINITY®	Средний диаметр микросфер (микрон) ^a	Микросфер на мл ($\times 10^9$) ^b
Образец 1	1,7	2,67
Образец 2	1,6	3,20
Образец 3	1,7	3,20
Образец 4	1,7	1,75
Образец 5	1,6	2,77
Образец 6	1,6	2,97
Среднее	1,7	2,76

^a Средний диаметр микросфер для микросфер, варьирующих от 1 до 40 микрон.

^b Средняя концентрация микросфер для микросфер, варьирующих от 1 до 40 микрон.

Акустическое затухание измеряли для отобранных образцов с использованием клинической системы ультразвуковой визуализации Philips Sonos 5500. Образцы разбавляли 1:7,7 (1,3 мл плюс 8,7 мл солевого раствора) в 10-мл шприце. 200-микролитровые образцы из этого шприца отмеряли пипеткой в стакан, содержащий 200 мл 0,9% солевого раствора при комнатной температуре. 2-см стержень магнитной мешалки поддерживал раствор однородным, а датчик s3 ультразвуковой системы располагали в верхней части стакана, только в растворе и на 8,9 см выше верхнего края стержня магнитной мешалки. Затем в цифровом виде получали изображения при 5 секундах 120 Гц и записывали на диск. Систему US использовали в режиме IBS, TGC устанавливали на минимальном значении для всех глубин, а LGC отключали. Механический индекс (MI) составлял 0,2 с мощностью, установленной на 18 дБ ниже максимума. Усиление приема фиксировали на уровне 90, а сжатие равнялось 0. Для каждого тестируемого образца сбор данных US получали до (контроль) и после инъекции образца. Измерения проводили через 20, 60 и 120 секунд после введения образца в стакан.

Анализ изображений выполняли с использованием Philips QLab, которое считывало файлы, полученные системой US, и вычисляло значение в дБ для режима IBS. Области интереса очерчивали по стержню магнитной мешалки, а значения в дБ

усредняли по полному 5-секундному сбору данных (приблизительно 360 видеок кадров). Измерения затухания получали путем вычитания значения ROI образца из пустого значения ROI (оба в дБ). Расстояние между датчиком US и верхним краем стержня магнитной мешалки делили на два с получением затухания в дБ/см. Конечные значения получали путем применения линейной регрессии образцов, взятых в соответствии со временем после введения в химический стакан. Используемые значения получали из пересечения линии регрессии с осью у.

Таблица 9. Измерение акустического затухания DEFINITY®^a

	Флакoн 1	Флакoн 2	Флакoн 3	Среднее значение	SD
DEFINITY®	2,06	1,97	2,30	2,11	0,17

^a Акустическое затухание DEFINITY® определяли с использованием Philips Sonos 5500.

Пример 8. Активация неводных составов

Новые составы смешанного липида, описанного в примере 1, отвечивали в стеклянный флакон Wheaton 2 см³, свободный объем замещали PFP газом, вставляли серую пробку Butyl Lyo West и флакон обжимали алюминиевым колпачком, при необходимости добавляли разбавитель. Разбавитель вводили через пробку при необходимости и флакон автоматически встряхивали с использованием VIALMIX® в течение времени, необходимого для осуществления оптимальной активации продукта. Определяли количество и распределение микросфер, и некоторые активированные составы проверяли на предмет затухания ультразвука способами, описанными в примере 7.

Таблица 10. Характеристики микросфер для состава 7,5 мг смешанного липида/мл PG с разбавителем^a состава, добавленным непосредственно перед активацией

Образец	Средний диаметр микросфер (микроны)	Микросфер на мл (x 10 ⁹)
Состав LB/PG (добавляли разбавитель, затем закрывали) ^b	1,82	1,76
Состав LB/PG (закрывали, затем вводили разбавители через пробку) ^c	1,82	1,92

^a Разбавитель состава содержал глицерин, фосфатный буфер и солевой раствор, чтобы соответствовать композиции флакона DEFINITY® при разбавлении состава.

^b В состав 177 мг пропиленгликоля (0,72 мас. % LB; отношение 1:138 для LB:PG) добавляли 1,59 мл разбавителя^a, свободный объем замещали PFP, 2-мл флакон закупоривали серой пробкой Butyl West, обжимали алюминиевым колпачком, флакон активировали в течение 45 секунд с помощью VIALMIX[®] и тестировали на предмет количества и среднего размера микросфер, как описано в примере 7.

^c В 2-мл флаконе с составом 177 мг пропиленгликоля (0,72 мас. % LB; отношение 1:138 для LB:PG) свободный объем замещали PFP, а флакон закупоривали и обжимали. Разбавитель^a, 1,59 мл, вводили через пробку во флакон с использованием одноразового шприца, флакон сразу же активировали в течение 45 секунд с помощью VIALMIX[®], а затем тестировали, как описано в примере 7.

Таблица 11. Характеристики микросфер и акустическое затухание для состава 7,5 мг смешанного липида/мл PG с солевым раствором, добавленным непосредственно перед активацией

Образец	Средний диаметр микросфер (микроны)	Микросфер на мл ($\times 10^9$)	Среднее (SD) акустическое затухание ^b (дБ/см)
Состав LB/PG (добавляли солевой раствор, затем закрывали) ^a	1,84	1,88	2,13 (0,34)

^a В состав 177 мг пропиленгликоля (0,72 мас. % LB; отношение 1:138 для LB:PG) добавляли 1,59 мл 0,9% солевого раствора, свободный объем замещали PFP, 2-мл флакон закупоривали серой пробкой Butyl West, обжимали алюминиевым колпачком, флакон активировали и тестировали на предмет количества и среднего размера микросфер, как описано в примере 7.

^b Акустическое затухание определяли, как описано в примере 7.

Таблица 12. Характеристики микросфер и акустическое затухание для составов 7,5 мг смешанного липида/мл PG/G

Образец	Средний диаметр микросфер (микроны)	Микросфер на мл ($\times 10^9$)	Среднее (SD) акустическое затухание ^c (дБ/см)
В состав LB/PG/G добавляли солевой раствор, а затем активировали ^a	1,68	$2,65 \times 10^9$	Не определяли
Состав LB/PG/G активировали, а затем разбавляли солевым раствором ^b	1,82	$2,23 \times 10^9$	2,12 (0,27)

^a В состав 391 мг пропиленгликоля и глицерина (0,33% LB; 44,9% PG:54,8% G; отношение 1:138:168 для LB:PG:G) добавляли 1,38 мл 0,9% солевого раствора, свободный объем замещали PFP, 2-мл флакон закупоривали серой пробкой Butyl West, обжимали алюминиевым колпачком, флакон активировали и тестировали на предмет количества и среднего размера микросфер, как описано в примере 7.

^b Во флаконе с составом 391 мг пропиленгликоля и глицерина (0,33% LB; 44,9% PG:54,8% G; отношение 1:138:168 для LB:PG:G) свободный объем замещали PFP и флакон закупоривали и обжимали, как описано в ссылке ^a выше. Солевой раствор, 1,38 мл, вводили во флакон с использованием одноразового шприца, флакон сразу же активировали, а затем тестировали, как описано в примере 7.

^c Акустическое затухание определяли, как описано в примере 7.

Таблица 13. Характеристики микросфер для состава 7,5 мг смешанного липида/мл забуференного (5 мМ) PG/G с солевым разбавителем, добавленным после активации

Отношение натрия ацетата к уксусной кислоте (суммарного ацетата)	Средний диаметр микросфер (микроны)	Микросфер на мл (x 10 ⁹)
90:10	1,72	3,37 x 10 ⁹
80:20	1,70	4,69 x 10 ⁹
70:30	1,74	3,83 x 10 ⁹
50:50	1,71	3,67 x 10 ⁹
10:90	1,82	3,01 x 10 ⁹

^a 2-мл флакон с составом 391 мг забуференного пропиленгликоля и глицерина (0,33% LB; 44,9% PG:54,8% G; отношение 1:138:168 для LB:PG:G) закупоривали серой пробкой Butyl West, обжимали алюминиевым колпачком, флакон активировали, добавляли 1,38 мл 0,9% солевого раствора, содержимое флакона смешивали и тестировали на предмет количества и среднего размера микросфер, как описано в примере 7.

Данные исследования демонстрируют, что смешанный липид, составленный в а) PG, б) PG/G, в) забуференном PG/G, может быть активирован с образованием микросфер, которые обладают характеристиками и акустическим затуханием, эквивалентными таковым для активированного DEFINITY[®] (как показано в примере 7), путем простого добавления разбавителя и встряхивания в VIALMIX[®]. Это свидетельствует о том, что предварительное составление с водным разбавителем не требуется, и достаточно простого добавления. Более того, разбавитель может быть

добавлен в липидный состав путем введения через пробку флакона. Кроме того, смешанный липид в PG/G может быть активирован с образованием микросфер, которые обладают характеристиками и акустическим затуханием, эквивалентными таковым для активированного DEFINITY® (как показано в примере 7), путем встряхивания перед добавлением разбавителя. Эти результаты являются неожиданными.

Пример 9. Активация отдельных липидов или смешанного липида

Состав (состав отдельных липидов) получали путем смешивания отдельных фосфолипидов (DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE) в пропиленгликоле при отношении 0,045:0,401:0,304 (масса:масса:масса) (подобном отношении для смешанного липида). Полученный в результате состав 7,5 мг/мл отдельного липида в пропиленгликоле добавляли в разбавитель (содержащий глицерин, фосфатный буфер и солевой раствор, чтобы соответствовать композиции флакона DEFINITY®) и смешивали с получением конечной концентрации суммарного липида 0,75 мг/мл. 1,7-мл аликвоту добавляли в стеклянный флакон Wheaton 2 см³, свободный объем замещали PFP газом, вставляли серую пробку Butyl Lyo West и флакон обжимали алюминиевым колпачком. Флакон активировали с помощью VIALMIX® и анализировали с использованием Sysmex FPIA 3000 на предмет количества микросфер и среднего размера микросфер.

Таблица 14. Характеристики микросфер для состава 7,5 мг отдельного липида/мл PG

	Средний диаметр микросфер (микроны)	Микросфер на мл (x 10⁹)
Состав отдельного липида	1,7	2,46

Данное исследование демонстрирует, что смешивание отдельных липидов в PG без получения смешанного липида может давать состав, который обеспечивает смешивание с разбавителем с образованием раствора, который может быть активирован с получением микросфер с характеристиками, эквивалентными таковым для активированного DEFINITY® (по сравнению с примером 7).

В другом эксперименте смешанный липид отвешивали в стеклянный флакон Wheaton 2 см³, добавляли матрицу (PG/G/солевой раствор) во флакон, свободный объем замещали PFP газом, вставляли серую пробку Butyl Lyo West, флакон обжимали алюминиевым колпачком, а затем активировали при 25°C с помощью VIALMIX® и

анализировали с использованием Sysmex FPIA 3000 на предмет количества микросфер и среднего размера микросфер. Результаты представлены в таблице 15.

Таблица 15. Характеристики микросфер для порошка смешанного липида (1,275 мг) во флаконе со свободным объемом, заполненным PFP

	Средний диаметр микросфер (микроны)	Микросфер на мл (x 10 ⁹)
Состав смешанного липида	1,63	4,10

Данное исследование демонстрирует, что порошок смешанного липида можно отвешивать во флакон, добавлять разбавитель, свободный объем замещать PFP и флакон активировать с получением микросфер с характеристиками, эквивалентными таковым для активированного DEFINITY[®] (по сравнению с примером 7). Это показывает, что липиды не нуждаются в предварительном составлении для обеспечения активации.

Пример 10. Активация при различных концентрациях липида

Смешанный липид, как описано в примере 1, использовали для получения составов при варьирующих концентрациях суммарного смешанного липида путем смешивания различных количеств порошка LB либо в пропиленгликоле (PG), либо в пропиленгликоле/глицерине (PG/G) 1:1 объем/объем. Каждый липидный состав отвешивали в стеклянных флаконах Wheaton 2 см³, добавляли разбавитель при необходимости, свободный объем замещали PFP газом, вставляли серую пробку Butyl Luo West и флакон обжимали алюминиевым колпачком. Флаконы автоматически встряхивали с использованием VIALMIX[®] для активации продукта и добавляли разбавитель при необходимости через пробку с использованием шприца, оснащенного иглой. Определяли количество и распределение микросфер, как описано в примере 7.

Таблица 16. Характеристики микросфер с различными составами липида мг/мл PG^a

Концентрация смешанного липида в составе	Время разбавления	Концентрация смешанного липида после разбавления	Микросфер на мл (x 10 ⁹)	Диаметр (мкм)
DEFINITY [®] , 0,75 мг смешанного липида на мл ^d	не предусмотрено	не предусмотрено	3,05	1,66
7,5 мг смешанного липида/мл PG	Перед активацией ^b	0,75 мг/мл	4,55	1,63

7,5 мг смешанного липида/мл PG	Перед активацией ^c	0,75 мг/мл	4,65	1,72
DEFINITY[®], разбавленный 0,375 мг смешанного липида на мл^d	Перед активацией	0,375 мг/мл	1,38	1,66
3,75 мг смешанного липида/мл PG	Перед активацией ^b	0,375 мг/мл	2,24	1,7
3,75 мг смешанного липида/мл PG	Перед активацией ^c	0,375 мг/мл	2,69	1,72
DEFINITY[®], разбавленный 0,1875 мг смешанного липида на мл^d	Перед активацией	0,1875 мг/мл	0,54	1,75
1,875 мг смешанного липида/мл PG	Перед активацией ^b	0,1875 мг/мл	0,892	1,72
1,875 мг смешанного липида/мл PG	Перед активацией ^c	0,1875 мг/мл	1,25	1,74

^a Флаконы (флаконы Wheaton 2 см³) готовили путем отвешивания 177 мг пропиленгликоля, содержащего 1,875, 3,75 или 7,5 мг смешанного липида/мл (отношения 1:552; 1:276 и 1:138 для LB:PG, соответственно).

^b Содержимое флаконов разбавляли 8:1 (объем:объем) солевым раствором и глицерином до конечного объема 1,7 мл непосредственно перед активацией. Затем воздух свободного объема заменяли на PFP, закупоривали серой пробкой Butyl West, флакон обжимали алюминиевым колпачком, активировали и тестировали на предмет количества и среднего размера микросфер, как описано в примере 7.

^c Содержимое флаконов разбавляли солевым раствором до конечного объема 1,7 мл непосредственно перед активацией. Затем воздух свободного объема заменяли на PFP, закупоривали серой пробкой Butyl West, флакон обжимали алюминиевым колпачком, активировали и тестировали на предмет количества и среднего размера микросфер, как описано в примере 7.

^d Флаконы (флаконы Wheaton 2 см³) получали путем разбавления DEFINITY[®] матрицей состава 1 к 4 или 1 к 2 (неразбавленный DEFINITY[®] также тестировали), газ свободного объема заменяли на PFP, флаконы закупоривали и обжимали алюминиевым

колпачком, активировали и тестировали на предмет количества и среднего размера микросфер, как описано в примере 7.

Таблица 17. Характеристики микросфер с различными составами липида мг/мл PG/G^a

Концентрация смешанного липида в составе	Время разбавления	Концентрация смешанного липида после разбавления	Микросфер на мл (x 10 ⁹)	Диаметр (мкм)
DEFINITY[®], 0,75 мг смешанного липида на мл^d	не предусмотрено	не предусмотрено	3,05	1,66
3,75 мг смешанного липида/мл PG/G	Перед активацией ^b	0,75 мг/мл	4,71	1,66
3,75 мг смешанного липида/мл PG/G	После активации ^c	0,75 мг/мл	3,12	1,60
DEFINITY[®], разбавленный до 0,375 мг смешанного липида на мл^d	Перед активацией	0,375 мг/мл	1,38	1,66
1,875 мг смешанного липида/мл PG/G	Перед активацией ^b	0,375 мг/мл	2,45	1,74
1,875 мг смешанного липида/мл PG/G	После активации ^c	0,375 мг/мл	1,73	1,66
DEFINITY[®], разбавленный до 0,1875 мг смешанного липида на мл^d	перед активацией	0,1875 мг/мл	0,54	1,75
0,9375 мг смешанного липида/мл PG/G	Перед активацией ^b	0,1875 мг/мл	1,00	1,72
0,9375 мг смешанного липида/мл PG/G	После активации ^c	0,1875 мг/мл	0,41	1,89

^a Флаконы (флаконы Wheaton 2 см³) готовили путем отвешивания 391 мг пропиленгликоля и глицерина 1:1 (объем/объем), содержащих 0,9375, 1,875 или 3,75 мг смешанного липида/мл (отношения 1:552:672; 1:276:336 и 1:138:168 для LB:PG:G, соответственно).

^b Содержимое флаконов разбавляли солевым раствором до конечного объема 1,7 мл непосредственно перед активацией. Затем воздух свободного объема заменяли на PFP, закупоривали серой пробкой Butyl West, флакон обжимали алюминиевым

колпачком, активировали и тестировали на предмет количества и среднего размера микросфер, как описано в примере 7.

^c Воздух свободного объема заменяли на PFP, флакон закупоривали серой пробкой Butyl West, обжимали алюминиевым колпачком и активировали. Добавляли солевой раствор до конечного объема 1,7 мл и флакон тестировали на предмет количества и среднего размера микросфер, как описано в примере 7.

^d Флаконы (флаконы Wheaton 2 см³) готовили путем разбавления DEFINITY[®] матрицей состава 1 к 4 или 1 к 2 (неразбавленный DEFINITY[®] также тестировали), газ свободного объема заменяли на PFP, флаконы закупоривали и обжимали алюминиевым колпачком, активировали и тестировали на предмет количества и среднего размера микросфер, как описано в примере 7.

Данные исследования показали, что составы смешанного липида с различными концентрациями липидов при активации дают пропорциональные количества микросфер (на данный объем, 1 мл). Размер микросфер был эквивалентен таковому активированного DEFINITY[®], а количество микросфер подобно или превышает таковое активированного DEFINITY[®] или эквивалентной разбавленной формы. Неожиданной была способность формировать микросферы с характеристиками, эквивалентными активированному DEFINITY[®], с рядом различных концентраций смешанного липида в PG или PG/G. Способность достигать этого за счет активации смешанного липида в PG/G перед добавлением разбавителей была еще более удивительной.

Пример 11. Контейнеры

Новыми липидными составами или DEFINITY[®] заполняли различные контейнеры, в том числе флаконы, шприцы и гибкие пластиковые тубы, которые затем активировали. Во всех исследованиях соответствующее количество липидного состава помещали в контейнер, свободный объем заменяли PFP, контейнер закупоривали и состав активировали.

Таблица 18. Характеристики микросфер для составов смешанного липида в PG или PG/G, активированных в 2-мл флаконе Schott^a

Масса заполнения	Время разбавления	Объем разбавления солевым раствором (мл)	Средний диаметр микросфер (микроны)	Микросфер на мл (x 10 ⁹)
55 мг LB/мл PG	7,5 мг Перед активацией	0,50	1,52	6,23

89 мг 7,5 мг LB/мл PG	Перед активацией	0,80	1,52	4,83
134 мг 7,5 мг LB/мл PG	Перед активацией	1,20	1,61	5,29
177 мг 7,5 мг LB/мл PG	Перед активацией	1,59	1,63	5,00
122 мг 3,75 мг LB/мл PG/G	Перед активацией	0,43	1,57	5,43
196 мг 3,75 мг LB/мл PG/G	Перед активацией	0,69	1,55	5,31
295 мг 3,75 мг LB/мл PG/G	Перед активацией	1,04	1,61	4,48
392 мг 3,75 мг LB/мл PG/G	Перед активацией	1,38	1,60	4,96
196 мг 3,75 мг LB/мл PG/G	После активации	0,69	1,88	1,77
295 мг 3,75 мг LB/мл PG/G	После активации	1,04	1,69	2,68
392 мг 3,75 мг LB/мл PG/G	После активации	1,38	1,56	4,06

^a Соответствующее количество состава 7,5 мг LB/мл PG или 3,75 мг LB на мл PG/G отвешивали в 2-мл флакон Schott, добавляли соответствующее количество солевого раствора для образцов «перед активацией», воздух свободного объема заменяли на PFP, флакон закупоривали серыми пробками Butyl West, обжимали алюминиевым колпачком, активировали, добавляли соответствующее количество солевого раствора для образцов «после активации» и тестировали на предмет количества и среднего размера микросфер, как описано в примере 7. Флаконы активировали с использованием VIALMIX[®].

Таблица 19. Характеристики микросфер для составов смешанного липида в PG или PG/G, активированных в 1-мл V-образном флаконе Wheaton^a

Масса заполнения	Время разбавления	Объем разбавления солевым раствором (мл)	Средний диаметр микросфер (микроны)	Микросфер на мл (x 10⁹)
55 мг 7,5 мг LB/мл PG	Перед активацией	0,50	1,64	6,33
88 мг 7,5 мг LB/мл PG	Перед активацией	0,80	1,73	4,04
177 мг 7,5 мг LB/мл PG	Перед активацией	1,59	1,63	5,00
122 мг 3,75 мг LB/мл PG/G	Перед активацией	0,43	1,57	5,28
392 мг 3,75 мг LB/мл PG/G	Перед активацией	1,38	1,60	4,96

122 мг 3,75 мг LB/мл PG/G	После активации	0,43	1,78	1,06
392 мг 3,75 мг LB/мл PG/G	После активации	1,38	1,68	3,07

^a Соответствующее количество состава 7,5 мг LB/мл PG или 3,75 мг LB/мл PG/G отщипывали в 1-мл V-образный флакон Wheaton, воздух свободного объема заменяли на PFP, добавляли соответствующее количество солевого раствора для образцов «перед активацией», флакон закупоривали серой пробкой Butyl West, обжимали алюминиевым колпачком, активировали, добавляли соответствующее количество солевого раствора для образцов «после активации» и тестировали на предмет количества и среднего размера микросфер, как описано в примере 7. Флаконы активировали с использованием VIALMIX[®].

Таблица 20. Концентрация микросфер для DEFINITY[®], активированного в шприцах^a

Размер шприца	Объем DEFINITY[®] (мл)	Средний диаметр микросфер (микроны)	Микросфер на мл (x 10⁹)
3 мл	1,5	1,63	2,45
5 мл	1,6	1,78	0,961
5 мл	1,9	1,92	1,00
5 мл	2,25	1,76	2,25
5 мл	2,7	1,78	0,513

^a DEFINITY[®] заполняли (1,5-2,7 мл) 3- и 5-мл шприцы NORM-JECT[®] (Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, Germany), воздух свободного объема заменяли на PFP, шприц активировали с помощью Wig-L-Bug[™], тестировали на предмет количества и среднего размера микросфер, как описано в примере 7.

Таблица 21. Характеристики микросфер для составов смешанного липида в PG или PG/G, активированных в 3-мл шприце NORM-JECT[®]

Масса заполнения	Время разбавления	Объем разбавления солевым раствором (мл)	Средний диаметр микросфер (микроны)	Микросфер на мл (x 10⁹)
101 мг 7,5 мг LB/мл PG	Перед активацией	0,90	1,79	4,02
177 мг 7,5 мг LB/мл PG	Перед активацией	1,59	1,66	4,15
222 мг 7,5 мг LB/мл PG	Перед активацией	0,78	1,72	3,63
222 мг 3,75 мг LB/мл PG/G	После активации	0,78	1,57	4,83

^a Соответствующее количество состава 7,5 мг LB/мл PG или 3,75 мг LB/мл PG/G отвешивали в 3-мл шприц NORM-JECT[®] (Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, Germany), добавляли соответствующее количество солевого раствора для образцов «перед активацией», воздух свободного объема заменяли на PFP и шприц активировали, добавляли соответствующее количество солевого раствора для образцов «после активации» и препараты тестировали на предмет количества и среднего размера микросфер, как описано в примере 7. Шприцы активировали с использованием VIALMIX[®].

Таблица 22. Характеристики микросфер для составов смешанного липида в PG, активированных в шприце, модифицированном с наличием двух отделений, сформированных с помощью капсулы для зубной амальгамы^a

Масса заполнения ^b	Время разбавления	Объем разбавления солевым раствором (мл)	Средний диаметр микросфер (микроны)	Микросфер на мл (x 10 ⁹)
177 мг 7,5 мг LB/мл PG	Перед активацией	1,59	1,66	4,15
391 мг 3,75 мг LB/мл PG/G	Перед активацией	1,38	1,64	4,14
391 мг 3,75 мг LB/мл PG/G	После активации	1,38	1,59	3,92

^a 5-мл шприц NORM-JECT[®] (Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, Germany) укорачивали до 3 мл. Капсулу для зубной амальгамы (полученную у местного стоматолога) открывали, удаляли дно, содержащее порошок, и удаляли поршень из верхнего отделения вместе с содержимым верхнего отделения. Верхнее отделение вставляли в цилиндр укороченного шприца.

^b Соответствующее количество состава 7,5 мг LB/мл PG или 3,75 мг LB/мл PG/G отвешивали в корпус 5-мл шприца NORM-JECT[®], укороченного до приблизительно 2,5 мл (Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, Germany), поршень капсулы для зубной амальгамы вставляли в капсулу, добавляли соответствующее количество солевого раствора для образцов «перед активацией», воздух свободного объема заменяли на PFP, шприц закупоривали колпачком с фиксатором Люэра, активировали, добавляли соответствующее количество солевого раствора для образцов «после активации» и тестировали на предмет количества и среднего размера микросфер, как описано в примере 7. Флаконы активировали с использованием VIALMIX[®].

Таблица 23. Характеристики микросфер для составов смешанного липида в PG или PG/G, активированных в шприце, модифицированном с наличием двух отделений^a

Масса заполнения ^b	Время разбавления	Объем разбавления солевым раствором (мл)	Средний диаметр микросфер (микроны)	Микросфер на мл ($\times 10^9$)
60 мг 7,5 мг LB/мл PG	Перед активацией	0,54	1,83	4,74
133 мг 3,75 мг LB/мл PG/G	Перед активацией	0,47	1,72	4,42
133 мг 3,75 мг LB/мл PG/G	После активации	0,47	1,89	1,40

^a 3-мл шприц NORM-JECT[®] (Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, Germany) модифицировали с обеспечением расширения приблизительно 3 мм на 10 мм x 1 мм в виде обходного канала, типичного для коммерческих шприцев с двумя отделениями. Канал делали путем нагревания одной части пинцета и прижимания ее ко внутренней части цилиндра шприца на метке объема приблизительно 2 мл. Конец поршня шприца отрезали до длины приблизительно 1 см и использовали в качестве проходной пробки. Второй поршень шприца также отрезали.

^b Соответствующее количество состава 7,5 мг LB/мл PG или 3,75 мг LB/мл PG/G отвешивали в корпус модифицированного 3-мл шприца NORM-JECT[®] ниже обходного канала, проходную пробку вставляли в точке чуть выше обходного канала, добавляли соответствующее количество солевого раствора в верхнюю камеру, образованную после введения проходной пробки, вводили укороченный поршень шприца, полностью заполняя верхнюю камеру. Воздух свободного объема в нижней камере заменяли на PFP, шприц закупоривали колпачком с фиксатором Люэра. Шприц активировали с использованием VIALMIX[®], надавливали на поршень шприца для перемещения проходной пробки в обходной канал, что обеспечивало попадание солевого раствора в нижнюю камеру, содержащую активированный продукт для образцов «после активации». Для образцов «перед активацией» надавливали на поршень шприца для перемещения проходной пробки в обходной канал, что обеспечивало попадание солевого раствора в нижнюю камеру, шприц активировали с использованием VIALMIX[®]. Образцы тестировали на предмет количества и среднего размера микросфер, как описано в примере 7.

Таблица 24. Характеристики микросфер для составов смешанного липида в PG или PG/G, активированных в пластиковой тубе с двумя отделениями

Масса заполнения ^a	Время разбавления	Объем разбавления солевым раствором (мл)	Средний диаметр микросфер (микроны)	Микросфер на мл ($\times 10^9$)
177 мг 7,5 мг LB/мл PG	Перед активацией	1,59	1,64	3,11
392 мг 3,75 мг LB/мл PG/G	Перед активацией	1,38	1,80	2,62
392 мг 3,75 мг LB/мл PG/G	После активации	1,38	1,63	3,72

^a Соответствующее количество состава 7,5 мг LB/мл PG или 3,75 мг LB/мл PG/G отщипывали в нижнюю камеру тубы с двумя отделениями (NEOPAC Fleximed Tube, 13,5 x 80 мм, Hoffmann Neopac AG, Oberdiessbach, Switzerland), добавляли соответствующее количество солевого раствора в верхнюю камеру, воздух свободного объема в нижней камере заменяли на PFP, тубу закупоривали колпачком с фиксатором Люэра. Тубу активировали с использованием VIALMIX[®], солевой раствор из верхнего отделения переносили в нижнее отделение и смешивали для образцов «после активации». Для образцов «перед активацией» солевой раствор перемещали в нижнее отделение до активации тубы с использованием VIALMIX[®]. Образцы тестировали на предмет количества и среднего размера микросфер, как описано в примере 7.

Данные исследования показали, что процесс встряхивания составов смешанного липида PG и PG/G с помощью механического шейкера может быть осуществлен в ряде контейнеров, в том числе во флаконах, шприцах и пластиковой тубе, с получением микросфер с характеристиками, эквивалентными таковым активированного DEFINITY[®]. Удивительным является то, что, механическое встряхивание обходит различия в размерах контейнера и в материале, из которого сделан контейнер, и обеспечивает образование микросфер с эквивалентными размером и количеством, которые должно быть обеспечены. Активация составов LB в PG и PG/G в шприцах, как перед добавлением, так и после добавления разбавителей, обеспечивает интересный результат. Кроме того, возможность отделения разбавителей от состава и последующего обеспечения объединения двух компонентов перед активацией или после активации посредством механизированного встряхивания открывает новые возможности для получения препаратов, которые могут обеспечить состав, стабильный при комнатной температуре, с легким получением продукта.

Пример 12. Способы активации

Исследования проводили для демонстрации возможности активации DEFINITY® несколькими способами, отличными от применения VIAlMIX®. Эти способы описываются ниже с результатами, представленными в таблице 25.

А. DEFINITY® (1,5 мл) втягивали в 3-мл пластиковый шприц и соединяли с 3-ходовым краном. Отдельный шприц того же размера заполняли PFP газом и соединяли с другим портом в кране. DEFINITY® и PFP газ смешивали путем поочередного нажатия на поршень на каждом шприце назад и вперед 50-400 раз. Измерения числа микропузырьков и диаметра пузырьков указывают на активацию DEFINITY®.

В. DEFINITY® (3,0 мл) втягивали в 10-мл пластиковый шприц и соединяли с 3-ходовым краном. Отдельный шприц того же размера заполняли PFP газом и соединяли с другим портом в кране. DEFINITY® и PFP газ смешивали путем поочередного нажатия на поршень на каждом шприце назад и вперед 200 раз. Измерения числа микропузырьков и диаметра пузырьков указывают на активацию DEFINITY®.

С. Липидный состав (1,5 мл 0,045 мг/мл DPPA, 0,75 мг/мл DPPC, 0 мг/мл MPEG5000-DPPE, 4,87 мг/мл NaCl, 103,5 мг/мл пропиленгликоля, 126,2 мг/мл глицерина, 2,34 мг/мл NaH₂PO₄H₂O, 2,16 мг/мл NaHPO₄7H₂O) втягивали в 3-мл пластиковый шприц и соединяли с 3-ходовым краном. Отдельный шприц того же размера заполняли PFP газом и соединяли с другим портом в кране. DEFINITY® и PFP газ смешивали путем поочередного нажатия на поршень на каждом шприце назад и вперед 100 раз. Измерения числа микропузырьков и диаметра пузырьков указывают на активацию данного липидного состава.

Д. Модифицированный липидный состав (1,5 мл 0,045 мг/мл DPPA, 0,75 мг/мл DPPC, 0 мг/мл MPEG5000-DPPE, 4,87 мг/мл NaCl, 103,5 мг/мл пропиленгликоля, 126,2 мг/мл глицерина, 2,34 мг/мл NaH₂PO₄H₂O, 2,16 мг/мл NaHPO₄7H₂O) втягивали в 3-мл пластиковый шприц и соединяли с 3-ходовым краном. Отдельный шприц того же размера заполняли PFP газом и соединяли с другим портом в кране. Между наполненным липидным составом шприцем и краном находилась пластиковая трубка, снабженная семью высокоэффективными статическими миксерами X-Grid (StaMixCo, GXP-9, 4-PA66, черная). Состав и PFP газ смешивали путем поочередного нажатия на поршень на каждом шприце назад и вперед 50 раз. Измерения

числа микропузырьков и диаметра пузырьков указывают на активацию данного липидного состава.

Е. Модифицированный липидный состав (1,5 мл 0,045 мг/мл DPPA, 0,75 мг/мл DPPC, 0 мг/мл MPEG5000-DPPE, 4,87 мг/мл NaCl, 103,5 мг/мл пропиленгликоля, 126,2 мг/мл глицерина, 2,34 мг/мл $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$, 2,16 мг/мл $\text{NaHPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) втягивали в 3-мл пластиковый шприц и соединяли с двумя 3-ходовыми кранами последовательно. Отдельный шприц того же размера заполняли PFP газом и соединяли с другим портом в кране. Состав и PFP газ смешивали путем поочередного нажатия на поршень на каждом шприце назад и вперед 100 раз. Измерения числа микропузырьков и диаметра пузырьков указывают на активацию данного липидного состава.

Ф. Модифицированный липидный состав (1,5 мл 0,045 мг/мл DPPA, 0,75 мг/мл DPPC, 0 мг/мл MPEG5000-DPPE, 4,87 мг/мл NaCl, 103,5 мг/мл пропиленгликоля, 126,2 мг/мл глицерина, 2,34 мг/мл $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$, 2,16 мг/мл $\text{NaHPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) втягивали в 3-мл пластиковый шприц и соединяли с 3-ходовым краном. Отдельный шприц того же размера заполняли PFP газом и соединяли с другим портом в кране. Между наполненным липидным составом шприцем и краном находилась пластиковая трубка, снабженная восемью высокоэффективными статическими миксерами X-Grid (StaMixCo, GXF-10-2-ME, оранжевая). Состав и PFP газ смешивали путем поочередного нажатия на поршень на каждом шприце назад и вперед 100 раз. Измерения числа микропузырьков и диаметра пузырьков указывают на активацию данного липидного состава.

Г. Модифицированный липидный состав (1,5 мл 0,045 мг/мл DPPA, 0,401 мг/мл DPPC, 0,304 мг/мл MPEG5000-DPPE, 4,87 мг/мл NaCl, 155,25 мг/мл пропиленгликоля, 31,55 мг/мл глицерина, 2,34 мг/мл $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$, 2,16 мг/мл $\text{NaHPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) втягивали в 3-мл пластиковый шприц и соединяли с 3-ходовым краном. Отдельный шприц того же размера заполняли PFP газом и соединяли с другим портом в кране. Состав и PFP газ смешивали путем поочередного нажатия на поршень на каждом шприце назад и вперед 100 раз. Измерения числа микропузырьков и диаметра пузырьков указывают на активацию данного липидного состава.

Н. DEFINITY[®] (1,5 мл) плюс 3,5 мл солевого раствора втягивали в 5-мл пластиковый шприц и соединяли с 3-ходовым краном. Отдельный шприц того же размера заполняли PFP газом и соединяли с другим портом в кране. DEFINITY[®], солевой раствор и PFP газ смешивали путем поочередного нажатия на поршень на

каждом шприце назад и вперед 100 раз. Измерения числа микропузырьков и диаметра пузырьков указывают на активацию DEFINITY®.

I. DEFINITY® (1,5 мл) втягивали в 3-мл пластиковый шприц и соединяли с 3-ходовым краном. Отдельный шприц того же размера заполняли PFP газом и соединяли с другим портом в кране. Между наполненным DEFINITY® шприцем и краном находилась пластиковая трубка с пластиковым спиральным миксером (StaMixCo, 2,5" x 3/16", 15 оборотов спирали на 2,5 дюйма). DEFINITY® и PFP газ смешивали путем поочередного нажатия на поршень на каждом шприце назад и вперед 50 раз. Измерения числа микропузырьков и диаметра пузырьков указывают на активацию DEFINITY®.

J. DEFINITY® (3,0 мл) втягивали в 10-мл пластиковый шприц и соединяли с 3-ходовым краном. Отдельный шприц того же размера заполняли PFP газом и соединяли с другим портом в кране. Между наполненным DEFINITY® шприцем и краном находилась пластиковая трубка с пластиковым спиральным миксером (StaMixCo, 2,5" x 3/16", 15 оборотов спирали на 2,5 дюйма). DEFINITY® и PFP газ смешивали путем поочередного нажатия на поршень на каждом шприце назад и вперед 50 раз. Измерения числа микропузырьков и диаметра пузырьков указывают на активацию DEFINITY®.

K. DEFINITY® (1,5 мл) втягивали в 3-мл пластиковый шприц и соединяли непосредственно с пластиковой трубкой с пластиковым спиральным миксером (StaMixCo, 2,5" x 3/16", 15 оборотов спирали на 2,5 дюйма). Отдельный шприц того же размера заполняли PFP газом и соединяли с другим концом пластиковой трубки. DEFINITY® и PFP газ смешивали путем поочередного нажатия на поршень на каждом шприце назад и вперед 25 раз. Измерения числа микропузырьков и диаметра пузырьков указывают на активацию DEFINITY®.

L. DEFINITY® (1,5 мл) втягивали в 3-мл пластиковый шприц и соединяли непосредственно с 20-мк фильтром QMA (Waters). Отдельный шприц того же размера заполняли PFP газом и соединяли с другим концом фильтра. DEFINITY® и PFP газ смешивали путем поочередного нажатия на поршень на каждом шприце назад и вперед 50 раз. Измерения числа микропузырьков и диаметра пузырьков указывают на активацию DEFINITY®.

M. DEFINITY® (1,5 мл) втягивали в 3-мл пластиковый шприц и соединяли непосредственно с 20-мк фильтром QMA (Waters) и пластиковой трубкой с пластиковым спиральным миксером (StaMixCo, 2,5" x 3/16", 15 оборотов спирали на

2,5 дюйма). Отдельный шприц того же размера заполняли PFP газом и соединяли с другим концом миксера. DEFINITY[®] и PFP газ смешивали путем поочередного нажатия на поршень на каждом шприце назад и вперед 50 раз. Измерения числа микропузырьков и диаметра пузырьков указывают на активацию DEFINITY[®].

N. DEFINITY[®] (0,6 мл) втягивали в 1-мл стеклянный шприц и соединяли с 1,5-дюймовым металлическим держателем, содержащим 5-мк фильтр. Отдельный стеклянный шприц того же размера заполняли PFP газом и соединяли с другим концом металлического держателя. Данное экструзионное устройство является коммерчески доступным (LiposoFast-Basic, Avestin, Inc.). DEFINITY[®] и PFP газ смешивали путем поочередного нажатия на поршень на каждом шприце назад и вперед 25 раз. Измерения числа микропузырьков и диаметра пузырьков указывают на активацию DEFINITY[®].

O. DEFINITY[®] (0,6 мл) втягивали в 1-мл стеклянный шприц и соединяли с 1,5-дюймовым металлическим держателем, содержащим 5-мк фильтр. Отдельный стеклянный шприц того же размера заполняли PFP газом и соединяли с другим концом металлического держателя. Данное экструзионное устройство является коммерчески доступным (LiposoFast-Basic, Avestin, Inc.). DEFINITY[®] и PFP газ смешивали путем поочередного нажатия на поршень на каждом шприце назад и вперед 100 раз. Измерения числа микропузырьков и диаметра пузырьков указывают на активацию DEFINITY[®].

P. DEFINITY[®] (0,6 мл) втягивали в 1-мл стеклянный шприц и соединяли с 1,5-дюймовым металлическим держателем, содержащим либо 0,4-микронный, либо 1,0-микронный фильтр. Отдельный стеклянный шприц того же размера заполняли PFP газом и соединяли с другим концом металлического держателя. Данное экструзионное устройство является коммерчески доступным (LiposoFast-Basic, Avestin, Inc.). DEFINITY[®] и PFP газ смешивали путем поочередного нажатия на поршень на каждом шприце назад и вперед 25 раз. Измерения числа микропузырьков и диаметра пузырьков указывают на активацию DEFINITY[®].

Q. Флакон DEFINITY[®] (1,5 мл) откручивали на вортексе при самой высокой регулировке в течение 5 минут. Измерения числа микропузырьков и диаметра пузырьков указывают на активацию DEFINITY[®].

R. Флакон DEFINITY[®] (1,5 мл) обрабатывали ультразвуком в течение 2 минут. Раствор был молочно-белым, однако, его не тестировали для измерения числа микропузырьков и диаметра пузырьков.

S. Флакон DEFINITY® (1,5 мл) обрабатывали в течение 5 минут с помощью высокоскоростного лопастного гомогенизатора. Раствор был молочно-белым, однако, его не тестировали для измерения числа микропузырьков и диаметра пузырьков.

T. Флакон DEFINITY® (1,5 мл) закрепляли на конце деревянного стержня 0,75” x 2,25” x 23”, перемещающегося между двумя деревянными стойками на расстоянии 15” друг от друга от 300 до 1500 раз при скорости 100 ударов/27 секунд, и тестировали для измерения числа микропузырьков и диаметра пузырьков. Измерения числа микропузырьков и диаметра пузырьков указывают на активацию DEFINITY®.

Таблица 25. Результаты числа и диаметра микропузырьков с использованием анализатора микропузырьков Sysmex

Пример	Число нажатий на цилиндр шприца назад и вперед (в примере «Т» это означает число ударов)	Число микропузырьков ($\times 10^9$) на мл	Диаметр микропузырьков (микроны)
A			
	50	0,80, 1,49	1,8-2,0
	75	1,19	1,7
	100	0,57, 1,25, 1,40	1,8, 1,9
	200	1,28	1,7
	400	1,02	1,6
B	200	0,55	1,7
C	100	1,28	1,7
D	50	0,50	1,9
E	100	0,99	1,7
F	100	0,69	2,0
G	100	1,08	2,0
H	100	0,08	2,3
I	50	0,23	1,9
J	50	0,16	1,9
K	25	0,14	2,0
L	50	0,07	2,1
M	50	0,11	2,1
N	25	0,10	1,7
O	100	0,57	1,3
P	0,4-мк и 1,0-мк фильтр	0,01 и 0,12	3,6 и 1,9

	25		
Q	Vortex, 5 минут	0,13	2,1
R	Sonicate, 2 минут	Не тестировали, на основании визуального осмотра – светломолочные	Не тестировали, на основании визуального осмотра – светломолочные
S	Polytron, 5 минут	Не тестировали, на основании визуального осмотра – светломолочные	Не тестировали, на основании визуального осмотра – светломолочные
T	от 300 до 1500 раз при скорости 100 ударов/27 секунд		
	300 x	0,056	1,86
	500 x	0,096	1,93
	1000 x	0,205	1,90
	1500 x	0,194	1,74

Данные исследования демонстрируют, что активация DEFINITY® или его модифицированных версий может быть выполнена с использованием ряда устройств для активации.

Ссылки, упомянутые в настоящем документе, в том числе патенты и заявки на выдачу патентов, включены посредством ссылки во всей их полноте.

11ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Неводная смесь, содержащая один или более фосфолипидов, выбранных из DPPA, DPPC и PEG5000-DPPE в

(a) пропиленгликоле и глицерине;

(b) пропиленгликоле; или

(c) глицерине,

при этом неводная смесь обеспечена в контакте с перфторуглеродным газом,

при этом неводная смесь представляет собой смесь, имеющую менее или равно 5% воды по массе, рассчитанной как масса воды по отношению к массе комбинации липидов и пропиленгликоля и/или глицерина.

2. Неводная смесь по п. 1, при этом неводная смесь содержит

(a) менее 5% воды по массе, рассчитанной как масса воды по отношению к массе комбинации липидов и пропиленгликоля и/или глицерина;

(b) 1-4% воды по массе, рассчитанной как масса воды по отношению к массе комбинации липидов и пропиленгликоля и/или глицерина; или

(c) менее 1% воды по массе, рассчитанной как масса воды по отношению к массе комбинации липидов и пропиленгликоля и/или глицерина.

3. Неводная смесь по п. 1 или 2, при этом неводная смесь не содержит никакие соли, отличные от липидных противоионов.

4. Неводная смесь по любому из вышеупомянутых пунктов, при этом неводная смесь:

(a) не содержит натрия хлорид; или

(b) не содержит хлорид.

5. Неводная смесь по любому из вышеупомянутых пунктов, при этом неводная смесь дополнительно содержит буфер, необязательно не являющийся фосфатным буфер.

6. Неводная смесь по любому из вышеупомянутых пунктов, при этом неводная смесь содержит менее 5% примесей при хранении при комнатной температуре в течение приблизительно 3 месяцев.

7. Неводная смесь по любому из вышеупомянутых пунктов, при этом перфторуглеродным газом является перфторпропановый газ.

8. Неводная смесь по любому из вышеупомянутых пунктов, при этом PEG5000-DPPE представляет собой MPEG5000-DPPE.

9. Неводная смесь по любому из вышеупомянутых пунктов, при этом один или более фосфолипидов присутствуют в концентрации:

(a) от приблизительно 0,9 мг до приблизительно 7,5 мг на мл неводной смеси;

(b) от приблизительно 1,875 мг до приблизительно 3,75 мг на мл неводной смеси;

или

(c) приблизительно 3,75 мг на мл неводной смеси.

10. Неводная смесь по любому из вышеупомянутых пунктов, при этом один или более фосфолипидов выбраны из DPPC и PEG5000-DPPE.

11. Способ получения микросфер с инкапсулированным в липиде газом, включающий

(1) комбинирование неводной смеси по любому из вышеупомянутых пунктов с глицерином в отдельности или глицерином и водным разбавителем (одновременно или последовательно), а затем активацию указанной комбинации в присутствии перфторуглеродного газа;

(2) активацию неводной смеси по любому из вышеупомянутых пунктов в присутствии перфторуглеродного газа, и в присутствии или отсутствии водного разбавителя;

(3) комбинирование неводной смеси по любому из вышеупомянутых пунктов с водным разбавителем в присутствии перфторуглеродного газа, а затем активацию указанной комбинации; или

(4) комбинирование неводной смеси по любому из вышеупомянутых пунктов с пропиленгликолем в отдельности или пропиленгликолем и водным разбавителем (одновременно или последовательно), а затем активацию указанной комбинации в присутствии перфторуглеродного газа.

12. Способ по п. 11, при этом

(a) активация происходит в течение 20-45 секунд, или

(b) активация происходит в течение 60-120 секунд.

13. Способ по п. 11 или 12, при этом микросферы с инкапсулированным в липиде газом являются ультразвуковым контрастным средством.

14. Способ по п. 11 или 12, дополнительно включающий разбавление микросфер с инкапсулированным в липиде газом дополнительным водным разбавителем.

15. Неводная смесь для использования в диагностической визуализации и/или терапии с ультразвуком, включающая

DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE в пропиленгликоле и глицерине, обеспеченные в контакте с перфторпропановым газом,

при этом DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE представлены в мол. % отношении 10 к 82 к 8 (10:82:8) в концентрации 3,75 мг/мл,

при этом неводная смесь представляет собой смесь, имеющую менее или равно 5% воды по массе, рассчитанной как масса воды по отношению к массе комбинации липидов и пропиленгликоля и глицерина.

16. Неводная смесь по п. 15, имеющая менее 5% воды по массе.

17. Неводная смесь по п. 15 или 16, дополнительно включающая ацетатный буфер.

18. Способ получения микросфер с инкапсулированным в липиде газом для использования в диагностической визуализации и/или терапии с ультразвуком, включающий:

добавление водного разбавителя к неводной смеси, содержащей DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE в мол. % отношении 10 к 82 к 8 (10:82:8) в пропиленгликоле и глицерине, имеющей концентрацию липидов 3,75 мг/мл, и обеспеченной в контакте с

перфторпропановым газом, а затем активацию полученной композиции с образованием микросфер с инкапсулированным в липиде газом;

при этом неводная смесь представляет собой смесь, имеющую менее или равно 5% воды по массе, рассчитанной как масса воды по отношению к массе комбинации липидов и пропиленгликоля и глицерина;

необязательно где полученную композицию активируют в течение (i) 20-45 секунд, или (ii) 60-120 секунд.

19. Способ по п. 18, при этом неводная смесь имеет менее 5% воды по массе.

20. Способ по п. 18 или 19, при этом неводная смесь дополнительно включает ацетатный буфер.

21. Способ получения микросфер с инкапсулированным в липиде газом для использования в диагностической визуализации и/или терапии с ультразвуком, включающий:

активацию неводной смеси, содержащей DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE в мол. % отношении 10 к 82 к 8 (10:82:8) в пропиленгликоле и глицерине, имеющей концентрацию липидов 3,75 мг/мл, и обеспеченной в контакте с перфторпропановым газом,

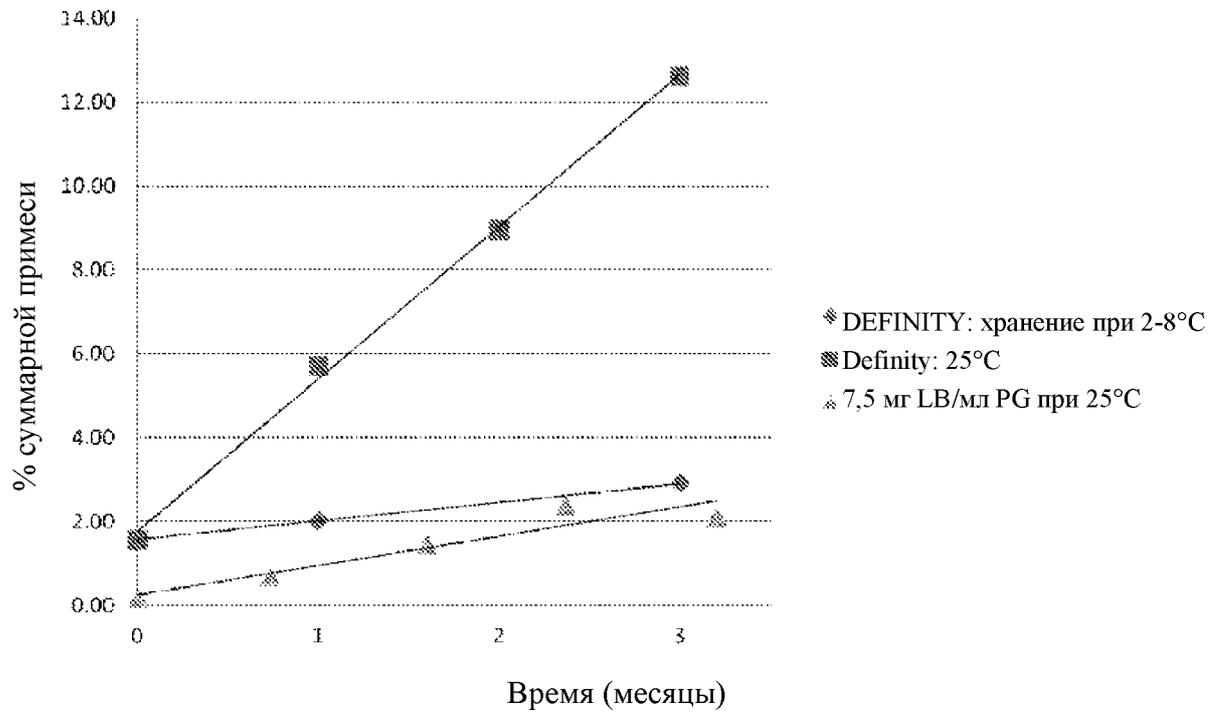
при этом неводная смесь представляет собой смесь, имеющую менее или равно 5% воды по массе, рассчитанной как масса воды по отношению к массе комбинации липидов и пропиленгликоля и /или глицерина;

необязательно где неводную смесь, обеспеченную в контакте с перфторуглеродным газом, активируют в течение 20-45 секунд.

22. Способ по п. 21, при этом неводная смесь имеет менее 5% воды по массе.

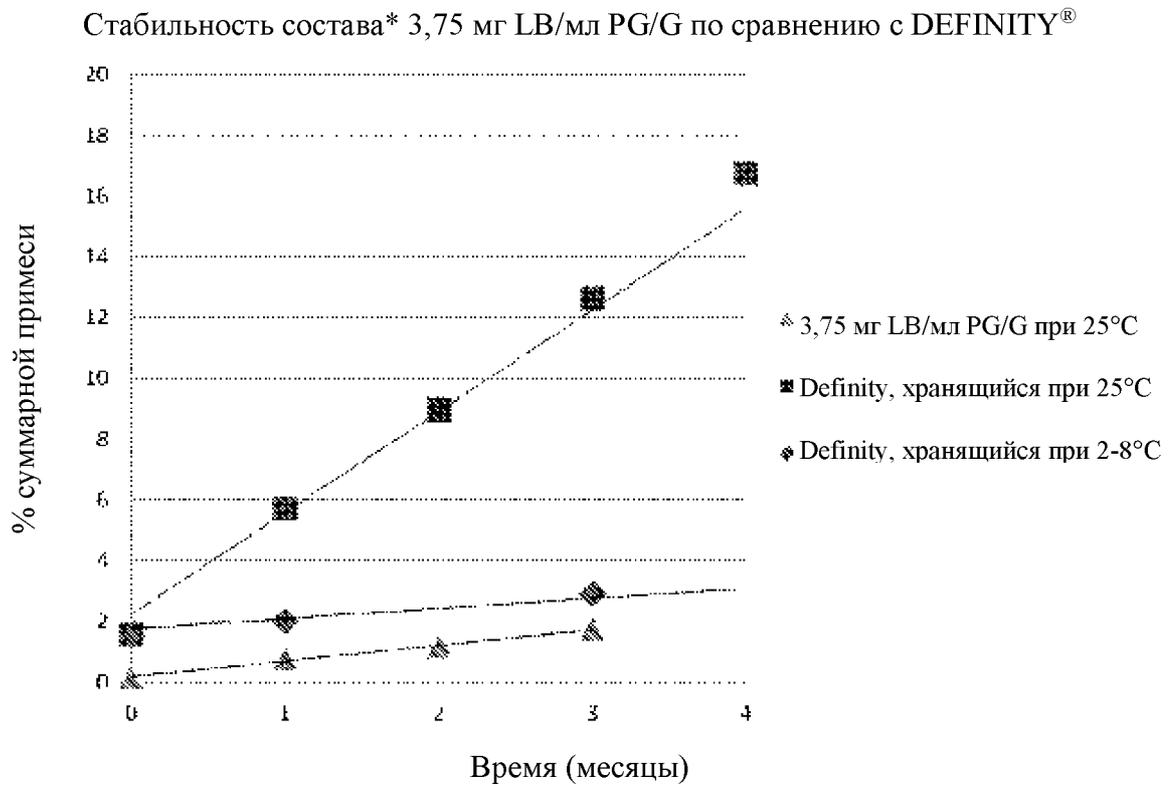
23. Способ по п. 21 или 22, при этом неводная смесь дополнительно включает ацетатный буфер.

Стабильность состава LB/PG* по сравнению с DEFINITY®



* 177 мг PG, содержащего LB (0,72 мас. % LB; отношение 1:138 для LB:PG).

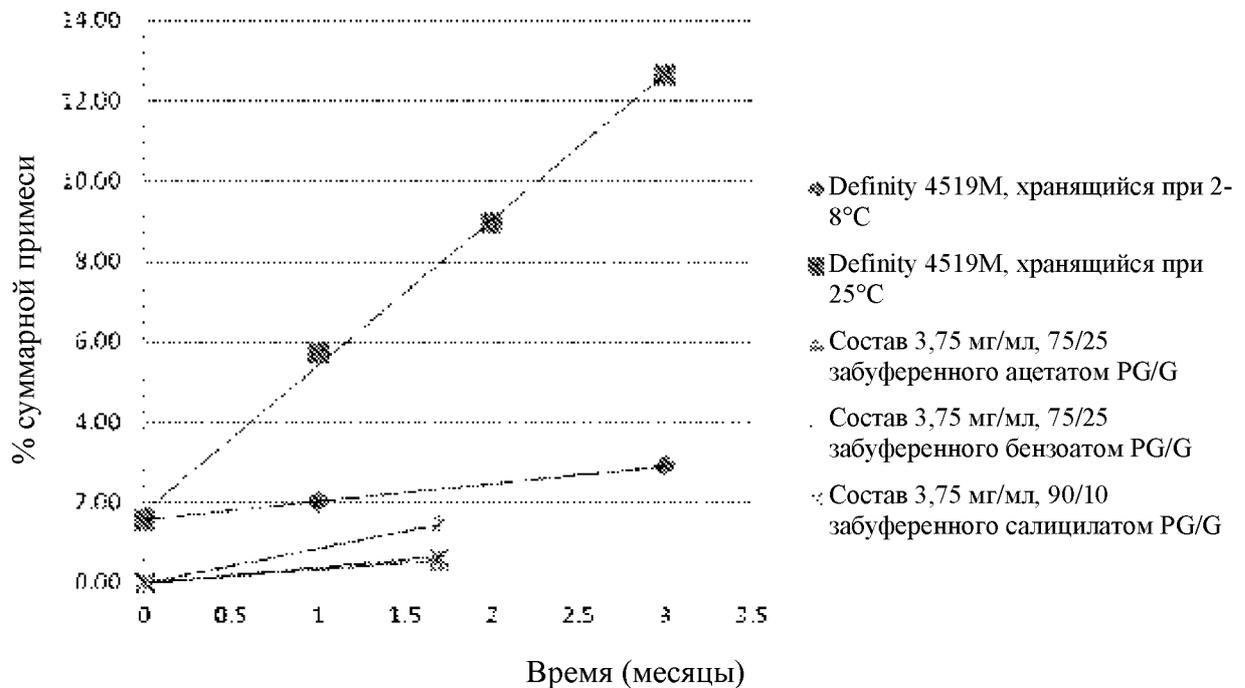
Фиг. 1



* 391 мг PG/G, содержащего LB (0,33 мас. % LB:44,9 мас. % PG:54,8 мас. % G; отношение 1:138:168 для LB:PG:G).

Фиг. 2

Стабильность состава* 3,75 мг смешанного липида/мл забуференного PG/G по сравнению с DEFINITY®



* 5 мМ буфера в 391 мг PG/G, содержащего LB (0,33 мас. % LB:44,9 мас. % PG:54,8 мас. % G; отношение 1:138:168 для LB:PG:G). Отношения представляют натрия ацетат к уксусной кислоте, натрия бензоат к бензойной кислоте, натрия салицилат к салициловой кислоте.

Фиг. 3