

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040910**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.08.15

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

(21) Номер заявки
201892568

(22) Дата подачи заявки
2017.07.05

(54) **СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ КОНТРАСТНЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ УЛЬТРАЗВУКОВОГО ИССЛЕДОВАНИЯ**

(31) **62/359,181; 15/461,469; 15/602,580**

(56) US-B2-8747892
US-A1-20070071685
US-A1-20160030596
US-A1-20130123781
US-A-6071494

(32) **2016.07.06; 2017.03.16; 2017.05.23**

(33) **US**

(43) **2019.06.28**

(86) **PCT/US2017/040755**

(87) **WO 2018/009570 2018.01.11**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЛАНТХЕУС МЕДИКАЛ
ИМАДЖИНГ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Робинсон Саймон П., Сиглер
Роберт В., Нгуен Нхунг Туйет,
Онтханк Дэвид С., Анклекар
Таракешвар Вишванат, Ван Кирк
Чарльз Честер (US)**

(74) Представитель:
Строкова О.В., Угрюмов В.М. (RU)

(57) В данном документе предусмотрены улучшенные способы получения составов фосфолипидов, включая составы UCA на основе фосфолипидов.

B1

040910

040910
B1

Предшествующий уровень техники

Липидные микросферы с инкапсулированным газом используют в качестве контрастных средств в видах применениях для получения изображений с помощью ультразвука.

Краткое описание

Настоящее изобретение предусматривает улучшенные способы получения контрастных средств для ультразвукового исследования на основе фосфолипидов. Настоящее изобретение отчасти основано на неожиданном обнаружении того, что некоторые составы контрастных средств для ультразвукового исследования на основе фосфолипидов чувствительны к катионам двухвалентных металлов. В присутствии конкретных уровней определенных таких катионов фосфолипиды и возможно другие компоненты в составе осаждаются, делая состав непригодным. До сих пор не было понятно, что определенные катионы двухвалентных металлов имели способность настолько отрицательно влиять на состав контрастного средства для ультразвукового исследования.

На основе данных результатов в настоящем изобретении рассматриваются улучшенные способы синтеза таких составов, которые предотвращают такое нежелательное осаждение фосфолипидов, а также составы, полученные в результате таких способов. Также предусмотрены способы применения данных улучшенных составов в синтезе улучшенных контрастных средств для ультразвукового исследования и их применение в визуализации субъектов, нуждающихся в этом.

Таким образом, в одном аспекте в данном документе предусмотрен способ получения суспензии фосфолипидов, включающий обеспечение исходных форм DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE, измерение концентрации кальция в одной или нескольких или всех исходных формах DPPC, DPPA и MPEG5000-DPPE, объединение исходных форм DPPA, DPPC и/или MPEG5000-DPPE с неводным растворителем с образованием раствора фосфолипидов и объединение раствора фосфолипидов с водным растворителем с образованием суспензии фосфолипидов. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает измерение концентрации кальция в неводном растворителе. В некоторых вариантах осуществления объединенная измеренная концентрация кальция в исходных формах DPPA, DPPC и/или MPEG5000-DPPE является низкой (т.е. сумма или объединенная концентрация кальция для измеренных исходных форм, независимо от того представляют ли собой данные измеренные исходные формы отдельно DPPA, отдельно DPPC, отдельно MPEG5000-DPPE, DPPA и DPPC, DPPA и MPEG5000-DPPE, DPPC и MPEG5000-DPPE или DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE, является низкой).

В некоторых вариантах осуществления объединенная измеренная концентрация кальция в исходных формах DPPA, DPPC и/или MPEG-DPPE и неводном растворителе является низкой (т.е. сумма или объединенная концентрация кальция для измеренных компонентов, независимо от того представляют ли собой данные измеренные исходные формы отдельно DPPA или DPPA и неводный растворитель, отдельно DPPC или DPPA и неводный растворитель, отдельно MPEG5000-DPPE или MPEG5000-DPPE и неводный растворитель, DPPA и DPPC или DPPA, DPPC и неводный растворитель, DPPA и MPEG5000-DPPE или DPPA, MPEG5000-DPPE и неводный растворитель, DPPC и MPEG5000-DPPE или DPPC, MPEG5000-DPPE и неводный растворитель, DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE или DPPA, DPPC, MPEG5000-DPPE и неводный растворитель, является низкой).

В некоторых вариантах осуществления измеряют концентрации кальция в исходных формах DPPC, DPPA и MPEG5000-DPPE.

В некоторых вариантах осуществления измеряют концентрации кальция в исходных формах DPPC, DPPA и MPEG5000-DPPE, и при этом объединенная измеренная концентрация кальция в исходных формах DPPA, DPPC, MPEG-DPPE и неводном растворителе является низкой.

Таким образом, в зависимости от варианта осуществления измеряют только концентрацию кальция в DPPA, или измеряют только концентрацию кальция в DPPC, или измеряют только концентрацию кальция в MPEG5000-DPPE, или измеряют только концентрации кальция в DPPA и DPPC (и такие концентрации суммируют с получением объединенной измеренной концентрации кальция), или измеряют только концентрации кальция в DPPA и MPEG5000-DPPE (и такие концентрации суммируют с получением объединенной измеренной концентрации кальция), или измеряют только концентрации кальция в DPPC и MPEG5000-DPPE (и такие концентрации суммируют с получением объединенной измеренной концентрации кальция), или измеряют только концентрации кальция в DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE (и такие концентрации суммируют с получением объединенной измеренной концентрации кальция), или измеряют только концентрации кальция в DPPA и неводном растворителе (и такие концентрации суммируют с получением объединенной измеренной концентрации кальция), или измеряют только концентрации кальция в DPPC и неводном растворителе (и такие концентрации суммируют с получением объединенной измеренной концентрации кальция), или измеряют только концентрации кальция в MPEG5000-DPPE и неводном растворителе (и такие концентрации суммируют с получением объединенной измеренной концентрации кальция), или измеряют только концентрации кальция в DPPA, DPPC и неводном растворителе (и такие концентрации суммируют с получением объединенной измеренной концентрации кальция), или измеряют только концентрации кальция в DPPA, MPEG5000-DPPE и неводном растворителе (и такие концентрации суммируют с получением объединенной измеренной концентрации кальция), или измеряют только концентрации кальция в DPPC, MPEG5000-DPPE и неводном раствори-

теле (и такие концентрации суммируют с получением объединенной измеренной концентрации кальция), или измеряют концентрации кальция в DPPA, DPPC, MPEG5000-DPPE и неводном растворителе (и такие концентрации суммируют с получением объединенной измеренной концентрации кальция). Должно быть ясно, что каждая комбинация компонентов рассматривается при получении объединенной измеренной или характеристической (как обсуждается ниже) концентрации кальция. Следует понимать, что термины DPPA, липид, представляющий собой DPPA, фосфолипид, представляющий собой DPPA, исходная форма DPPA, исходная форма липида, представляющего собой DPPA, и исходная форма фосфолипида, представляющего собой DPPA, используют взаимозаменяемо, если контекст явно не указывает иное. Аналогичные взаимозаменяемые термины используют для DPPC и MPEG5000-DPPE.

В другом аспекте предусмотрен вариант вышеуказанного способа. Такой способ включает обеспечение исходных форм DPPC и MPEG5000-DPPE, измерение концентрации кальция в одной или обеих из исходных форм DPPC и MPEG5000-DPPE, объединение исходных форм DPPC и MPEG5000-DPPE с неводным растворителем с образованием раствора фосфолипидов и объединение раствора фосфолипидов с водным растворителем с образованием суспензии фосфолипидов. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает измерение концентрации кальция в неводном растворителе. Различные вышеуказанные варианты осуществления относятся в равной мере к этому способу и должны так и пониматься.

В другом аспекте настоящее изобретение дополнительно предусматривает способ получения суспензии фосфолипидов, включающий обеспечение исходных форм DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE, измерение концентрации кальция в одной или нескольких или всех исходных формах DPPC, DPPA и MPEG5000-DPPE, объединение исходных форм DPPA, DPPC и/или MPEG5000-DPPE, характеризующихся объединенной измеренной низкой концентрацией кальция, с неводным растворителем с образованием раствора фосфолипидов и объединение раствора фосфолипидов с водным растворителем с образованием суспензии фосфолипидов. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает измерение концентрации кальция в неводном растворителе и исходных формах DPPA, DPPC, MPEG5000-DPPE, и при этом неводный растворитель характеризуется объединенной измеренной низкой концентрацией кальция.

В другом аспекте настоящее изобретение дополнительно предусматривает способ получения суспензии фосфолипидов, включающий объединение исходной формы MPEG5000-DPPE, исходной формы DPPA, исходной формы DPPC и неводного растворителя, при этом каждая из них характеризуется характеристической концентрацией кальция, с образованием раствора фосфолипидов, причем объединенная характеристическая концентрация кальция в исходной форме MPEG5000-DPPE, исходной форме DPPA, исходной форме DPPC и неводном растворителе соответствует низкой концентрации кальция, и объединение раствора фосфолипидов с водным растворителем с образованием суспензии фосфолипидов.

В другом аспекте настоящее изобретение дополнительно предусматривает способ получения суспензии фосфолипидов, включающий объединение исходной формы MPEG5000-DPPE, исходной формы DPPC и неводного растворителя, при этом каждая из них характеризуется характеристической концентрацией кальция, с образованием раствора фосфолипидов, причем объединенная характеристическая концентрация кальция в исходной форме MPEG5000-DPPE, исходной форме DPPC и неводном растворителе соответствует низкой концентрации кальция, и объединение раствора фосфолипидов с водным растворителем с образованием суспензии фосфолипидов.

В другом аспекте настоящее изобретение дополнительно предусматривает способ получения суспензии фосфолипидов, включающий выбор исходной формы MPEG5000-DPPE, исходной формы DPPA и исходной формы DPPC, одна, две или все из которых характеризуются характеристической концентрацией кальция, где объединенная характеристическая концентрация кальция соответствует низкой концентрации кальция, объединение указанных исходной формы MPEG5000-DPPE, исходной формы DPPA, исходной формы DPPC и неводного растворителя с образованием раствора фосфолипидов и объединение раствора фосфолипидов с водным растворителем с образованием суспензии фосфолипидов. Компоненты, такие как исходные формы фосфолипидов и/или неводный растворитель, также выбирают на основе отдельной или объединенной характеристической концентрации кальция.

В другом аспекте настоящее изобретение дополнительно предусматривает способ получения суспензии фосфолипидов, включающий выбор исходной формы MPEG5000-DPPE и исходной формы DPPC, одна или обе из которых характеризуются характеристической концентрацией кальция, где объединенная характеристическая концентрация кальция соответствует низкой концентрации кальция, объединение указанных исходной формы MPEG5000-DPPE, исходной формы DPPC и неводного растворителя с образованием раствора фосфолипидов и объединение раствора фосфолипидов с водным растворителем с образованием суспензии фосфолипидов. Компоненты, такие как исходные формы фосфолипидов и/или неводный растворитель, также выбирают на основе отдельной или объединенной характеристической концентрации кальция.

В другом аспекте настоящее изобретение дополнительно предусматривает способ получения суспензии фосфолипидов, включающий выбор исходной формы MPEG5000-DPPE, исходной формы DPPA и исходной формы DPPC, при этом каждая из них характеризуется характеристической концентрацией

дов и объединение раствора фосфолипидов с водным растворителем с образованием суспензии фосфолипидов. В некоторых вариантах осуществления условие отсутствия кальция или его низкого содержания предусматривает менее 0,7 ppm.

В другом аспекте настоящее изобретение дополнительно предусматривает способ получения суспензии фосфолипидов, включающий объединение, при условии отсутствия метанола и толуола, исходных форм DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE с образованием однородной смеси фосфолипидов, объединение однородной смеси фосфолипидов с содержащим PG неводным растворителем, при условии низкого содержания кальция или его отсутствия, с образованием раствора фосфолипидов и объединение раствора фосфолипидов с водным растворителем с образованием суспензии фосфолипидов. В некоторых вариантах осуществления условие отсутствия кальция или его низкого содержания предусматривает менее 0,7 ppm.

В другом аспекте настоящее изобретение дополнительно предусматривает способ получения суспензии фосфолипидов, включающий объединение исходных форм DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE с растворителем для однородной смеси с образованием однородной смеси фосфолипидов, выпаривание растворителя для однородной смеси с образованием высушенной однородной смеси фосфолипидов, объединение высушенной однородной смеси фосфолипидов с содержащим PG неводным растворителем, при условии низкого содержания кальция или его отсутствия, с образованием раствора фосфолипидов и объединение раствора фосфолипидов с водным растворителем с образованием суспензии фосфолипидов. В некоторых вариантах осуществления условие отсутствия кальция или его низкого содержания предусматривает менее 0,7 ppm.

В другом аспекте настоящее изобретение дополнительно предусматривает способ получения суспензии фосфолипидов, включающий объединение исходных форм DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE с растворителем для однородной смеси с образованием однородной смеси фосфолипидов, осаждение, в условиях отсутствия МТВЕ, однородной смеси фосфолипидов с применением второго растворителя для однородной смеси, объединение осажденной однородной смеси фосфолипидов с неводным растворителем, при условии низкого содержания кальция или его отсутствия, с образованием раствора фосфолипидов и объединение раствора фосфолипидов с водным растворителем с образованием суспензии фосфолипидов. В некоторых вариантах осуществления условие отсутствия кальция или его низкого содержания предусматривает менее 0,7 ppm.

В некоторых вариантах осуществления любых из вышеуказанных способов способ дополнительно включает объединение суспензии фосфолипидов с газообразным перфторуглеродом с образованием контрастного средства для ультразвукового исследования, содержащего фосфолипидные микросферы с инкапсулированным газом. В некоторых вариантах осуществления любых из вышеуказанных способов способ дополнительно включает введение контрастного средства для ультразвукового исследования субъекту и получение одного или нескольких изображений субъекта в результате ультразвукового исследования с контрастным усилением.

В другом аспекте настоящее изобретение дополнительно предусматривает способ визуализации субъекта, включающий объединение суспензии фосфолипидов с газообразным перфторуглеродом с образованием контрастного средства для ультразвукового исследования, содержащего фосфолипидные микросферы с инкапсулированным газом, введение контрастного средства для ультразвукового исследования субъекту и получение одного или нескольких контрастных изображений субъекта в результате ультразвукового исследования с контрастным усилением, причем суспензия фосфолипидов получена с помощью любого из вышеуказанных способов.

В других аспектах настоящее изобретение дополнительно предусматривает композицию, содержащую раствор фосфолипидов, содержащий DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE в неводном растворителе и характеризующийся низкой концентрацией кальция, а также композицию, содержащую раствор фосфолипидов, содержащий DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE в неводном растворителе, причем DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE и неводный растворитель характеризуются объединенным характеристическим содержанием ионов кальция, которое является низким. В некоторых вариантах осуществления неводный растворитель содержит пропиленгликоль (например, пропиленгликоль может быть единственным неводным растворителем или его можно использовать в комбинации с одним или более другими растворителями, чтобы получить неводный растворитель). В некоторых вариантах осуществления неводный растворитель содержит пропиленгликоль и глицерин. В некоторых вариантах осуществления неводный растворитель содержит буфер. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой ацетатный буфер. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит газообразный перфторуглерод. В некоторых вариантах осуществления газообразный перфторуглерод представляет собой перфлутрен. Таким образом, в некоторых случаях композиция предоставляется в контейнере, таком как флакон, и газ предоставляется в пространстве над продуктом в контейнере. Также предусмотрены способы объединения раствора фосфолипидов с газообразным перфторуглеродом с образованием контрастного средства для ультразвукового исследования, содержащего фосфолипидные микросферы с инкапсулированным газом. Способ может дополнительно включать введение контрастного средства для ультразвукового исследования субъекту и получение одного или нескольких изображений субъекта в результате ультразвукового ис-

следования с контрастным усилением.

В некоторых вариантах осуществления различных аспектов, представленных в данном документе, неводный растворитель содержит (i) пропиленгликоль или (ii) пропиленгликоль и глицерин.

В некоторых вариантах осуществления различных аспектов, представленных в данном документе, неводный растворитель содержит буфер. В некоторых вариантах осуществления различных аспектов, представленных в данном документе, неводный растворитель содержит ацетатный буфер.

В некоторых вариантах осуществления различных аспектов, представленных в данном документе, водный растворитель содержит буфер. В некоторых вариантах осуществления различных аспектов, представленных в данном документе, водный растворитель содержит фосфатный буфер.

В некоторых вариантах осуществления различных аспектов, представленных в данном документе, исходные формы DPPC, DPPA и MPEG5000-DPPE по отдельности объединяют с неводным растворителем с образованием раствора фосфолипидов.

В некоторых вариантах осуществления различных аспектов, представленных в данном документе, исходные формы DPPC, DPPA и MPEG5000-DPPE последовательно объединяют с неводным растворителем независимо от порядка добавления образом с образованием раствора фосфолипидов.

В некоторых вариантах осуществления различных аспектов, представленных в данном документе, исходные формы DPPC, DPPA и MPEG5000-DPPE объединяют друг с другом с образованием смеси фосфолипидов, и затем смесь фосфолипидов объединяют с неводным растворителем с образованием раствора фосфолипидов. Смесь фосфолипидов может быть гетерогенной или гомогенной.

В некоторых вариантах осуществления различных аспектов, представленных в данном документе, исходные формы DPPC, DPPA и MPEG5000-DPPE объединяют друг с другом с образованием однородной смеси фосфолипидов и однородную смесь фосфолипидов объединяют с неводным растворителем с образованием раствора фосфолипидов. В некоторых вариантах осуществления различных аспектов, представленных в данном документе, однородную смесь фосфолипидов образуют с применением способа растворения-осаждения в органическом растворителе, включающего растворение исходных форм DPPC, DPPA и MPEG5000-DPPE в смеси метанола и толуола, необязательно концентрирование смеси фосфолипидов/метанола/толуола, а затем приведение в контакт концентрированной смеси фосфолипидов/метанола/толуола с метил-трет-бутиловым эфиром (MTBE) с осаждением фосфолипидов с образованием однородной смеси фосфолипидов. В некоторых вариантах осуществления различных аспектов, представленных в данном документе, однородную смесь фосфолипидов образуют посредством растворения исходных форм DPPC, DPPA и MPEG5000-DPPE в системе растворителей для однородной смеси, отличных от системы растворителей метанол/толуол, необязательно концентрирования смеси фосфолипидов/растворителя, а затем приведения в контакт концентрированной смеси фосфолипидов/растворителя с метил-трет-бутиловым эфиром (MTBE) с осаждением фосфолипидов с образованием однородной смеси фосфолипидов. В некоторых вариантах осуществления различных аспектов, представленных в данном документе, однородную смесь фосфолипидов образуют посредством растворения исходных форм DPPC, DPPA и MPEG5000-DPPE в системе растворителей для однородной смеси, такой как без ограничения система растворителей метанол/толуол, а затем лиофилизации или иным образом высушивания смеси с удалением растворителя с получением однородной смеси фосфолипидов.

В некоторых вариантах осуществления различных аспектов, представленных в данном документе, способ дополнительно включает помещение суспензии фосфолипидов во флакон и введение газообразного перфторуглерода в пространство над продуктом во флаконе.

В некоторых вариантах осуществления различных аспектов, представленных в данном документе, способ дополнительно включает активацию суспензии фосфолипидов с помощью газообразного перфторуглерода с образованием контрастного средства для ультразвукового исследования, содержащего фосфолипидные микросферы с инкапсулированным газом.

В некоторых вариантах осуществления различных аспектов, представленных в данном документе, способ дополнительно включает введение контрастного средства для ультразвукового исследования субъекту и получение одного или нескольких изображений субъекта в результате ультразвукового исследования с контрастным усилением.

В некоторых вариантах осуществления различных аспектов, представленных в данном документе, способ дополнительно включает измерение концентрации кальция в исходной форме DPPA и/или исходной форме DPPC и/или смеси фосфолипидов и/или однородной смеси фосфолипидов.

Данные и другие аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения будут описаны более подробно в данном документе.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 представляет собой фотографию четырех растворов фосфолипидов, имеющих различные степени осаждения. На фигуре показаны определения на шкале внешнего вида: 0, +, ++ и +++, как используется в примерах.

Фиг. 2 представляет собой фотографию, показывающую внешний вид раствора при последовательных добавлениях DPPC, MPEG5000-DPPE, DPPA и ацетата кальция.

Фиг. 3 представляет собой фотографию, показывающую внешний вид титруемых растворов для ис-

следования 4, описанного в примерах.

Фиг. 4 представляет собой фотографию, показывающую внешний вид растворов, полученных с различными пропорциями MPEG5000-DPPE и MPEG5000-DPPE, содержащими высокие уровни кальция (Ca^{+2}).

Фиг. 5 представляет собой график, показывающий расход при фильтрации для водного состава фосфолипидов, полученного с отдельными фосфолипидами или однородной смесью фосфолипидов, содержащими либо высокие, либо низкие концентрации кальция. Исследования 19 и 23 были сделаны с компонентами с низкой концентрацией кальция, тогда как в исследованиях 20 и 24 они содержали высокие уровни кальция (см. табл. 6 для получения подробной информации). Каждая точка на графике представляет среднее трех последовательных измерений скорости фильтрации с соответствующим временем в каждом исследовании.

Фиг. 6 представляет собой график, показывающий расход при фильтрации для неводного состава фосфолипидов, полученного с отдельными фосфолипидами или однородной смесью фосфолипидов, содержащими либо высокие, либо низкие концентрации кальция. Исследования 33 и 35 были сделаны с компонентами с низкой концентрацией кальция, тогда как в исследованиях 34 и 36 они содержали высокие уровни кальция (см. табл. 9 для получения подробной информации). Каждая точка на графике представляет среднее трех последовательных измерений скорости фильтрации с соответствующим временем в каждом исследовании.

Подробное описание

В данном документе предусмотрены улучшенные способы получения контрастных средств для ультразвукового исследования (UCA) на основе фосфолипидов. Эти улучшения отчасти основаны на неожиданном открытии, заключающемся в том, что определенные составы на основе фосфолипидов, предназначенные для использования в получении контрастных средств для ультразвукового исследования, чувствительны к присутствию и количеству определенных катионов двухвалентных металлов. Конкретно, неожиданно обнаружили, что катионы двухвалентных металлов, такие как кальций, при определенных концентрациях, при введении в состав на основе фосфолипидов, используемый для получения основного контрастного средства для ультразвукового исследования, DEFINITY®, вызывали осаждение фосфолипида и возможно других компонентов состава из раствора, при этом делая состав непригодным. Такие составы обычно получают большими партиями и, таким образом, случайное добавление кальция, например, будет делать всю партию непригодной. Это может приводить к снижению производительности.

Также неожиданно обнаружили, что определенные фосфолипиды более подвержены к осаждению, вызванному присутствием катионов двухвалентных металлов, таких как кальций. Конкретно, DPPA в неводном растворителе, таком как пропиленгликоль, с большей вероятностью образует осадок в присутствии определенных концентраций катионов двухвалентных металлов, таких как кальций. Такая же чувствительность не наблюдалась или наблюдалась в меньшей степени с другими фосфолипидами, такими как DPPC и DPPE. Этот профиль разных осадков может легко обеспечить в результате состав фосфолипидов, и в конечном итоге UCA, имеющий состав, отличный от планируемого или необходимого состава фосфолипидов. Таким образом, присутствие катионов двухвалентных металлов может не только снижать общий выход UCA (например, из-за нефильтруемости содержащего осадок состава фосфолипидов, такого как суспензии фосфолипидов, описанные в данном документе), оно может также негативно влиять на распределение фосфолипидов в UCA. Это является проблемой, поскольку может обеспечивать в результате составы UCA с полностью неизвестным содержанием фосфолипидов. В области фармацевтики хорошо известно, что состав данных составов UCA должен оставаться постоянным и устойчиво воспроизводимым, и отличия между партиями следует избегать или минимизировать до самой высокой возможной степени.

Таким образом, настоящее изобретение предусматривает улучшенные способы получения составов фосфолипидов, таких как растворы фосфолипидов и суспензии фосфолипидов, описанные в данном документе. Эти способы повышают выходы таких составов путем снижения вероятности осаждения фосфолипидов. Они также обеспечивают, более надежным и воспроизводимым образом, составы фосфолипидов, характеризующиеся предполагаемыми профилями и распределения фосфолипидов. Эти способы извлекают пользу из новых и неожиданных результатов, описанных в данном документе, и обеспечивают составы фосфолипидов с необходимыми содержанием и пропорциями фосфолипидов, не прибегая к обнаружению осадка.

Общая информация о составах фосфолипидов.

В данном документе предусмотрены способы получения улучшенных растворов фосфолипидов, суспензий фосфолипидов и в конечном итоге составов UCA. Как будет описано более подробно, в некоторых случаях составы UCA можно образовывать из неводных растворов фосфолипидов, которые объединяют с газом, таким как перфлутрен. В других случаях состав UCA можно образовывать посредством объединения неводного раствора фосфолипидов с водным растворителем с образованием суспензии фосфолипидов, которую объединяют с газом, таким как перфлутрен. Данные и другие содержащие фосфолипиды композиции совместно называют в данном документе составами фосфолипидов. Каждый из

конкретных составов будет описан более подробно ниже. Составы фосфолипидов по настоящему изобретению могут содержать три фосфолипида, которые используют в изготовлении одобренных FDA микросфер DEFINITY®. Данные три фосфолипида представляют собой:

- (1) 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (называемый в данном документе DPPC);
- (2) 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидную кислоту (называемую в данном документе DPPA);
- (3) N-(метоксиполиэтиленгликоль-5000-карбамоил)-1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтанолламин (называемый в данном документе MPEG5000-DPPE).

Составы фосфолипидов по настоящему изобретению могут содержать DPPC и MPEG-5000-DPPE.

В некоторых случаях можно использовать модифицированные формы одного или нескольких из данных фосфолипидов. Например, 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтанолламин (DPPE) может быть конъюгирован с полиэтиленгликолем (PEG). PEG, конъюгированный с DPPE или другим фосфолипидом, может характеризоваться молекулярной массой (MW или длину), выбранной из 1000-10000, в некоторых неограничивающих случаях. Более типично, PEG может характеризоваться MW приблизительно 5000, в случае чего он называется PEG5000 и, когда он конъюгирован с DPPE, называется PEG5000-DPPE. PEG обычно конъюгирован с фосфолипидом, таким как DPPE, на концевой фосфолипидной группе, а не на концевой группе, представляющей собой алифатическую цепь. PEG может содержать гидроксид- или метоксигруппу на конце и может называться HO-PEG5000 или MPEG5000 соответственно.

В случае конъюгирования с DPPE в качестве примера конъюгат может называться HO-PEG5000-DPPE или MPEG5000-DPPE. Полное химическое название последнего конъюгата представляет собой N-(метоксиполиэтиленгликоль-5000-карбамоил)-1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтанолламин, моновалентная соль (называемая в данном документе MPEG5000-DPPE).

DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE могут использоваться в мольных процентах, составляющих приблизительно 77-90 мол.% DPPC, приблизительно 5-15 мол.% DPPA и приблизительно 5-15 мол.% DPPE, в том числе MPEG5000-DPPE. Предпочтительные отношения каждого фосфолипида включают отношения в вес.%, представляющие собой 6,0 к 53,5 к 40,5 (DPPA:DPPC:MPEG5000-DPPE), или отношение в мол.%, представляющее собой 10 к 82 к 8 (10: 82: 8) (DPPA:DPPC:MPEG5000-DPPE).

Остальная часть настоящего изобретения будет относиться, в частности, к DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE для удобства и краткости, но следует понимать, что идеи, представленные в данном документе, предназначены для охватывания способов, в которых их используют, и/или композиции, которые содержат эти или другие фосфолипиды отдельно или в комбинации, такой как, без ограничения, комбинация DPPC и MPEG5000-DPPE.

Различные способы, представленные в данном документе, включают измерение концентрации двухвалентного металла в компонентах, используемых для получения составов фосфолипидов, описанных в данном документе. Особенно важными являются компоненты, используемые для получения растворов фосфолипидов, особенно поскольку осаждение оказывается явлением, наблюдаемым вначале на стадии образования раствора фосфолипидов, а не на стадии образования суспензии фосфолипидов. Способы, которые можно использовать для измерения концентрации катионов двухвалентных металлов, такой как концентрация кальция и магния, описаны более подробно в данном документе, включая и примеры. Некоторые способы могут предусматривать измерение концентрации катионов двухвалентных металлов только в одном компоненте, таком как, например, MPEG5000-DPPE. Другие способы могут предусматривать измерение концентрации катионов двухвалентных металлов в двух или более компонентах, таких как, например, два или три фосфолипида. В некоторых вариантах осуществления компоненты можно объединять вместе перед осуществлением измерения. Еще одни способы предусматривают измерение концентрации катионов двухвалентных металлов во всех компонентах, включая неводный растворитель, используемых для получения состава фосфолипидов, такого как раствор фосфолипидов. Такое измерение может быть выполнено до или после объединения компонентов.

Например, можно выполнить измерение отдельных компонентов, используемых для получения раствора фосфолипидов, или его можно выполнить для собственно раствора фосфолипидов.

Различные другие способы, представленные в данном документе, предусматривают выбор компонентов, используемых для получения составов фосфолипидов, таких как растворы фосфолипидов, на основе их концентрации катионов двухвалентных металлов. Более конкретно, способы предусматривают выбор одного или нескольких компонентов, которые характеризуются отсутствием катионов двухвалентных металлов или их низкой концентрацией или идентифицируются как таковые, включая отсутствие кальция или его низкую концентрацию или отсутствие магния или его низкую концентрацию. Некоторые способы могут предусматривать выбор одного компонента, такого как MPEG5000-DPPE, характеризующегося отсутствием катионов двухвалентных металлов или их низкой концентрацией или идентифицированного как таковой, включая отсутствие кальция или его низкую концентрацию или отсутствие магния или его низкую концентрацию. Некоторые способы могут предусматривать выбор двух или более или всех компонентов на основе их объединенной концентрации катионов двухвалентных металлов. Таким образом, предусматривается, что DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE, а также другие компоненты, такие как без ограничения неводный растворитель и/или его отдельные компоненты, могут по отдельности

характеризоваться отсутствием катионов двухвалентных металлов или их низкой концентрацией, но что при использовании вместе их объединенная концентрация катионов двухвалентных металлов больше не будет удовлетворять требованию отсутствия катионов двухвалентных металлов или их низкой концентрации и будет вызывать осаждение. Таким образом, в этих и других случаях два, три или все компоненты, такие как два или три фосфолипида, можно выбирать так, чтобы их объединенная концентрация катионов двухвалентных металлов соответствовала отсутствию катионов двухвалентных металлов или их низкой концентрации.

Раствор фосфолипидов.

Как используется в данном документе, раствор фосфолипидов относится к композиции, содержащей один или несколько фосфолипидов в неводном растворителе. Раствор фосфолипидов может как минимум содержать DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE в неводном растворителе. Раствор фосфолипидов может как минимум содержать DPPC и MPEG5000-DPPE в неводном растворителе.

Неводный растворитель, как используется в данном документе, представляет собой растворитель, который вызывает растворение фосфолипидов, за счет чего обеспечивается образование раствора (т.е. раствора фосфолипидов). Предпочтительно неводный растворитель, присутствующий в растворе фосфолипидов, является фармацевтически приемлемым, в частности, поскольку он доходит до конечного состава USA, который вводят субъекту, включая субъекта-человека. В определенных вариантах осуществления неводный растворитель, используемый для получения раствора фосфолипидов, не представляет собой метанол, или толуол, или метил-трет-бутиловый эфир (MTBE) или не содержит их.

Неводный растворитель в растворе фосфолипидов может представлять собой один растворитель или он может представлять собой комбинацию растворителей. Неводные растворители включают, без ограничения, пропиленгликоль (который может в данном документе называться PG) и глицерин (который может в данном документе называться G). Оба предоставлены в виде жидких исходных форм. В некоторых случаях неводный растворитель в растворе фосфолипидов может представлять собой PG в отдельности, или он может представлять собой смесь PG и G (которая может называться PG/G). Неводный растворитель, который содержит по меньшей мере PG, может в данном документе называться содержащим PG неводным растворителем. Смеси PG/G предусматривают отношения в диапазоне от 5:1 до 1:5 (вес./вес.). В некоторых вариантах осуществления используют отношение PG:G вес./вес. 1:1 (и в данном документе его называют смесью 1:1).

Раствор фосфолипидов может дополнительно содержать один или несколько буферов. Такие буферы являются буферами, способными забуферивать неводный растворитель, такой как указанные выше. Примеры включают, без ограничения, ацетатный буфер (например, комбинацию ацетата натрия и уксусной кислоты), бензоатный буфер (например, комбинацию бензоата натрия и бензойной кислоты) и салицилатный буфер (например, комбинацию салицилата натрия и салициловой кислоты). Другие буферы, которые можно использовать, включают диэтаноламиновый буфер, триэтаноламиновый буфер, боратный буфер, карбонатный буфер, глутаматный буфер, сукцинатный буфер, малатный буфер, тартратный буфер, глутаратный буфер, аконитовый буфер, цитратный буфер, лактатный буфер, глицератный буфер, глюконатный буфер и трис-буфер. В некоторых вариантах осуществления используют ацетатный буфер. Буфер, используемый в неводном растворителе, может быть отличным от фосфатного буфером, подразумевая, что он не является фосфатным буфером.

Концентрация буфера будет изменяться в зависимости от типа используемого буфера, как будет понятно и сможет определить средний специалист в данной области техники. Концентрация буфера в неводном растворителе может находиться в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 100 мМ, включая от приблизительно 1 до приблизительно 50 мМ, или от приблизительно 1 до приблизительно 20 мМ, или от приблизительно 1 до приблизительно 10 мМ, или от приблизительно 1 до приблизительно 5 мМ, включая приблизительно 5 мМ.

Соответственно, раствор фосфолипидов может содержать один или несколько фосфолипидов, таких как DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE, неводный растворитель, который представляет собой PG или содержит его, и, необязательно, буфер, такой как ацетатный буфер.

Раствор фосфолипидов можно получать рядом способов, несколько из которых описаны более подробно ниже. В общем, неводный растворитель можно нагревать перед приведением в контакт с фосфолипидами, и, если его используют, буфер можно сначала помещать в растворитель перед приведением в контакт с фосфолипидами. Растворитель, а затем раствор можно перемешивать для способствования растворению фосфолипидов.

Что важно, обнаружили, что осаждение фосфолипидов, связанное с катионами двухвалентных металлов, происходит в неводном растворителе и, таким образом, в процессе получения раствора фосфолипидов. Таким образом, как описано в данном документе, различные способы включают стадии измерения концентрации катионов двухвалентных металлов в различных компонентах, используемых для получения раствора фосфолипидов, включая фосфолипиды, или отдельно, или совместно, неводный растворитель, такой как PG и G, буфер, такой как ацетатный буфер, если используется, и подобное.

В некоторых вариантах осуществления концентрация катионов двухвалентных металлов в суспензии фосфолипидов может измеряться, вместо или в дополнение к измерению концентрации катионов

двухвалентных металлов в растворе фосфолипидов.

Визуальное наблюдение раствора фосфолипидов можно проводить для обнаружения осадка, хотя и не обязательно. Фиг. 1 представляет собой фотографию, показывающую различные растворы фосфолипидов, имеющие различные степени осадка.

В некоторых вариантах осуществления раствор фосфолипидов затем используют для получения суспензии фосфолипидов, описанной более подробно ниже.

В некоторых вариантах осуществления раствор фосфолипидов непосредственно приводят в контакт с газом, таким как газообразный перфторуглерод, с получением фосфолипидных микросфер с инкапсулированным газом, без первоначального приведения в контакт раствора фосфолипидов с водным растворителем. А именно, в некоторых случаях фосфолипидные микросферы с инкапсулированным газом получают посредством приведения в контакт и энергичного встряхивания (называемым активацией) (неводного) раствора фосфолипидов и газа. Такие микросферы могут затем приводить в контакт с водным растворителем с образованием USA.

Суспензия фосфолипидов.

Как используется в данном документе, суспензия фосфолипидов относится к водному составу фосфолипидов, содержащему раствор фосфолипидов и водный растворитель. Суспензия фосфолипидов может содержать один или несколько фосфолипидов, таких как DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE. Суспензия фосфолипидов будет как минимум содержать один или несколько фосфолипидов, таких как один или несколько фосфолипидов, неводный растворитель, такой как PG, и водный растворитель.

Водный растворитель, как используется в данном документе, представляет собой воду или содержит ее в качестве своего основного компонента (по весу). Водный растворитель может дополнительно содержать одну или более солей и, таким образом, может называться водным солевым раствором. Он может дополнительно или в качестве альтернативы содержать буфер и, таким образом, может называться водным забуференным солевым раствором или водным забуференным растворителем. Предпочтительно водный растворитель, несмотря на то, содержит ли он соль(соли) или буфер(буферы), является фармацевтически приемлемым, поскольку подобно раствору фосфолипидов он доходит до конечного состава USA, который вводят субъекту, включая субъекта-человека.

Соли, которые можно включить в водный растворитель, включают, без ограничения, хлорид натрия.

Буферы, которые можно включить в водный растворитель, включают, без ограничения, фосфатный буфер, ацетатный буфер, бензоатный буфер, салицилатный буфер, диэтаноламиновый буфер, триэтаноламиновый буфер, боратный буфер, карбонатный буфер, глутаматный буфер, сукцинатный буфер, малатный буфер, тартратный буфер, глутаратный буфер, аконитовый буфер, цитратный буфер, лактатный буфер, глицератный буфер, глюконатный буфер и трис (трис-(гидроксиметил)метиламин) буфер. Обычно или неводный растворитель, или водный растворитель содержит буфер, но не оба. Концентрация буфера будет изменяться в зависимости от типа используемого буфера, как будет понятно и сможет определить средний специалист в данной области техники. Концентрация буфера в водном растворителе может находиться в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 100 мМ, включая от приблизительно 1 до приблизительно 50 мМ, или от приблизительно 10 до приблизительно 30 мМ, или от приблизительно 20 до приблизительно 30 мМ, или от приблизительно 20 до приблизительно 25 мМ, включая приблизительно 25 мМ.

Соответственно, суспензия фосфолипидов может содержать один или несколько фосфолипидов, таких как DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE, неводный растворитель, который представляет собой PG или содержит его, водный растворитель, который может содержать одну или несколько солей, таких как хлорид натрия, и необязательно буфер, такой как ацетатный буфер или фосфатный буфер. Суспензии фосфолипидов можно физически охарактеризовать как фосфолипиды, суспендированные, а не растворенные, в водном растворителе.

Суспензию фосфолипидов обычно получают посредством приведения в контакт раствора фосфолипидов, который является неводным, с водным растворителем. Водный растворитель может уже содержать любые соли и/или любые буферы или в качестве альтернативы их можно добавлять после приведения в контакт с раствором фосфолипидов. Водный растворитель можно перемешивать для обеспечения смешивания раствора фосфолипидов с водным растворителем. Водный растворитель можно также нагревать перед приведением в контакт с раствором фосфолипидов, который в некоторых случаях можно также нагревать.

Неожиданно концентрация катионов двухвалентных металлов в водном растворителе не является настолько важной, как концентрация в неводном растворе фосфолипидов (и его объединенных компонентах). Например, неожиданно обнаружили, что после получения раствора фосфолипидов, не содержащего осадка, его можно объединить с водным растворителем, который характеризуется высокой концентрацией катионов двухвалентных металлов, не вызывая никакого видимого осаждения фосфолипидов. Таким образом, неожиданно обнаружили, что чувствительность фосфолипидов к высокому содержанию катионов двухвалентных металлов существует только в растворе фосфолипидов или в присутствии неводного растворителя, но не далее этой точки. Аналогично, обнаружили, что после образования осадка в

растворе фосфолипидов контакт с водным растворителем, даже нагретым, не приводит к его растворению. Эта различная чувствительность фосфолипидов и, в частности, DPPA к высоким уровням катионов двухвалентных металлов, таких как уровни кальция, ранее не принималась во внимание и рассматривалась как неожиданный результат.

Хотя концентрация катионов двухвалентных металлов в водном растворителе по-видимому не вызывает осаждение одного или нескольких фосфолипидов, она неожиданно вызывает осаждение других компонентов, включая, что особенно важно, фосфат, который может присутствовать, если фосфатный буфер используют в водном растворителе. Таким образом, в некоторых случаях способы, представленные в данном документе, могут дополнительно включать измерение концентрации катионов двухвалентных металлов в компонентах, используемых для получения водных суспензий фосфолипидов, которые содержат фосфат. В качестве альтернативы способы могут включать выбор отдельных компонентов или объединенных компонентов, которые характеризуются, отдельно или в комбинации, отсутствием катионов двухвалентных металлов или их низкой концентрацией.

Суспензию фосфолипидов можно затем использовать для получения фосфолипидных микросфер с инкапсулированным газом.

Фосфолипидные микросферы с инкапсулированным газом и составы USA, содержащие их.

Как будет очевидно, контрастные средства для ультразвукового исследования на основе фосфолипидов по настоящему изобретению представляют собой фосфолипидные микросферы с инкапсулированным газом. Данные микросферы можно получить рядом способов. Например, раствор фосфолипидов можно приводить в контакт с водным растворителем с образованием суспензии фосфолипидов, и суспензию фосфолипидов можно приводить в контакт с газом, таким как газообразный перфторуглерод, с образованием фосфолипидных микросфер с инкапсулированным газом. В качестве другого примера неводный раствор фосфолипидов можно приводить в контакт с газом, таким как газообразный перфторуглерод, с образованием фосфолипидных микросфер с инкапсулированным газом. В любом случае состав фосфолипидов, является ли он неводным раствором фосфолипидов или водной суспензией фосфолипидов, объединяют с газом способом, достаточным для образования фосфолипидных микросфер с инкапсулированным газом. Это обычно предусматривает энергичное встряхивание или другое перемешивание. Достаточное встряхивание или перемешивание обычно достигают с применением устройства, такого как VIALMIX®, и обычно не достигают вручную.

Раствор фосфолипидов или суспензия фосфолипидов предоставляются в контейнере, таком как флакон, содержащий газ в пространстве над продуктом.

Газообразный перфторуглерод, такой как перфлутрен, вводят в свободное пространство над продуктом таких контейнеров, обычно посредством способа газообмена. Этот данный флакон затем энергично встряхивают для образования фосфолипидных микросфер с инкапсулированным газом. Данный процесс, известный как активация, проводит конечный пользователь или медицинский персонал непосредственно перед введением субъекту.

Микросферы содержат газ, такой как газообразный перфторуглерод, включая, без ограничения, газообразный перфлутрен, в своей внутренней полости. Фосфолипидная оболочка, которая инкапсулирует газ, может быть устроена в виде монослоя или бислоя, в том числе одноламеллярных или многоламеллярных бислоевых структур. Микросферы могут характеризоваться средним диаметром, составляющим менее 10 мкм, или менее 6 мкм, или менее 3 мкм, или более предпочтительно менее 2 мкм. Под данными средними диаметрами подразумевается, что при анализе совокупности микросфер средний диаметр совокупности составляет менее 10 мкм, или менее 6 мкм, или менее 3 мкм, или более предпочтительно менее 2 мкм. Микросферы могут характеризоваться средним диаметром, находящимся в диапазоне от 0,5 до 3 мкм, или от 1 до 2 мкм, или от 1,4 до 1,8 мкм, или от 1,4 до 1,6 мкм. Средний диаметр может составлять приблизительно 1,4 мкм.

Процесс получения фосфолипидных микросфер с инкапсулированным газом известен как активация. Составы, которые содержат достаточную концентрацию фосфолипидных микросфер с инкапсулированным газом, могут называться в данном документе активированными составами.

Будет понятно, что концентрация микросфер с газом, которая является "достаточной", будет зависеть от того, получают ли микросферы с газом с применением раствора фосфолипидов (без промежуточного использования водного растворителя) или получают с применением суспензии фосфолипидов. Обычно состав USA, вводимый субъекту, будет содержать порядка приблизительно по меньшей мере 1×10^7 микросфер/мл вводимого состава, или по меньшей мере 5×10^7 микросфер/мл, или по меньшей мере $7,5 \times 10^7$ микросфер/мл, или по меньшей мере 1×10^8 микросфер/мл, или по меньшей мере 1×10^9 микросфер/мл, или приблизительно 5×10^9 микросфер/мл. Диапазон значений концентрации микросфер может в некоторых случаях представлять собой от 1×10^7 до 1×10^{10} микросфер/мл вводимого состава и в более типичном случае от 5×10^7 до 5×10^9 микросфер/мл.

В зависимости от того, как они получены, микросферы с газом могут находиться в неводном растворителе или в водном растворителе. Несмотря на это, перед введением субъекту их обычно разводят в водном растворе, который может представлять собой солевой раствор, или забуференный водный рас-

твор, или забуференный солевой раствор. Состав UCA, подлежащий введению, обычно внутривенно, субъекту, в том числе субъекту-человеку, может характеризоваться значением pH, находящимся в диапазоне 4-8 или в диапазоне 4,5-7,5. В некоторых случаях значение pH может находиться в диапазоне от приблизительно 6 до приблизительно 7,5 или в диапазоне от 6,2 до приблизительно 6,8. В еще одних случаях значение pH может составлять приблизительно 6,5 (например, $6,5 \pm 0,5$ или $\pm 0,3$). В некоторых случаях значение 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 еще одном случае значение pH может находиться в диапазоне от приблизительно 5,7 до приблизительно 5,9 (например, $\pm 0,1$, или $\pm 0,2$, или $\pm 0,3$ с любого из двух или обоих концов диапазона). В другом случае значение pH может составлять приблизительно 5,8 (например, $5,8 \pm 0,15$ или $5,8 \pm 0,1$).

Газ предпочтительно является по сути нерастворимым в составах фосфолипидов, представленных в данном документе, включая раствор фосфолипидов и суспензию фосфолипидов. Газ может представлять собой нерастворимый фторированный газ, такой как гексафторид серы или газообразный перфторуглерод. Примеры газообразных перфторуглеродов включают перфторпропан, перфторметан, перфторэтан, перфторбутан, перфторпентан, перфторгексан. Примеры газов, которые могут использоваться, описаны в патенте США № 5656211 и включены в данный документ посредством ссылки. В важном варианте осуществления газ представляет собой перфторпропан.

Катионы двухвалентных металлов и способы их измерения.

Катионы двухвалентных металлов представляют собой ионы двухвалентных металлов с валентностью 2. Они включают барий(2+), бериллий(2+), кадмий(2+), кальций(2+), хром(2+), кобальт(2+), медь(2+), европий(2+), гадолиний(2+), германий(2+), железо(2+), лантан(2+), свинец(2+), магний(2+), марганец(2+), ртуть(2+), никель(2+), осмий(2+), платину(2+), рутений(2+), стронций(2+), олово(2+), уран(2+), ванадий(2+), иттрий(2+) и цинк(2+).

В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес катионы двухвалентных металлов представляют собой кальций, магний и марганец. В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес катионы двухвалентных металлов представляют собой кальций и магний, и, таким образом, только кальций и магний измеряют или компоненты выбирают только на основе их содержания кальция и магния. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес катион двухвалентного металла представляет собой кальций, и, таким образом, только кальций измеряют или компоненты выбирают только на основе их содержания кальция.

Влияние катионов двухвалентных металлов.

Как описано в данном документе, катионы двухвалентных металлов могут присутствовать в одном или нескольких компонентах, используемых для получения составов UCA. Их присутствие может не быть принято во внимание, до объединения данных компонентов с неводным растворителем с образованием раствора фосфолипидов, после чего, например, может начаться осаждение фосфолипидов или до объединения данных компонентов с водным растворителем с образованием суспензии фосфолипидов, после чего, например, может начаться осаждение фосфатов. Неожиданно в соответствии с настоящим изобретением обнаружили, что исходная форма фосфолипида MPEG5000-DPPE содержала кальций и магний в достаточно высоких концентрациях, чтобы вызвать осаждение по меньшей мере фосфолипида DPPA при объединении. Таким образом, катионы двухвалентных металлов могут иметь различное влияние на различные фосфолипиды, и пользователь может быть неочевидно, содержит ли фосфолипид (или другой компонент) такие катионы в достаточной концентрации, чтобы вызвать осаждение.

Авторы данного изобретения обнаружили в процессе получения различных составов UCA, что неводный растворитель становится мутным при объединении с однородной смесью фосфолипидов, содержащей фосфолипиды DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE. Дополнительно было определено, что мутный вид вероятно был вызван осаждением фосфолипида DPPA. Однако авторам был неизвестен тот факт, что MPEG5000-DPPE содержал высокие концентрации ионов кальция и магния, и что эти концентрации кальция и магния, вероятно, вызывали осаждение DPPA. Интересно, что такие катионы, по-видимому, не влияли на способность MPEG5000-DPPE оставаться в растворе и, таким образом, пользователь не примет во внимание этот факт, до объединения данного фосфолипида с другими в неводной смеси. Дополнительные исследования, описанные более подробно в данном документе, показали, что осаждение происходило, когда исходную форму MPEG5000-DPPE, позднее охарактеризованную как характеризующуюся высокой концентрацией кальция, объединяли с DPPA, независимо от порядка добавления или присутствия других компонентов, таких как другие фосфолипиды, такие как DPPC и DPPA. Склонность DPPA к осаждению в неводном растворителе, содержащем PG, в присутствии достаточно высокой концентрации катионов двухвалентных металлов, таких как концентрация кальция и магния, но не в водном растворителе, характеризующемся аналогичными высокими концентрациями любого или обоих из кальция и магния, была еще более неожиданной. Другими словами, концентрации кальция, которые вызывали осаждение DPPA в неводном растворителе, содержащем PG, не вызывали осаждение DPPA в водном растворителе, и это тоже было неожиданным.

Отсутствие катионов двухвалентных металлов или их низкая концентрация.

Как используется в данном документе, компоненты выбирают так, что они характеризуются отсутствием катионов двухвалентных металлов или их низкой концентрацией или идентифицируются как таковые, что включает отсутствие кальция или его низкую концентрацию. Такая концентрация катионов двухвалентных металлов выражается как значение вес./вес. (т.е. вес катиона двухвалентного металла на единицу веса базовой матрицы или растворителя, в котором представляющий интерес компонент находится). Концентрация в микрограммах на 1 г может альтернативно называться частями на миллион или ppm.

Отсутствие кальция или его низкая концентрация в данном компоненте будет дополнительно зависеть от того, сколько данного компонента используют или, другими словами, сколько такого компонента разводят с образованием раствора фосфолипидов или суспензии фосфолипидов.

В простейшем случае только один компонент представляет интерес, и только его концентрацию кальция измеряют или только этот компонент выбран на основе его концентрации кальция. На основе настоящего изобретения специалист в данной области техники поймет и сможет определить, сколько кальция будет допускаться в данном компоненте, чтобы избежать осаждения в растворе фосфолипидов или суспензии фосфолипидов.

В качестве примера концентрация кальция в исходной форме фосфолипида (которая обычно предоставляется в виде твердого вещества, такого как порошок) выражена как вес кальция на 1 г фосфолипида. Примером является вес кальция на 1 г MPEG5000-DPPE или вес кальция на 1 г DPPC. Если два компонента, таких как два фосфолипида, объединяют, мера может представлять собой вес кальция на 1 г объединенных MPEG5000-DPPE и DPPC.

Отсутствие катиона двухвалентного металла, такого как кальций, относится к концентрации такого катиона, которую невозможно обнаружить, используя способы, известные из уровня техники и/или представленные в данном документе.

Отсутствие катионов двухвалентных металлов или их низкая концентрация в исходной форме фосфолипида будут зависеть от конкретного компонента.

Отсутствие катионов двухвалентных металлов или их низкая концентрация в исходной форме фосфолипида MPEG5000-DPPE предусматривают менее 510 мкг/г (т.е. 1 мкг катиона двухвалентного металла на 1 г MPEG5000-DPPE) (также называемая менее 510 ppm), включая менее 345 ppm, менее 230 ppm, менее 115 ppm, менее 57,5 ppm и менее 11,5.

Отсутствие катионов двухвалентных металлов или их низкая концентрация в исходной форме фосфолипида DPPC предусматривают менее 390 мкг/г (т.е. 1 мкг катиона двухвалентного металла на 1 г DPPC) (также называемая менее 390 ppm), включая менее 270 ppm, менее 180 ppm, менее 90 ppm, менее 45 ppm и менее 9 ppm.

Отсутствие катионов двухвалентных металлов или их низкая концентрация в исходной форме фосфолипида DPPA предусматривают менее 3440 мкг/г (т.е. 1 мкг катиона двухвалентного металла на 1 г DPPA) (также называемая менее 3440 ppm), включая менее 2340 ppm, менее 1560 ppm, менее 780 ppm, менее 390 ppm и менее 78 ppm.

Отсутствие катионов двухвалентных металлов или их низкая концентрация в однородной смеси фосфолипидов предусматривают менее 210 мкг/г (т.е. микрограмм катиона двухвалентного металла на 1 г однородной смеси фосфолипидов или объединенного веса MPEG5000-DPPE, DPPC и DPPA) (также называемая менее 210 ppm), включая менее 150 ppm, менее 100 ppm, менее 50 ppm, менее 25 ppm и менее 5 ppm.

Отсутствие катионов двухвалентных металлов или их низкая концентрация в пропиленгликоле предусматривают менее 3,1 мкг/г (т.е. 1 мкг катиона двухвалентного металла на 1 г пропиленгликоля) (также называемая менее 3,1 ppm), включая менее 2,1 ppm, менее 1,4 ppm, менее 0,7 ppm, менее 0,35 ppm и менее 0,07 ppm.

Отсутствие катионов двухвалентных металлов или их низкая концентрация в смеси пропиленгликоля и глицерина 1:1 (вес./вес.) предусматривают менее 10,4 мкг/г (т.е. 1 мкг катиона двухвалентного металла на 1 г объединенных пропиленгликоля и глицерина) (также называемая менее 10,4 ppm), включая менее 7,8 ppm, менее 5,2 ppm, менее 2,6 ppm, менее 1,3 ppm и менее 0,26 ppm.

Отсутствие катионов двухвалентных металлов или их низкая концентрация в глицерине предусматривают менее 20,4 мкг/г (т.е. 1 мкг катиона двухвалентного металла на 1 г глицерина) (также называемая менее 20,4 ppm), включая менее 15,3 ppm, менее 10,2 ppm, менее 5,10 ppm, менее 2,6 ppm, менее 0,51 ppm.

Отсутствие катионов двухвалентных металлов или их низкая концентрация в растворе фосфолипидов, который содержит только пропиленгликоль в качестве неводного растворителя, предусматривает менее 3,1 мкг/г (т.е. 1 мкг катиона двухвалентного металла на 1 г всех компонентов раствора фосфолипидов) (также называемая менее 3,1 ppm), включая менее 2,1 ppm, менее 1,4 ppm, менее 0,7 ppm, менее 0,35 ppm и менее 0,07 ppm. Как будет понятно на основе состава раствора фосфолипидов, основной компонент по весу представляет собой неводный растворитель, в данном конкретном случае - пропиленгликоль.

Следует понимать, что такие же пределы концентрации применимы к концентрации кальция и кон-

центрации магния, а также объединенным концентрациям кальция и магния.

В настоящем изобретении рассматривается измерение концентрации катионов двухвалентных металлов в одном или нескольких компонентах раствора фосфолипидов, включая, например, одну, две или все три исходные формы фосфолипидов, необязательно вместе с измерением концентрации катионов двухвалентных металлов в неводном растворителе, таком как пропиленгликоль и/или глицерин, в зависимости от природы раствора фосфолипидов. Если любые из данных компонентов содержат концентрацию катионов двухвалентных металлов свыше этих пределов, указанных выше, тогда предполагается, что как только раствор фосфолипидов получают из такого компонента, такой раствор фосфолипидов будет склонен к осаждению.

В некоторых вариантах осуществления рассматривается, что один компонент будут анализировать в отношении его концентрации катионов двухвалентных металлов и что, если такая концентрация соответствует "отсутствию катионов двухвалентных металлов или их низкой концентрации", компонент можно объединять с остальными компонентами, даже если такие компоненты не анализировали в отношении их концентрации катионов двухвалентных металлов. Компоненты раствора фосфолипидов включают исходные формы, предоставленные либо по отдельности, либо в виде однородной смеси, содержащей неводные растворители, такие как пропиленгликоль и глицерин, и, необязательно, буферы.

В некоторых вариантах осуществления рассматривается, что у более одного, но не у всех компонентов раствора фосфолипидов будут измерять их концентрацию катионов двухвалентных металлов. В некоторых случаях, если один из компонентов характеризуется концентрацией катионов двухвалентных металлов, которая превышает предел "отсутствия катионов двухвалентных металлов или их низкой концентрации", указанный выше, тогда его невозможно использовать для получения раствора фосфолипидов (или однородной смеси фосфолипидов). В некоторых случаях ни один из компонентов не может быть охарактеризован или идентифицирован как характеризующийся концентрацией катионов двухвалентных металлов, которая больше, чем соответствующая "отсутствию катионов двухвалентных металлов или их низкой концентрации". Однако, если такие компоненты используют в комбинации, объединенная концентрация катионов двухвалентных металлов можно определить на основе количества, которое каждая составляющая вносит в раствор фосфолипидов. Рассматривается, что объединенная концентрация катионов двухвалентных металлов может превышать концентрацию, соответствующую "отсутствию катионов двухвалентных металлов или их низкой концентрации", как определено выше для раствора фосфолипидов или может не превышать ее.

Как обсуждается во всем документе, различные уровни, указанные в данном документе, при ссылке к катионам двухвалентных металлов, относятся в равной мере к кальцию. В примерах показано, что наиболее низкая концентрация кальция, при которой осаждение фосфолипида очевидно, составляет приблизительно 0,7 мкг кальция на 1 г неводного растворителя (см. примеры 1 и 2), в ином случае называемая приблизительно 0,7 ppm. Таким образом, отсутствие катионов двухвалентных металлов или их низкая концентрация, как, например, отсутствие кальция или его низкая концентрация, в неводном растворе фосфолипидов предусматривает менее 0,7 ppm, менее 0,35 ppm или менее 0,07 ppm. Следует понимать, что концентрация катионов двухвалентных металлов в растворе фосфолипидов менее 0,7 ppm будет также рассматриваться как отсутствие ионов двухвалентных металлов или их низкая концентрация.

Концентрация катионов двухвалентных металлов в водной суспензии фосфолипидов может быть представлена как вес катиона двухвалентного металла на 1 г водного растворителя. Обычно суспензия фосфолипидов образуется посредством разведения неводного раствора фосфолипидов приблизительно в 20 раз в водном растворителе. Таким образом, отсутствие ионов двухвалентных металлов или их низкая концентрация в суспензии фосфолипидов предусматривают менее 0,035 мкг/г суспензии фосфолипидов. Аналогично, концентрация кальция в суспензии фосфолипидов, полученной из раствора фосфолипидов, составляет менее 0,035 мкг/г суспензии фосфолипидов.

Концентрация, при которой катионы двухвалентных металлов вызывают осаждение фосфолипидов, может зависеть от температуры. При более высоких температурах более высокие концентрации катионов могут быть допустимыми до наблюдения осаждения. При более низких температурах более низкие концентрации катионов могут вызывать начало осаждения.

В качестве примера при значениях температуры, составляющих приблизительно 55°C (например, 50-60°C), отсутствие катионов двухвалентных металлов или их низкая концентрация соответствуют концентрации катионов двухвалентных металлов, составляющей менее 0,7 мкг кальция на 1 г раствора фосфолипидов или неводного растворителя. Данный уровень может быть несколько ниже, если раствор фосфолипидов получают при более низкой температуре. В качестве альтернативы данный уровень может быть несколько выше, если раствор фосфолипидов получают при более высокой температуре.

Источники кальция.

Как показано в примерах, раствор фосфолипидов неожиданно и уникально является чувствительным к конкретным уровням кальция. Эта уникальная чувствительность не была ранее отмечена. Учитывая влияние кальция на получение раствора фосфолипидов и, таким образом, в конечном итоге на USA, важно измерять и, таким образом, контролировать концентрацию кальция в растворе фосфолипидов. Кальций может присутствовать в каждом из компонентов раствора фосфолипидов, включая исходные

формы и неводные растворители, как описано ниже.

Кальций и магний представляют собой двухвалентные щелочноземельные металлы из 2 группы периодической системы. Кальций является пятым наиболее распространенным по массе элементом в земной коре, и катион Ca^{2+} также является пятым наиболее распространенным растворимым ионом в морской воде. Он присутствует на различных уровнях в водопроводной воде в зависимости от "жесткости". Общая жесткость воды представляет сумму мольных концентраций Ca^{2+} и Mg^{2+} , в диапазоне от мягкой при 0-60 ppm до очень жесткой ≥ 181 .

Кальций и магний также присутствуют в различных концентрациях в экстракте неочищенного глицерина из биодизелей. Уровень кальция и магния указывали в диапазоне от 12 до 163 ppm и от 4 до 127 ppm соответственно, в зависимости от масла из семян для производства биодизеля (J.C. Thompson, 2006, Applied Engineering in Agriculture. Vol. 22(2):261-265). Основным источником глицерина получают из этого побочного продукта получения биодизеля. Экстракт неочищенного глицерина можно очистить посредством обработки с помощью активированного угля для удаления органических примесей, щелочи для удаления непрореагировавших сложных эфиров глицерина и ионного обмена для удаления солей. Глицерин высокой чистоты (>99,5%) получают многоступенчатой дистилляцией; вакуум целесообразен из-за высокой температуры кипения глицерина (290°C).

В промышленности пропиленгликоль получают из пропиленоксида. Различные производители используют либо некаталитический высокотемпературный процесс при от 200°C (392°F) до 220°C (428°F), либо каталитический способ, который происходит при от 150°C (302°F) до 180°C (356°F) в присутствии ионообменной смолы или небольшого количества серной кислоты или щелочи. Конечные продукты содержат 20% пропиленгликоля, 1,5% дипропиленгликоля и небольшие количества других полипропиленгликолей. Дополнительная очистка обеспечивает конечный пропиленгликоль промышленной чистоты или чистоты по USP/JP/EP/VP, которая обычно составляет 99,5% или больше. Пропиленгликоль также можно превращать из глицерина, побочного продукта получения биодизеля.

Содержание кальция и магния в пропиленгликоле и глицерине фармакопейной чистоты не определяют количественно в качестве сертификата требований к анализу фармакопеи США, европейской фармакопеи, фармакопеи Великобритании или фармакопеи Японии.

Фосфолипид DPPA содержит фосфат, который может быть ионизированным при соответствующем pH. pKa для двух гидроксильных групп фосфата составляет 6,2 и 1,8 (Tatlian Ionization and Binding, 511-552, Phospholipid Handbook, Ed. G. Ceve, 1993). DPPA коммерчески доступен в виде различных солевых форм. Обычно используют соль Na, но соль Ca также доступна.

DPPC представляет собой цвиттер-ион и, таким образом, не требует противоиона.

MPEG5000-DPPE представляет собой модифицированный DPPE, который характеризуется pKa, составляющими 1,9 и 9,3 для гидроксила фосфата и амина этаноламина (Tatlian Ionization and Binding, 511-552, Phospholipid Handbook, Ed. G. Ceve, 1993). MPEG500-DPPE доступен в виде Na соли.

Способы измерения концентрации катионов двухвалентных металлов.

Количественное определение концентрации катионов двухвалентных металлов можно осуществлять с применением одной из нескольких известных техник. Они включают способы атомной спектроскопии, такие как атомно-абсорбционная спектроскопия (AAS), пламенная фотометрия или атомно-эмиссионная спектрометрия пламени (FAES), атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой (ICP-AES) и другие способы, такие как атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно-связанной плазмой или комплексонометрическое титрование. Спектроскопические подходы используют характеристики поглощения или излучения ионов щелочных металлов (I группы) и щелочноземельных металлов (II группы) при диссоциации из-за термической энергии, обеспечиваемой источником пламени. ICP-MS является типом масс-спектрометрии, который может детектировать металлы при очень низких концентрациях. Это достигается ионизацией образца индуктивно-связанной плазмой, а затем использованием масс-спектрометра для разделения и количественного определения данных ионов. Некоторые из этих способов используются в примерах.

Комплексонометрическое титрование является другим способом детектирования концентрации катионов двухвалентных металлов. В данном способе применяют комплексообразование EDTA (этилендиаминтетрауксусной кислоты) с ионами кальция и магния для конкурирования с цветным индикатором. Это обеспечивает быстрое колориметрическое количественное определение. EDTA образует комплекс с ионами кальция и магния. Синий краситель, называемый эриохром черный Т (ErioT), используют в качестве индикатора. Этот синий краситель также образует комплекс с ионами кальция и магния, изменяя цвет с синего на розовый в процессе. Комплекс красителя и иона металла менее стабилен, чем комплекс EDTA и иона металла. Для титрования раствор образца, содержащего ионы кальция и магния, вводят в реакцию с избытком EDTA. Добавляют индикатор и он остается синим, до тех пор пока все присутствующие ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} не превращаются в комплекс с EDTA.

Обратное титрование проводят с помощью раствора хлорида магния. Это обеспечивает комплекс с избытком молекул EDTA до конечной точки, когда весь избыток EDTA превращается в комплекс. Оставшиеся ионы магния из раствора хлорида магния затем начинают образовывать комплекс с индикатором ErioT, сразу меняя его цвет с синего на розовый.

Способы синтеза.

Настоящее изобретение предусматривает способы получения растворов фосфолипидов и суспензий фосфолипидов, предназначенных для использования с газообразным перфторуглеродом с образованием состава UCA, содержащего фосфолипидные микросферы с инкапсулированным газом. В предпочтительных вариантах осуществления фосфолипиды представляют собой DPPA, DPPC и DPPE, такой как MPEG5000-DPPE.

Раствор фосфолипидов можно получать рядом способов, описанных ниже. Эти способы в широком смысле описывают как способы однородного смешивания и неоднородного смешивания. Исходные формы могут находиться в твердой (например, порошкообразной) форме или в жидкой форме.

Способы однородного смешивания.

Способы однородного смешивания относятся к способам, при которых фосфолипиды тщательно смешивают друг с другом для получения твердой однородной смеси фосфолипидов, которая более однородна (и, таким образом, более гомогенна) относительно содержания фосфолипидов в ней и распределения фосфолипидов в ней и в некоторых случаях имеет более высокую чистоту по сравнению с простыми смесями фосфолипидов.

В данном способе образуют гомогенную дисперсию трех фосфолипидов путем растворения или суспендирования их в соответствующей системе растворителей для однородной смеси, а затем отделяют равномерно распределенные фосфолипиды от растворителя. Отделение растворителя для однородной смеси от фосфолипидов может включать высушивание, лиофилизацию, дистилляцию и подобное или оно может включать осаждение с применением дополнительного растворителя для однородной смеси. Растворители для однородной смеси для нейтральных липидов представляют собой относительно неполярные растворители, такие как диэтиловый эфир или хлороформ. Более полярные растворители для однородной смеси, такие как спирт (например, метанол и этанол), требуются для мембраносвязанных липидов, которые сами являются более полярными. Хлороформ можно также использовать, в частности для липидов промежуточной полярности. При смешивании с метанолом хлороформ становится общим растворителем. Дихлорметан (или метилендихлорид) является аналогичным экстрагирующим веществом, но менее окисляемым. Гексан можно использовать для липидов с низкой полярностью. Его можно использовать для экстракции нейтральных липидов из смесей воды/спирта. Петролейный эфир представляет собой смесь различных углеводородов с 5-8 атомами углерода и может использоваться вместо гексана в некоторых случаях. Другие растворители для однородной смеси включают, без ограничения, циклогексан и толуол.

Как будет описано более подробно в данном документе, некоторые однородные смеси образуют путем приведения в контакт одного или нескольких необходимых фосфолипидов (например, DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE) в системе растворителей для однородной смеси, чтобы сначала растворить данные фосфолипиды, затем необязательно концентрирования данного раствора, затем либо удаления растворителя для однородной смеси, либо осаждения однородной смеси фосфолипидов из данного растворителя. Растворитель для однородной смеси не следует путать с неводным растворителем, который затем используют для растворения фосфолипидов, за счет чего обеспечивается получение раствора фосфолипидов. Должно быть ясно, что это осаждение является желаемым явлением и его не следует путать с нежелательным осаждением фосфолипидов, которое может происходить на более поздней стадии образования раствора фосфолипидов из-за присутствия кальция, другого двухвалентного катиона или комбинации двухвалентных катионов.

Некоторые способы получения растворов фосфолипидов предусматривают приведение в контакт однородной смеси фосфолипидов с неводным растворителем. Существуют различные способы получения однородных смесей фосфолипидов, включая, без ограничения, способы растворения-осаждения в органическом растворителе (или растворителе для однородной смеси, как используется в данном документе) и способы суспендирования в воде-лиофилизации.

Способ растворения-осаждения в органическом растворителе описан подробно в патенте США № 8084056 и в опубликованной международной заявке № WO 99/36104, полное содержание которых включено посредством ссылки в данный документ. Один вариант осуществления данного способа включает следующие стадии.

(a) Приведение в контакт необходимых фосфолипидов (например, DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE или DPPC и MPEG5000-DPPE) с первой системой растворителей для однородной смеси. Данная система обычно представляет собой комбинацию растворителей, например $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ и толуол/MeOH. Целесообразным может быть нагревание полученного в результате раствора до температуры, достаточной для достижения полного растворения. Данная температура предпочтительно составляет приблизительно 25-75°C, более предпочтительно приблизительно 35-65°C. После растворения нерастворившиеся посторонние вещества можно удалять путем горячего фильтрования или охлаждения до комнатной температуры, а затем фильтрования.

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

(b) Раствор затем концентрируют до густого геля/полутвердого вещества. Концентрирование пред-

почтительно проводят путем вакуумной дистилляции. Также можно применять другие способы концентрирования раствора, такие как вращательное испарение. Температура данной стадии предпочтительно составляет от приблизительно 20 до 60°C, более предпочтительно от 30 до 50°C.

(c) Густой гель/полутвердое вещество затем диспергируют во втором растворителе для однородной смеси. Смесь суспендируют предпочтительно при температуре, соответствующей приблизительно температуре окружающей среды (например, 15-30°C). Пригодные вторые растворители для однородной смеси представляют растворители, которые вызывают осаждение фосфолипидов. Вторым растворителем для однородной смеси предпочтительно представляет собой метил-трет-бутиловый эфир (МТБЕ). Можно применять и другие эфиры и спирты.

(d) Затем собирают твердые вещества, полученные при добавлении второго растворителя для однородной смеси. Предпочтительно собранные твердые вещества промывают с помощью другой части второго растворителя для однородной смеси (например, МТБЕ). Сбор можно выполнять посредством вакуумной фильтрации или центрифугирования предпочтительно при температуре окружающей среды. После сбора предпочтительно высушивать твердые вещества *in vacuo* при температуре, составляющей приблизительно 20-60°C.

Полученное в результате твердое вещество называется в данном документе однородной смесью фосфолипидов.

В определенных способах, описанных в данном документе, используют фосфолипиды в виде однородной смеси фосфолипидов, включая однородную смесь фосфолипидов, полученную согласно любому из способов однородного смешивания, указанных выше. В некоторых способах используют однородные смеси фосфолипидов, за исключением однородной смеси фосфолипидов, полученной согласно способу в метаноле/толуоле/МТБЕ, указанному выше, где смесь метанола и толуола используют в качестве первого растворителя для однородной смеси, а МТБЕ используют в качестве второго растворителя для однородной смеси. Для ясности способ, указанный выше, называется в данном документе способом получения однородной смеси фосфолипидов в метаноле/толуоле/МТБЕ.

Как используется в данном документе, однородную смесь фосфолипидов следует отличать от других смесей фосфолипидов, в том числе такие составы, которые получены простым объединением фосфолипидов в их твердых (включая порошкообразную) формах, как описано в данном документе.

В способах суспендирования в воде-лиофилизации фосфолипиды суспендируют в воде при повышенной температуре, а затем концентрируют с помощью лиофилизации.

Способ растворения-осаждения в органическом растворителе является предпочтительным по сравнению со способом суспендирования в воде/лиофилизации по ряду причин, изложенных в патенте США № 8084056 и опубликованной заявке согласно РСТ WO 99/36104, в том числе получение в результате равномерно распределенных твердых фосфолипидов в случае применения способа растворения в органическом растворителе.

В некоторых способах однородного смешивания, которые не являются способом получения однородной смеси фосфолипидов в метаноле/толуоле/МТБЕ, указанном выше, используют систему растворителей для однородной смеси, отличную от метанола и толуола. В этих способах фосфолипиды объединяют в условиях отсутствия метанола и толуола (также называемых условие отсутствия метанола и толуола) с образованием однородной смеси фосфолипидов. Таким образом, условие отсутствия метанола и толуола относится к условию, при котором отсутствуют оба из данных растворителей.

В некоторых способах однородного смешивания фосфолипиды объединяют в растворителе для однородной смеси с образованием однородной смеси фосфолипидов, а затем выпаривают растворитель для однородной смеси полностью, например, либо высушиванием, либо дистилляцией с образованием высушенной однородной смеси фосфолипидов. Данную высушенную однородную смесь фосфолипидов затем приводят в контакт с неводным растворителем, таким как РG, в способах, представленных в данном документе.

В некоторых способах однородного смешивания фосфолипиды объединяют в водном растворителе, а затем смесь лиофилизируют с образованием лиофилизованной композиции фосфолипидов. В других способах однородного смешивания объединяют фосфолипиды с другими системами растворителей, такими как, без ограничения, (1) смесь этанола и циклогексана (например, 1:1, об.:об.) и (2) третичный бутанол (трет-бутанол или 1,1-диметилэтанол), вместо воды. После растворения в данных различных растворителях композиции лиофилизируют. Лиофилизацию можно проводить замораживанием на бане из изопропанола/CO₂ или бане из ацетона/CO₂ и высушиванием на лиофилизаторе Virtis до тех пор, пока продукт не станет сухим и хлопьеобразным.

Различные способы однородного смешивания, которые не являются способом получения однородной смеси фосфолипидов в метаноле/толуоле/МТБЕ, указанным выше, описаны в опубликованной EP 0923383 (WO 1997/040858), полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

В некоторых способах однородного смешивания, которые не являются способом получения однородной смеси фосфолипидов в метаноле/толуоле/МТБЕ, указанным выше, фосфолипиды объединяют в растворителе для однородной смеси, который может представлять собой смесь толуола и метанола, с

образованием однородной смеси фосфолипидов, а затем осаждают данную однородную смесь фосфолипидов в отсутствие МТВЕ. В данных способах осаждение происходит в условиях отсутствия МТВЕ.

В других способах однородного смешивания DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE (или DPPC и MPEG5000-DPPE) можно объединять в их сухих, твердых формах и такую комбинацию можно затем активно и тщательно смешивать в сухой форме (например, вручную перемешивать порошки или с помощью смесителя, такого как барабанный смеситель для силоса, вращающийся шнековый смеситель, смеситель ленточного типа, экструдер, Cyclomix, смеситель Henschel, смеситель типа Lodige, смеситель типа Eirich или другой тип устройства, разработанного для перемешивания фармацевтических порошков, с целью получения однородной смеси фосфолипидов (например, однородной дисперсии фосфолипидов в смеси). Можно сделать ссылку на Deveswaran et al. Research J. Pharm. and Tech.2 (2): April.-June. 2009) для дополнительных методологий получения однородного сухого продукта.

Способы неоднородного смешивания.

В отличие от способов однородного смешивания определенные способы неоднородного смешивания включают простое перемешивание твердых фосфолипидов, и это, как правило, обеспечивает в результате менее однородную (и, таким образом, менее гомогенную диспергированную или более гетерогенно диспергированную) смесь. Данные последние смеси называют в данном документе смесями фосфолипидов (или неоднородно смешанными смесями фосфолипидов), чтобы отличить их от однородных смесей фосфолипидов.

Некоторые способы получения растворов фосфолипидов предусматривают простое приведение в контакт фосфолипидов в их твердой форме с неводным растворителем. Фосфолипиды можно приводить в контакт с неводным растворителем одновременно или последовательно. Если последовательно, можно использовать любой порядок добавления. Фосфолипиды можно добавлять по отдельности в неводный растворитель или их можно сначала объединить вместе, в любой комбинации, а затем добавить в неводный растворитель. Таким образом, рассматривается, что фосфолипиды можно добавлять в неводный растворитель по отдельности и одновременно, по отдельности и последовательно, объединенными и одновременно и частично объединенными и последовательно. Пример последнего является случаем, где два фосфолипида объединяют вместе в твердой форме, а затем приводят в контакт с неводным растворителем перед приведением в контакт или после него оставшегося фосфолипида с неводным растворителем.

Таким образом, в качестве примера фосфолипиды DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE (или DPPC и MPEG5000-DPPE) можно добавлять по отдельности в неводный растворитель. Такое добавление по отдельности может быть последовательным или одновременным добавлением. Если добавление последовательное, порядок добавления может представлять собой любой порядок, хотя в некоторых случаях DPPA можно добавлять вторым или последним, поскольку он является наименее распространенным и менее растворимым и присутствие одного из других фосфолипидов может облегчать его растворение. В некоторых случаях, независимо от того, обеспечиваются ли фосфолипиды по отдельности, или в виде простой смеси, или в виде однородной смеси фосфолипидов, их затем растворяют в неводном растворителе, содержащем PG или смесь PG/G, как описано выше, с образованием раствора фосфолипидов. Раствор фосфолипидов можно объединять с газом или его можно объединять с водным растворителем с образованием суспензии фосфолипидов, которую, в свою очередь, приводят в контакт с газом.

В других случаях однородную смесь фосфолипидов можно получать объединением фосфолипидов, например, в воде, или в смеси этанола и циклогексана (например, 1:1, об.:об.), или в третичном бутаноле (трет-бутаноле или 1,1-диметилэтанол), и такую смесь затем лиофилизируют, а высушенный продукт повторно суспендируют в водном растворителе. В этих случаях конечный повторно суспендированный продукт можно объединять с газом, таким как перфлутрен. В настоящем изобретении предполагается, что любой или все компоненты, используемые в данном получении, можно анализировать в отношении их концентрации катионов двухвалентных металлов, и такую отдельную или объединенную концентрацию катионов двухвалентных металлов можно количественно определять и использовать для выбора и/или получения USA.

Способы получения контрастного средства для ультразвукового исследования, включая активацию.

Фосфолипидные микросферы с инкапсулированным газом образуют посредством объединения и энергичного встряхивания раствора фосфолипидов или суспензий фосфолипидов с газом, таким как газообразный перфторуглерод. Этот процесс называется в данном документе активацией. Состав USA, образованный таким образом, как минимум содержит фосфолипиды, неводный растворитель, такой как PG, и газ, и, таким образом, активация как минимум обеспечивает в результате заполненные газом фосфолипидные микросферы. Фосфолипиды могут присутствовать в водном растворе, как в случае с DEFINITY®, или они могут присутствовать в неводном растворе, как в случае новых составов USA, в том числе, например, DEFINITY-II, описанных более подробно в данном документе. Таким образом, в некоторых случаях активация предусматривает встряхивание водной суспензии фосфолипидов в присутствии газа, такого как газообразный перфторуглерод (например, перфлутрен). В других случаях активация предусматривает встряхивание раствора фосфолипидов в присутствии газа, газообразного перфторуглерода (например, перфлутрена). Следует понимать, что перфлутрен, газообразный перфлутрен и октафторпропан используются взаимозаменяемо в данном документе.

Встряхивание, как используется в данном документе, относится к движению, посредством которого взбалтывается раствор, будь то водный или неводный, так что газ включается из локальной внешней среды контейнера (например, флакона) в раствор. Любой тип движения, посредством которого взбалтывается раствор и обеспечивается включение газа, можно использовать для встряхивания. Встряхивание должно осуществляться с достаточной силой или интенсивностью, чтобы обеспечить образование пены по истечении некоторого периода времени. Предпочтительно встряхивание осуществляется с достаточной силой или интенсивностью, так что пена образуется в течение короткого периода времени, предусмотренного для конкретного состава UCA. Таким образом, в некоторых случаях такое встряхивание осуществляется в течение приблизительно 30 с, или в течение приблизительно 45 с, или в течение приблизительно 60 с, или в течение приблизительно 75 с, или в течение приблизительно 90 с, или в течение приблизительно 120 с, в том числе, например, в течение 30 с, или в течение 45 с, или в течение 60 с, или в течение 75 с, или в течение 90 с, или в течение 120 с. В некоторых случаях активация может осуществляться в течение периода времени, находящегося в диапазоне 60-120 с или в диапазоне 90-120 с.

В настоящем изобретении предполагается, что в некоторых случаях время (или продолжительность) встряхивания будет изменяться в зависимости от типа состава UCA, подлежащего активации. Например, в некоторых случаях водный состав UCA может встряхиваться в течение более коротких периодов времени, чем неводный состав UCA. В настоящем изобретении предполагается, что в таких случаях интенсивность встряхивания (или скорость встряхивания, так как эти термины используются взаимозаменяемо в данном документе) может быть постоянной. Таким образом, в приспособлении для активации или встряхивания, таком как устройство для активации или встряхивающее устройство, можно устанавливать параметры для выполнения встряхивания с одной интенсивностью (определенной как, например, число встряхивающих движений в минуту) в течение двух или более различных предварительно определенных периодов времени.

В настоящем изобретении дополнительно предполагается, что в некоторых случаях интенсивность встряхивания будет изменяться в зависимости от типа состава UCA, подлежащего активации. Например, в некоторых случаях (водную) суспензию фосфолипидов можно встряхивать при более низкой интенсивности встряхивания, чем (неводный) раствор фосфолипидов. В настоящем изобретении предполагается, что в таких случаях время встряхивания (или продолжительность, так как эти термины используются взаимозаменяемо в данном документе) может быть постоянным.

DEFINITY® можно активировать с помощью VIALMIX®, как описано ниже. Активация DEFINITY®, которая включает энергичное встряхивание (водной) суспензии фосфолипидов в присутствии перфлутрена, длится приблизительно 45 с с помощью VIALMIX®. Если не указано иное, под термином "приблизительно" в отношении времени активации подразумевается время, которое составляет $\pm 20\%$ от указанного времени (т.е. 45 ± 9 с).

DEFINITY-II можно также активировать с помощью VIALMIX®. Активация DEFINITY-II, которая включает энергичное встряхивание (неводного) раствора фосфолипидов в присутствии перфлутрена, длится приблизительно 60-120 с. В некоторых случаях DEFINITY-II активируют в течение приблизительно 75 с (т.е. 75 ± 15 с). DEFINITY-II можно активировать в течение более длительных периодов времени, в том числе 90-120 с.

Встряхивание может осуществляться с помощью вихревого движения (как, например, путем вихревого перемешивания), движения из стороны в сторону или движения вверх-вниз. Кроме того, различные типы движения могут быть комбинированы. Встряхивание можно осуществлять путем встряхивания контейнера (например, флакона), вмещающего водный или неводный раствор фосфолипидов, или путем встряхивания водного или неводного раствора в контейнере (например, флаконе) без встряхивания самого контейнера (например, флакона). Встряхивание выполняют с помощью прибора с целью стандартизации процесса. Механические встряхиватели известны из уровня техники, и их механизмы или приспособления встряхивания могут применяться в устройствах по настоящему изобретению. Примеры включают амальгаматоры, такие как используемые для стоматологических применений. Интенсивное встряхивание предусматривает по меньшей мере 1000, по меньшей мере 2000, по меньшей мере 3000, по меньшей мере 4000, по меньшей мере 4500, по меньшей мере 5000 или более встряхивающих движений в минуту. В некоторых случаях интенсивное встряхивание предусматривает встряхивание в диапазоне 4000-4800 встряхивающих движений в минуту. VIALMIX® например, целевое встряхивание осуществляется при 4530 оборотов "в виде восьмерки" в минуту, и при этом допускаются значения интенсивности встряхивания, находящиеся в диапазоне 4077-4756 об/мин. Вихревое перемешивание предусматривает по меньшей мере 250, по меньшей мере 500, по меньшей мере 750, по меньшей мере 1000 об/мин или более. Вихревое перемешивание с интенсивностью, составляющей по меньшей мере 1000 об/мин, является примером интенсивного встряхивания и является более предпочтительным в некоторых случаях. Вихревое перемешивание при 1800 об/мин является наиболее предпочтительным.

Интенсивность встряхивания может влиять на необходимую продолжительность встряхивания. Более высокая интенсивность встряхивания, как правило, будет уменьшать продолжительность времени встряхивания, необходимую для достижения оптимального образования микропузырьков. Например,

встряхивание при 4530 об/мин продолжительностью 45 с будет достигаться за 3398 полных оборотов на VIALMIX®. Для встряхивания при 3000 об/мин будет требоваться 68 с, чтобы достичь такого же числа оборотов. На требуемые продолжительность и скорость встряхивания также будут влиять форма траектории движения и амплитуда встряхивания. Скорость, которую достигает жидкость в контейнере, и силы, прилагаемые при изменении направления, будут влиять на включение газа. На эти аспекты будут влиять длина рычага встряхивателя и траектория его движения, форма и размер контейнера, объем заполнения и вязкость состава. Вода характеризуется вязкостью, составляющей приблизительно 1,14 сП при 15°C. (Khattab, I.S. et al., Density, viscosity, surface tension, and molar volume of propylene glycol + water mixtures from 293 to 323 K and correlations by the Jouyban-Acree model, *Arabian Journal of Chemistry* (2012)). В отличие от этого, пропиленгликоль характеризуется вязкостью, составляющей 42 сП при 25°C (Khattab, I.S. et al., Density, viscosity, surface tension, and molar volume of propylene glycol + water mixtures from 293 to 323 K and correlations by the Jouyban-Acree model, *Arabian Journal of Chemistry* (2012)), а глицерин характеризуется вязкостью, составляющей 2200 сП при 15°C (Secut J.B., Oberstak H.E. Viscosity of Glycerol and Its Aqueous Solutions. *Industrial and Engineering Chemistry*, 43. 9, 2117-2120, 1951). DEFINITY-II характеризуется высокой вязкостью, составляющей 1150 сП при 15°C. Поскольку DEFINITY® преимущественно состоит из воды, он характеризуется намного более низкой вязкостью, чем DEFINITY-II.

Образование заполненных газом микросфер при активации можно обнаружить по наличию пены сверху водного или неводного раствора и по приобретению раствором белого цвета.

Активацию выполняют при температуре ниже температуры фазового перехода гелеобразного состояния в жидкокристаллическое состояние используемого фосфолипида. Под "температурой фазового перехода гелеобразного состояния в жидкокристаллическое состояние" понимают температуру, при которой фосфолипидный слой (такой как липидный монослой или бислой) будет превращаться из гелеобразного состояния в жидкокристаллическое состояние. Данный переход описан, например, в Charman et al., *J. Biol. Chem.* 1974, 249, 2512-2521. Значения температуры фазового перехода гелеобразного состояния в жидкокристаллическое состояние различных фосфолипидов будут абсолютно очевидны специалистам в данной области техники, и они описаны, например, в Gregoriadis, ed., *Liposome Technology*, Vol. I, 1-18 (CRC Press, 1984) и Derek Marsh, *CRC Handbook of Lipid Bilayers* (CRC Press, Boca Raton, Fla. 1990), на с. 139. Интенсивное встряхивание может вызывать нагревание состава, учитывая скорость встряхивания, продолжительность, длину рычага встряхивателя и траекторию его движения, форму и размер контейнера, объем заполнения и вязкость состава.

В свете настоящего изобретения специалисту в данной области техники будет понятно, что с фосфолипидами или фосфолипидными микросферами можно осуществлять манипуляции перед или после выполнения с ними способов, предусмотренных в данном документе. Например, после завершения встряхивания заполненные газом микросферы можно извлекать из их контейнера (например, флакона). Извлечение можно осуществлять путем вставки иглы шприца или безыгольного элемента (например, PINSYNC®) в контейнер, в том числе в пену, при необходимости, и забора предварительно определенного количества жидкости в цилиндр шприца путем оттягивания поршня, или путем добавления водной жидкости, смешивания и забора предварительно определенного количества жидкости в цилиндр шприца путем оттягивания поршня. В качестве другого примера заполненные газом микросферы можно отфильтровать с получением микросфер по существу одинакового размера. Фильтровальный блок может содержать более одного фильтра, которые могут быть непосредственно примыкающими друг к другу или не являться таковыми.

Способы применения контрастного средства для ультразвукового исследования для получения визуализации субъекта.

Также в данном документе предусмотрены способы применения фосфолипидных микросфер с инкапсулированным газом и их составов. Микросферы с газом и их составы можно применять *in vivo* в отношении субъектов-людей или субъектов, отличных от людей, или их можно применять *in vitro*. Их можно применять для диагностических или терапевтических целей или для диагностических и терапевтических целей в совокупности.

При применении в отношении субъектов-людей фосфолипидные микросферы с инкапсулированным газом и их составы можно применять непосредственно (в чистом виде) или можно дополнительно разбавлять в растворе, в том числе в фармацевтически приемлемом растворе, и вводить в виде одной или нескольких болюсных инъекций или путем непрерывной инфузии. Введение обычно представляет собой внутривенное введение. Вскоре после этого выполняют визуализацию. Применение в визуализации может быть направлено на сердце, или оно может охватывать другую область тела, которая восприимчива к ультразвуковой визуализации. Визуализация может представлять собой визуализацию одного или нескольких органов или областей тела, в том числе, без ограничения, сердца, кровеносных сосудов, сердечно-сосудистой системы, печени, почек и головы.

Субъекты согласно настоящему изобретению включают, без ограничения, людей и животных. В некоторых случаях предпочтительными являются люди. Животные включают животных-компаньонов,

таких как собаки и кошки, и сельскохозяйственных или ценных животных, таких как, без ограничения, быки и лошади.

УСА вводят в эффективных количествах. Эффективное количество будет представлять собой такое количество, которое облегчает или обуславливает предполагаемые ответ и/или применение *in vivo*. В контексте применения в визуализации, такого как применение при ультразвуковом исследовании, эффективное количество может представлять собой такое количество фосфолипидных микросфер с инкапсулированным газом, которое обеспечивает возможность визуализации субъекта или области организма субъекта.

Примеры

1. Примеры способов.

1.1. Фосфолипиды, и однородные смеси фосфолипидов, и реагенты.

Фосфолипиды использовали либо в виде отдельных порошков, объединенных вместе в виде порошков, либо в виде смеси или однородно смешанные вместе путем растворения и высушивания (подробная информация описана ниже). Измеренное содержание отдельных фосфолипидов использовали для оценки конечных концентраций кальция или магния в неводном концентрате или водном препарате, если непосредственные измерения в смеси не делали. Во всех исследованиях использовали растворители с низким содержанием кальция.

1.1.1. Однородная смесь фосфолипидов.

Одну однородную смесь фосфолипидов (LB) получали посредством растворения DPPC, DPPA, MPEG5000-DPPE (0,401:0,045:0,304 [вес.:вес.:вес.]) в толуоле/метаноле, концентрировали под вакуумом и нагреванием, а затем суспендировали посредством добавления метил-трет-бутилового эфира (MTBE). Твердый материал собирали, промывали с помощью MTBE и высушивали (в соответствии с патентом US № 8084056). В качестве альтернативы DPPC, DPPA и MPEG5000-DPPE (0,401:0,045:0,304 [вес.:вес.:вес.]) солюбилизировали при 55°C в метаноле. Метанол затем выпаривали и твердые вещества извлекали как однородную смесь фосфолипидов. Аналогично, DPPC, DPPA и MPEG5000-DPPE (0,401:0,045:0,304 [вес.:вес.:вес.]) объединяли вместе в виде твердых порошков и порошки смешивали вместе с помощью шпателя.

1.1.1.1. Способ определения остаточного растворителя для однородной смеси фосфолипидов.

Остаточный растворитель в однородной смеси фосфолипидов определяли с помощью FID, используя GC в свободном пространстве над продуктом. Образец взвешивали, переносили в отдельные 20 см³ флаконы со свободным пространством над продуктом и растворяли в N-метилпирролидоне. Ряд стандартов для остаточного растворителя получали в N-метилпирролидоне. Стандарты и образцы анализировали с помощью FID, используя GC в свободном пространстве над продуктом. Концентрацию каждого остаточного растворителя рассчитывали из калибровочной кривой для данного растворителя.

1.1.2. Измерения кальция.

Уровни кальция определяли в отдельном липиде, однородной смеси липидов, глицерине и пропиленгликоле с применением или ICP-MS, или AA. Магний и другие ионы металлов также измеряли с помощью данных способов в некоторых образцах

1.1.1.2. Способ ICP-MS (масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой).

Образцы получали посредством взвешивания в предварительно очищенной кварцевой емкости для расщепления. Добавляли известные добавки, а затем смешивали с азотной кислотой и хлористоводородной кислотой. Образцы расщепляли в микроволновой системе закрытого типа для расщепления образцов. После охлаждения добавляли раствор внутреннего стандарта и разбавляли и анализировали с помощью ICP-MS, используя режим столкновения с He.

1.1.1.3. Способ AA (атомно-абсорбционная спектроскопия).

Образцы получали посредством взвешивания в сухой "очищенной от следов металлов" емкости для расщепления и растворяли в азотной кислоте и хлористоводородной кислоте и нагревали с обратным холодильником с H₂O₂. Раствор образца промывали водой и фильтровали. Для калибрования AA использовали ряд стандартов, а затем поглощение образцов считывали с калибровочной кривой. Результаты для отдельного липида, однородной смеси фосфолипидов и составов растворителей представлены в табл. 1.

Таблица 1

Уровень Ca⁺² и Mg⁺² в отдельном липиде,
однородной смеси липидов и растворителе^a

Материалы	Ca ⁺² (ppm) ^b	Mg ⁺² (ppm) ^b
Однородная смесь фосфолипидов, партия 1 ^c	Не обнаружено	Не обнаружено
Однородная смесь фосфолипидов, партия 2 ^{c,d}	370	54

MPEG5000-DPPE (высокая концентрация Ca ⁺²) партия 1	980	150
MPEG5000-DPPE (высокая концентрация Ca ⁺²) партия 2	520	110
MPEG5000-DPPE (низкая концентрация Ca ⁺²)	4	Не определено
DPPC, партия 1	Не обнаружено	Не обнаружено
DPPC, партия 2	7	Не определено
DPPA	19	Не определено
Пропиленгликоль	Не обнаружено	Не определено
Глицерин	0,7	Не определено

^a Определение с помощью ICP-MS.

^b ppm = части на миллион, и эквивалентны мкг/г.

^c Однородная смесь фосфолипидов состоит из DPPC, DPPA и MPEG5000-DPPE (0,401:0,045:0,304 [вес.:вес.:вес.]).

^d Однородная смесь липидов, партия 2, полученная с применением MPEG5000-DPPE (высокая концентрация Ca⁺²), партия 1.

1.2. Получение водного состава.

1.2.1. Неводный концентрат фосфолипидов.

Концентраты фосфолипидов получали посредством добавления отдельных липидов (DPPC, DPPA и MPEG5000-DPPE с низким содержанием Ca⁺², или MPEG5000-DPPE с высоким содержанием Ca⁺², или комбинации) в любом порядке, добавления однородной смеси фосфолипидов (LB) или добавления LB, содержащей высокие уровни Ca⁺², в 25-115 мл носителя, представляющей собой пропиленгликоль (PG), или 1:1 об./об. пропиленгликоля/глицерина (PG/G), или глицерин, с постоянным перемешиванием при 55-70°C. В некоторых случаях концентрат липидов получали без DPPA или с добавлением ацетата кальция перед добавлением липидов.

1.2.2. Водный состав.

Водные составы получали посредством добавления двухосновного фосфата натрия, гептагидрата; одноосновного фосфата натрия, моногидрата; хлорида натрия; пропиленгликоля; глицерина и, наконец, неводного концентрата фосфолипидов в 400-500 мл воды при постоянном перемешивании при 55-70°C. В некоторых случаях ацетат кальция добавляли перед или после добавления неводного концентрата фосфолипидов в основной раствор смеси. В других случаях фосфатный буфер не включали.

1.3. Получение неводного состава.

1.3.1. Неводный состав.

Липиды по отдельности (DPPC, DPPA и MPEG5000-DPPE с низким содержанием Ca⁺², или MPEG5000-DPPE с высоким содержанием Ca⁺², или их комбинации) в любом порядке, LB или LB, содержащую высокие уровни Ca⁺², добавляли в 25-100 мл носителя, представляющего собой пропиленгликоль (PG), содержащий 0,005 М ацетатный буфер (90/10, ацетат натрия/ледяная уксусная кислота) при постоянном перемешивании при 60±5°C. После растворения глицерин затем добавляли для получения неводного состава.

1.4. Добавления кальция и/или магния с применением исходных растворов.

1.4.1. Изначальные исследования.

Исходные растворы ацетата кальция, ацетата магния отдельно и смеси их обоих получали в пропиленгликоле (25,4 мкг Ca⁺²/г, 28,0 мкг Mg⁺²/г и 14,0 мкг Ca⁺²/г с 12,7 мкг Mg⁺²/г соответственно). Отдельные исходные растворы добавляли в аликвотах до общего объема 1 мл в 33 мл содержащей пропиленгликоль однородной смеси липидов (15 мг/мл). Растворы сравнивали с пропиленгликолем отдельно и раствор, показывающий мутность первым, записывали.

1.4.2. Дополнительное исследование с эталонной шкалой.

Исходные растворы ацетата кальция, моногидрата получали в пропиленгликоле (299 Ca⁺² мкг/г), пропиленгликоле и глицерине (299 Ca⁺² мкг/г) или воде (6085 Ca⁺² мкг/г), и носитель совпадал при добавлении в пропиленгликоль, неводный концентрат фосфолипидов или водный состав (перед добавлением неводного концентрата фосфолипидов или после него). Максимальное количество добавленного исходного раствора кальция составляло <12% всего объема.

Некоторые неводные концентраты фосфолипидов титровали с ацетатом кальция. Внешний вид оценивали по шкале 0, +, ++, +++ посредством визуального осмотра. На фиг. 1 представлена шкала, используемая для определений, и ее получали с применением липидов с низким содержанием Ca⁺² (DPPC, DPPA и MPEG5000-DPPE; 0,401:0,045:0,304 [вес.:вес.:вес.]), составленными в пропиленгликоле при 15 мг общего количества липидов/мл.

1.5. Фильтрация.

1.5.1. Водный состав.

Полученные образцы водных суспензий фосфолипидов выдерживали при 55°C перед фильтрацией. Образцы помещали в 60 мл шприц с регулируемой температурой, составляющей 55°C, с присоединенным 13 мм шприцевым фильтром с 0,22 мкм мембраной из гидрофильного поливинилиденфторида (PVDF). К шприцу прикладывали давление над продуктом с помощью азота, составляющее 5 фунтов/кв. дюйм. Расход определяли посредством взвешивания отфильтрованного раствора с течением времени со считываниями каждые 30 с. Значения расхода в каждый момент времени рассчитывали и средний расход на 9-10 мин сравнивали с исходным расходом (0-1 мин) и выражали в процентах. Образец перед фильтрацией собирали вместе с образцами во время фильтрации для анализа концентрации фосфолипидов.

1.5.2. Неводный состав.

Полученные образцы неводных растворов фосфолипидов выдерживали при 60°C перед фильтрацией. Образцы помещали в 60 мл шприц с регулируемой температурой, составляющей 60°C, с присоединенным 25 мм шприцевым фильтром с 0,2 мкм мембраной из гидрофильного полиэфирсульфона (PES). К шприцу прикладывали давление над продуктом с помощью азота, составляющее 10 фунтов/кв. дюйм. Расход определяли посредством взвешивания отфильтрованного раствора с течением времени со считываниями каждые 30 с. Значения расхода в каждый момент времени рассчитывали и средний расход на 8-9 мин сравнивали с исходным расходом (0-1 мин) и выражали в процентах. Значения расхода в прозрачных растворах, как видно, увеличивались со временем по мере нагревания фильтра. Образцы собирали, как указано выше.

1.6. Анализ фосфолипидов.

В некоторых случаях образцы анализировали в отношении содержания фосфолипидов. Образец переносили во флакон для HPLC и анализировали посредством разделения с помощью обращенно-фазовой HPLC и детектора заряженных аэрозолей 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) и количественно определяли относительно эталонных стандартов.

1.7. Получение и тестирование продукта.

1.7.1. Водный состав.

Отбирали аликвоту (1,76 мл) отфильтрованного водного состава (см. раздел 1.5.1) в 2 см³ флаконы Wheaton, в свободном пространстве над продуктом воздух заменяли на газообразный перфторпропан (PFP), флакон герметизировали серой бутил-каучуковой пробкой West и обжимали алюминиевым колпачком.

1.7.2. Неводный состав.

Отбирали аликвоту (0,35 мл) отфильтрованного водного состава (см. раздел 1.5.2) в 2 см³ флаконы Wheaton, в свободном пространстве над продуктом воздух заменяли на газообразный перфторпропан (PFP), флакон герметизировали серой бутил-каучуковой пробкой West и обжимали алюминиевым колпачком.

1.7.3. Определение размера микросфер с помощью Sysmex.

Образцы анализировали в отношении количественного распределения и распределение по размерам с помощью измерителя частиц (Malvern FPIA-3000 Sysmex). Водные или неводные образцы оптимально активировали с помощью VIALMIX®, часть активированного продукта разводили солевым раствором и затем переносили в емкость для образцов Sysmex. В Sysmex используется подходящая оболочка и анализируется образец с применением поля зрения под малым и большим увеличением с получением данных о размере для определенного диапазона размеров (1-80 мкм в текущих исследованиях).

1.7.4. Ультразвуковое контрастирование с помощью активированного продукта.

Акустическое затухание измеряли для выбранных образцов с применением клинической системы для визуализации посредством ультразвукового исследования Philips Sonos 5500. После оптимальной активации с помощью VIALMIX® образцы объемом 10 мкл отбирали пипеткой в 250 мл химический стакан, содержащий 200 мл 0,9% солевого раствора при комнатной температуре. Круглая, лопастная магнитная мешалка диаметром 38 мм поддерживала однородность раствора и служила в качестве звукоотражателя. Клинический преобразователь ультразвуковой системы s3 размещали сверху химического стакана, сразу в растворе и на 4,8 см выше верхней границы магнитной мешалки. 5 секунд 120 Гц изображений затем получали в цифровом виде и записывали на диск начиная через 10 с после введения образца.

УЗ-систему использовали в режиме IBS, TGC фиксировали на минимальном значении для всех глубин и LGC отключали. Механический индекс (MI) составлял 0,2 с установкой мощности на 18 дБ ниже максимума. Коэффициент усиления приема фиксировали на 90 и сжатие на 0. Для каждого тестируемого образца УЗ-данные получали перед (холостой) и после введения образца.

Анализ изображений проводили с применением Philips QLab версии 2.0, с помощью которого счи-

тывали файлы, полученные УЗ-системой, и рассчитывали значения в дБ для режима IBS. Представляющие интерес области наносили на магнитную мешалку и значения в дБ экспортировали в Excel. Их затем усредняли по полных 5 с (приблизительно 360 видеокдра) наблюдения. Измерения затухания получали вычитанием среднего значения ROI образца из среднего значения ROI холостой пробы (оба в дБ). Полученное делили на удвоенное расстояние между УЗ-преобразователем и верхней границей магнитной мешалки для получения затухания в дБ/см. Значения затем делили на рассчитанную концентрацию микропузырьков в химическом стакане и выражали в дБ затухания на сантиметр на миллион микропузырьков/мл.

Пример 1. Влияние добавления кальция в неводный раствор фосфолипидов.

Этот пример показывает влияние ионов кальция и магния на осаждение фосфолипидов.

Пример 1.1. Изначальные исследования касательно влияния добавления кальция и магния в неводный раствор.

В изначальных исследованиях однородную смесь липидов (LB, партия 1), характеризующуюся низкой концентрацией ионов двухвалентных металлов (табл. 1 в примерах способа), добавляли в пропиленгликоль при $55\pm 5^\circ\text{C}$ и перемешивали. Проверяли визуальным осмотром, что фосфолипиды полностью растворялись, и полученный в результате раствор был прозрачным. Этот раствор LB титровали кальцием (25,4 мкг $\text{Ca}^{+2}/\text{г}$), магнием (28,0 мкг $\text{Mg}^{+2}/\text{г}$) или комбинацией (1:1 с получения раствора, содержащего 14,0 мкг $\text{Ca}^{+2}/\text{г}$ и 12,7 мкг $\text{Mg}^{+2}/\text{г}$), и он проявлял мутность при 3,60 мкг $\text{Ca}^{+2}/\text{г}$, 4,23 мкг $\text{Mg}^{+2}/\text{г}$ и 2,35 мкг/г объединенных ионов металлов/г неводного раствора фосфолипидов соответственно.

Пример 1.2. Дополнительные исследования касательно влияния добавления кальция в неводный раствор.

Эксперимент проводили следующим образом. Порошок DPPC, DPPA и MPEG5000-DPPE, характеризующийся низкой концентрацией ионов двухвалентных металлов (табл. 1 в примерах способа), добавляли либо отдельно (в последовательности, показанной в табл. 2), либо в виде смеси или однородной смеси, добавленной в нагретый ($55\pm 5^\circ\text{C}$) и перемешанный пропиленгликоль (PG) или смесь 1:1 пропиленгликоля и глицерина (PG/G). Проверяли визуальным осмотром, что фосфолипиды полностью растворялись, и полученный в результате раствор был прозрачным (=0, см. примеры способа, раздел 1.4.2, фиг. 1 для шкалы оценки). На фиг. 2 показан внешний вид концентрата липидов в пропиленгликоле при последовательных добавлениях исходного раствора с DPPC, MPEG5000-DPPE, DPPA и ацетатом кальция (1 мл 299 мкг Ca^{+2} на 1 мл исходного раствора добавляли с получением концентрата липидов с 11,1 мкг Ca^{+2} на 1 г раствора). Концентрат липидов не становился мутным до тех пор, пока не добавляли кальций.

Растворы фосфолипидов в PG или в смеси 1:1 PG/G титровали сериями небольших добавок кальция. После каждого добавления раствор оценивали на прозрачность (см. пример способов, раздел 1.4.2, фиг. 1 для оценочной шкалы), и самая низкая концентрация кальция, дающая показатель +, ++ и +++ показана в табл. 2. На фиг. 3 показаны типичные растворы для титрования в исследовании 4.

Таблица 2

Влияние добавления кальция в неводный раствор фосфолипидов

Исследования	Порядок добавления липидов			Неводный растворитель	Наблюдаемая пороговые значения для мутности (мкг $\text{Ca}^{+2}/\text{г}$) для титрования кальцием ^{a,b}		
	DPP C	MPEG5000 -DPPE	DPP A		+	++	+++
1 ^c	1	3	2	PG	1,5	2,6	>5,7
2 ^c	2	3	1	PG	1,5	2,9	>11,1
3 ^c	3	1	2	PG	2,3	4,6	11,1
4 ^c	1	2	3	PG	1,8	2,9	>5,7
5 ^d	Однородная смесь фосфолипидов			PG	1,8	5,7	11,1
6 ^e	Смесь фосфолипидов (сухая)			PG	1,8	5,7	11,1
7 ^f	1	3	2	PG и G	Липиды не растворились		
8 ^g	1	3	2	PG и G	2,6	19,2	35,8

^a Определен в разделе 1.4 способов.

^b Титровали исходными растворами ацетата кальция (исходный раствор с 299 мкг $\text{Ca}^{+2}/\text{г}$).

^c Конечную концентрацию DPPA (0,9 мг/мл), DPPC (8,02 мг/мл) и MPEG5000-DPPE (6,08 мг/мл) обеспечивали добавлением фосфолипидов по отдельности в пропиленгликоль (25 мл).

^d Однородную смесь фосфолипидов (15 мг/мл), полученную с применением метанола для растворения фосфолипидов при 55°C с последующим высушиванием, растворяли в 25 мл пропиленгликоля.

^e Смесь фосфолипидов: порошки DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE

(0,045:0,401:0,304) перемешивали вместе и использовали для составления в 25 мл пропиленгликоля. Конечная концентрация составляла 15 мг/мл.

^f Раствор фосфолипидов, полученный добавлением отдельных фосфолипидов [DPPA (0,9 мг/мл), DPPC (8,02 мг/мл) и MPEG5000-DPPE (6,08 мг/мл)] в 25 мл 1:1 (об./об.) пропиленгликоля:глицерина.

^g Раствор фосфолипидов, полученный добавлением отдельных фосфолипидов [DPPA (0,225 мг/мл), DPPC (2,00 мг/мл) и MPEG5000-DPPE (1,70 мг/мл)] в 100 мл 1:1 (об./об.) пропиленгликоля: глицерина.

Титрование кальцием обеспечивало явное зависимое от концентрации осаждение в растворе фосфолипидов, независимо от того как добавляли фосфолипиды (отдельно, в виде смеси или в виде однородной смеси) в пропиленгликоль (см. табл. 2). Липиды не были растворимыми ни в только глицерине, ни в 25 мл 1:1 PG/G, но давали прозрачный раствор при добавлении в 100 мл 1:1 PG/G (исследование 8). Кальций обеспечивал зависимое от концентрации осаждение в данном растворе липидов, что соответствует исходным результатам (см. табл. 2). В общем, эти исследования с помощью титрования показали, что самые низкие концентрации кальция, магния и объединенную концентрацию, которые обеспечивают осаждение, составляли 1,5 мкг $\text{Ca}^{+2}/\text{г}$, 4,23 мкг $\text{Mg}^{+2}/\text{г}$ и 2,35 мкг объединенных ионов металлов/г неводного раствора фосфолипидов.

Пример 2. Влияние компонентов раствора фосфолипидов, содержащего кальций, при смешивании.

Пример 2.1. Кальций в PG.

Исследование 9 проводили следующим образом. Порошок DPPC, MPEG5000-DPPE и DPPA, характеризующийся низкой концентрацией кальция (см. табл. 1 в примерах способа), добавляли по отдельности (в последовательности, показанной в табл. 3) в нагретый ($55\pm 5^\circ\text{C}$) и перемешанный PG, содержащий 11 мкг/г кальция. Оценивали прозрачность (см. раздел 1.4), и раствор был прозрачным после растворения DPPC, превращался и оставался мутным после добавления DPPA и оставался мутным после добавления MPEG5000-DPPE. Наблюдаемую мутность оценивали как +++ (фиг. 1, раздел 1.4). Это отличалось от прозрачного раствора, получаемого, когда данные фосфолипиды (включая DPPA) добавляли в PG, содержащий низкую концентрацию кальция (исходный раствор для исследования 1). Это было дополнительно подчеркнуто исследованием 12, где растворяли только фосфолипиды DPPC и MPEG5000-DPPE, имеющие высокие уровни содержания Ca^{+2} , и этот раствор оставался прозрачным даже в присутствии кальция.

Пример 2.2. Кальций в однородной смеси липидов из MPEG5000-DPPE.

Исходные эксперименты проводили в отношении однородной смеси фосфолипидов (полученной с применением толуола и метанола для растворения и добавления МТВЕ для осаждения однородной смеси липидов), содержащей DPPC, DPPA и MPEG5000-DPPE или с низким (Ca^{+2} не обнаружили и 1 мкг $\text{Mg}^{+2}/\text{г}$, MPEG5000-DPPE), или высоким (980 мкг $\text{Ca}^{+2}/\text{г}$ и 150 мкг $\text{Mg}^{+2}/\text{г}$, MPEG5000-DPPE, партия 1) содержанием кальция и магния соответственно, добавляли в нагретый ($55\pm 5^\circ\text{C}$) и перемешанный пропиленгликоль. Две однородные смеси липидов смешивали с получением образцов с приблизительно 0, 1,75, 4,11 и 12,9 мкг объединенных Ca^{+2} и $\text{Mg}^{+2}/\text{г}$ неводного раствора фосфолипидов. 1,75 мкг объединенных Ca^{+2} и $\text{Mg}^{+2}/\text{г}$ неводного раствора фосфолипидов проявили мутность.

Дополнительные исследования 10 и 11 проводили следующим образом. Однородную смесь фосфолипидов (полученную с применением толуола и метанола для растворения и добавлением МТВЕ для осаждения однородной смеси фосфолипидов), содержащую DPPC, DPPA и MPEG5000-DPPE, и либо с высоким (980 ppm Ca^{+2} , 150 ppm Mg^{+2} , партия 1), либо с низким (4 ppm Ca^{+2}) содержанием кальция добавляли в нагретый ($55\pm 5^\circ\text{C}$) и перемешанный PG. Прозрачность оценивали (см. раздел 1.4) и наблюдали небольшую мутность (+; см. примеры способов в разделе 1.4) в однородной смеси фосфолипидов, содержащей высокую концентрацию кальция (измеренную как 370 ppm Ca^{+2} и 54 ppm Mg^{+2}). Это отличалось от прозрачного раствора, полученного растворением однородной смеси фосфолипидов с низким содержанием кальция (необнаружимые уровни Ca^{+2} и Mg^{+2}) (см. табл. 3).

Таблица 3

Влияние компонентов раствора фосфолипидов, содержащего кальций, при смешивании

Исследованье	Порядок добавления фосфолипидов			Неводный растворитель	Ca ⁺² (Mg ⁺²) мкг/г [источник]	Наблюдаемый уровень мутности ^a
	DPPC	MPEG5000-DPPE	DPPA			
9 ^b	1	2	3	PG	11,2 (0,0) [добавляли в PG перед добавлением липидов]	+++ ^c
12 ^d	1	2	-	PG	5,8 (0,9) [Высокая концентрация Ca ⁺² в MPEG5000-DPPE]	0 ^e
10	Однородная смесь фосфолипидов, содержащая низкую концентрацию Ca ⁺² ^f			PG	0,0 (0,0) [LB, партия 1]	0
11	Однородная смесь фосфолипидов, содержащая высокую концентрацию Ca ⁺² ^f			PG	5,36 (0,8) [LB, партия 2]	+++

^a Определен в разделе 1.4 способов.

^b Конечную концентрацию DPPA (0,9 мг/мл), DPPC (8,02 мг/мл) и MPEG5000-DPPE (6,08 мг/мл) обеспечивали посредством добавления фосфолипидов по отдельности в пропиленгликоль (25 мл).

^c Раствор был прозрачным, когда растворяли DPPC, оставался прозрачным после добавления MPEG5000-DPPE, становился мутным после добавления DPPA.

^d DPPC (8,02 мг/мл) и MPEG5000-DPPE, содержащий Ca⁺² (6,08 мг/мл; 980 ppm Ca⁺² и 150 ppm Mg⁺²); конечную концентрацию обеспечивали посредством добавления фосфолипидов по отдельности в пропиленгликоль (25 мл), DPPA не добавляли.

^e Раствор был прозрачным после добавления DPPC и MPEG5000-DPPE.

^f Однородную смесь фосфолипидов (15 мг/мл), полученную с применением толуола и метанола для растворения фосфолипидов и добавлением МТВЕ для осаждения однородной смеси фосфолипидов, растворяли в 25 мл пропиленгликоля.

Пример 2.3. Кальций из MPEG5000-DPPE, добавленного отдельно.

Исследования 13-17 проводили следующим образом. DPPA и DPPC, характеризующиеся низкой концентрацией кальция (см. табл. 1 в примерах способа), добавляли по отдельности (в последовательности, показанной в табл. 4) в нагретый (55C±5°C) и перемешанный PG. Добавляли MPEG5000-DPPE, содержащий различные пропорции материала с "низкой" и "высокой" концентрацией кальция и магния. Прозрачность оценивали (см. примеры способов в разделе 1.4, фиг. 1) и наблюдали зависимое от концентрации кальция и магния осаждение (см. табл. 4 и фиг. 4).

Таблица 4

Кальций и магний из MPEG5000-DPPE, добавленного в качестве отдельного компонента

Исследованье	Порядок добавления липидов		Процентное содержание ^c		Неводный растворитель	Концентрация ионов металла (мкг/г)			Наблюдаемый уровень мутности ^d
	DPPC	DPPA	MPEG5000-DPPE (низкая концентрация Ca ⁺²)	MPEG5000-DPPE (высокая концентрация Ca ⁺²)		Ca ⁺²	Mg ⁺²	Всего	
13 ^b	1	2	100	0	PG	0,1	0,0	0,1	0
14 ^b	1	2	75	25	PG	0,7	0,1	0,8	+
15 ^b	1	2	50	50	PG	1,3	0,3	1,6	++
16 ^b	1	2	25	75	PG	1,9	0,4	2,3	++
17 ^b	1	2	0	100	PG	3,1	0,6	3,7	+++
18	1	2	n/p ^d	n/p ^d	PG и G ^e	Не добавляли			Мутный, DPPA не растворялся

^a Определен в разделе 1.4 способов.

^b Конечную концентрацию DPPA (0,9 мг/мл), DPPC (8,02 мг/мл) и MPEG5000-DPPE (6,08 мг/мл) обеспечивали посредством добавлением фосфолипидов по отдельности в пропиленгликоль (25 мл).

^c Процентные содержания MPEG5000-DPPE; с низким содержанием Ca^{+2} [4 ppm] и высоким содержанием Ca^{+2} [520 ppm Ca^{+2} , 110 ppm Mg^{+2}] относительно общего количества.

^d n/p = не выполняли; фосфолипиды [DPPC (8,02 мг/мл) и DPPA (0,9 мг/мл)] не растворялись в системе растворителей из пропилена и гликоля.

^e Пропиленгликоль и глицерин 50:50 (об./об.).

Краткое описание примера 2.

Все данные исследования показали, что добавление кальция либо в неводный растворитель, либо посредством однородной смеси фосфолипидов, или при добавлении как MPEG5000-DPPE в виде отдельного соединения, во всех случаях вызывало осаждение. Концентрация, при которой влияние было заметно, была аналогичной для примера 2 по сравнению с концентрациями для примера 1. Самая низкая концентрация кальция, которая обеспечивала мутность (+), составляла 0,7 мкг/г Ca^{+2} (0,8 мкг/г всего Ca^{+2} и Mg^{+2}). Это концентрация, подобная 1,5-2,6 мкг/г, которая показана в примере 1.

Пример 3. Добавление неводного раствора фосфолипидов в водный растворитель.

Пример 3.1. Влияние кальция в неводном растворе фосфолипидов на добавление в водный растворитель.

Ряд исследований проводили для изучения влияния кальция в неводном растворе фосфолипидов перед переносом в водный состав. Они включают стадии 1) получения неводного раствора фосфолипидов, 2) получения водного раствора и 3) объединения растворов со стадий 1 и 2.

Пример 3.1.1. Получение неводного раствора: кальций, добавленный в неводный раствор после растворения фосфолипидов.

В соответствии с примером 2 первая стадия в исследованиях 19, 20 и 22 была следующей. Порошок DPPC, DPPA и MPEG5000-DPPE, характеризующийся низкой концентрацией кальция (см. табл. 1 в примерах способа), добавляли по отдельности (в последовательности, показанной в табл. 5) в нагретый ($55 \pm 5^\circ\text{C}$, за исключением исследования 22, в котором его нагревали до 70°C) и перемешанный пропиленгликоль. Проверляли визуальным осмотром, что фосфолипиды полностью растворялись, и полученный в результате раствор был прозрачным (см. примеры способа в разделе 1.4, фиг. 1). Раствор ацетата кальция [$\text{Ca}(\text{OAc})_2$] в пропиленгликоле добавляли, как указано в табл. 5, раствор перемешивали и наблюдали изменения во внешнем виде по сравнению с холостым растворителем и записывали оценку прозрачности. После добавления ацетата кальция раствор становился мутным. Данные концентраты в пропиленгликоле переносили в водную фазу, как описано ниже.

Пример 3.1.2. Получение неводного раствора: кальций в MPEG5000-DPPE.

Первая стадия исследований 21 и 25 была следующей. DPPC, DPPA (не включали в исследование 25) и порошок MPEG5000-DPPE, содержащий кальций (980 ppm, MPEG5000-DPPE, партия 1; см. табл. 1 в примерах способа), добавляли по отдельности (в последовательности, показанной в табл. 5) в нагретый ($55 \pm 5^\circ\text{C}$) и перемешанный PG. Оценивали прозрачность и наблюдали значительную мутность в исследовании 21 (+++; см. примеры способа в разделе 1.4, фиг. 1) после добавления DPPA, и раствор оставался мутным после добавления MPEG5000-DPPE, тогда как не наблюдали мутность в исследовании 25, при котором DPPA отсутствовал. Данные неводные растворы фосфолипидов переносили в водную фазу, как описано ниже.

Пример 3.1.3. Получение неводного раствора: кальций в однородной смеси липидов из MPEG5000-DPPE.

В соответствии с примером 2 первую стадию в исследованиях 23 и 24 проводили следующим образом. Однородную смесь фосфолипидов (полученную с применением толуола и метанола для растворения и добавлением МТВЕ для осаждения однородной смеси липидов), содержащую DPPC, DPPA и MPEG5000-DPPE, либо с низким (4 ppm, партия 2), либо с высоким содержанием (980 ppm, MPEG5000-DPPE, партия 1) кальция соответственно, добавляли в нагретый ($55 \pm 5^\circ\text{C}$) и перемешанный пропиленгликоль. Оценивали прозрачность и наблюдали значительную мутность (+++; см. примеры способа в разделе 1.4, фиг. 1) однородной смеси фосфолипидов, содержащей высокую концентрацию кальция. Это отличалось от прозрачного раствора, полученного растворением однородной смеси фосфолипидов с низким содержанием кальция (см. табл. 5). Данные неводные растворы фосфолипидов переносили в водную фазу, как описано ниже.

Пример 3.1.4. Получение неводного раствора: кальций в PG перед добавлением фосфолипидов.

В соответствии с примером 2 первую стадию в исследованиях 28 и 30 проводили следующим образом. Порошок DPPC, MPEG5000-DPPE и DPPA, характеризующийся низкой концентрацией кальция (см. табл. 1 в примерах способа), добавляли по отдельности (в последовательности, показанной в табл. 5) в нагретый ($55 \pm 5^\circ\text{C}$) и перемешанный PG, либо содержащий 11 мкг/г кальция, либо кальций добавляли после добавления фосфолипидов, соответственно. Прозрачность оценивали (см. примеры способов в

разделе 1.4, фиг. 1), и в исследовании 28 раствор был прозрачным после растворения DPPC и MPEG5000-DPPE, но становился и оставался мутным после добавления DPPA. В исследовании 30 раствор был прозрачным после растворения DPPC, DPPA и MPEG5000-DPPE, и становился мутным после добавления Ca^{+2} . Мутность для обоих исследований оценивали как +++ (см. табл. 5). Данные неводные растворы фосфолипидов переносили в водную фазу, как описано ниже.

Пример 3.2. Получение водного раствора.

Для всех исследований водный раствор получали следующим образом. В отдельной емкости хлорид натрия (NaCl), гептагидрат двухосновного фосфата натрия ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) и одноосновный фосфат натрия ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) добавляли в воду в емкость с мешалкой и перемешивали до растворения. Пропиленгликоль и глицерин также добавляли, при необходимости, так что конечное добавление концентрата фосфолипидов будет ресуспендировано в композиции 8:1:1 воды:глицерина:пропиленгликоля. Данный перемешанный раствор поддерживали при $55 \pm 5^\circ\text{C}$ (за исключением исследования 22, где водный раствор поддерживали при 70°C).

Пример 3.3. Объединение неводного и водного растворов.

Для всех исследований добавление неводного концентрата фосфолипидов в водный раствор проводили следующим образом. Теплые фосфолипиды в пропиленгликоле добавляли и перемешивали при 100-150 об/мин. Визуальные наблюдения записывали и отмечали время для полного диспергирования или растворения (либо прозрачный, либо мутный). Данные водные суспензии затем собирали и фильтровали через 0,2 мкм фильтр при 55°C при давлении над продуктом, составляющим 5 фунтов/кв. дюйм. Расход измеряли и образцы собирали для измерения фосфолипидов (см. примеры способа для процедуры). Образцы перед и после фильтрации анализировали для определения уровня потери фосфолипидов, связанной с фильтрацией.

Таблица 5

Влияние иона двухвалентного металла в неводном растворе фосфолипидов на добавление в водный растворитель

Исследование	Неводный концентрат фосфолипидов ^a			Водная суспензия ^b						
	Добавление фосфолипида в PG	Ca^{+2} (Mg^{+2}) мкг/г PG [источник Ca^{+2}]	Наблюдаемая мутность ^c	Содержит фосфатный буфер	Внешний вид после добавления в водный раствор	Концентрация Ca^{+2} (Mg^{+2}) в водном растворе [мкг/г воды]	Процент начальной скорости фильтрации при 9-10 минутах	% фосфолипида после фильтрации ^d		
							DPPC	DPPA	MPEG5000-DPPE	
19	C,E,A	0,0 (0,0)	0	Да	Прозрачный	0 (0)	64,6	101	100	99
20	C,E,A	13,7 (0) ^e [ацетат кальция, добавленный после липидов]	+++	Да	Мутный	0,8 (0)	1,3; заблокированный фильтр	95	76	94
21	C,A,E	3,1 (0,7) ^f [в MPEG5000-DPPE]	+++	Да	Мутный	0,2 (0,03)	9,0; заблокированный фильтр	96	78	95
22 ^g	C,A,E	21,4 (0) ^e [ацетат кальция, добавленный после липидов]	+++	Да: при 70°C	Мутный	1,2 (0)	8,5; заблокированный фильтр	98	75	97
25	C,E	5,8 (0,9) ^h [в MPEG5000-DPPE]	0	Да	Прозрачный	0,3 (0,04)	82,1	100	nd	99
23	LB ⁱ	0 (0)	0	Да	Прозрачный	0 (0)	92,0	99	100	99
24	LB ⁱ	5,36 (0,8) [Однородная смесь липидов]	+++	Да	Незначительно мутный	0,3 (0,04)	5,2; заблокированный фильтр	98	65	96
28	C,E,A	11,2 (0,0) ^k [ацетат кальция в PG, затем добавляли фосфолипид]	+++	Да	Мутный	0,6 (0)	42,7	101	24	100
30	C,A,E	21,4 (0,0) ^e [ацетат кальция, добавленный после липидов]	+++	Нет	Мутный	1,2 (0)	9,0; заблокированный фильтр	89	42	86

^a Концентрат фосфолипидов получали при 15 мг/мл посредством растворения DPPC (C), MPEG5000-DPPE (E) и DPPA (A) в отношении 0,401:0,304:0,045 в пропиленгликоле в указанном порядке при 55°C .

^b Концентраты фосфолипидов добавляли в емкость для составления, содержащую воду (800 мг); двухосновный фосфат натрия, гептагидрат (2,16 мг); одноосновный фосфат натрия, моногидрат (2,34 мг); хлорид натрия (4,84 мг); глицерин (126 мг) и пропиленгликоль (51,75 мг) на 1 мл составляемого раствора. Материалы объединяли при 55°C в указанном порядке.

^c Определен в способах в разделе 1.4.2.

^d HPLC с детектированием CAD, описанная в разделе 1.6.

^e 1 мл, 2 мл и 2 мл (исследования 20, 22 и 30 соответственно) исходного рас-

твор с 299 мкг Ca^{+2} на 1 г PG после добавления липидов перед переносом в водный раствор для составления.

^f MPEG5000-DPPE, содержащий Ca^{+2} (6,08 мг/мл; 520 и 110 ppm Ca^{+2} и Mg^{+2}), использовали для эксперимента.

^g Все составление проводили при 70°C.

^h MPEG5000-DPPE, содержащий Ca^{+2} (6,08 мг/мл; 980 и 150 ppm Ca^{+2} и Mg^{+2}), использовали для эксперимента.

ⁱ Получали с применением толуола и метанола для растворения липидов и добавлением МТВЕ для осаждения однородной смеси липидов. Полученную в результате однородную смесь липидов добавляли в 25 мл пропиленгликоля (15 мг/мл). В исследовании 23 использовали однородную смесь липидов с низким содержанием Ca^{+2} и в исследовании 24 использовали однородную смесь липидов, содержащую Ca^{+2} и Mg^{+2} (370 и 54 мкг/г соответственно).

^k Добавляли 1 мл исходного раствора с 299 мкг Ca^{+2} на 1 г PG перед добавлением липидов.

В соответствии с предыдущими примерами данные исследования показали, что осаждение происходило в неводном растворе фосфолипидов, когда присутствовали высокие концентрации кальция или кальция и магния. Это происходит независимо от того, присутствовал ли кальций в пропиленгликоле перед добавлением фосфолипидов, был ли добавлен после добавления фосфолипидов или добавлен с одним из компонентов с фосфолипидами (или с MPEG5000 DPPE, или в однородной смеси фосфолипидов). Как только образовался осадок, он не диспергируется при смешивании с водным растворителем. Это обеспечивает в результате мутный водный препарат, который имеет изначально сниженную скорость фильтрации и часто закупоривает 0,2 мкм фильтр (табл. 5; фиг. 5). Фильтрат мутных водных препаратов был прозрачным, но измерение фосфолипидов показало постоянно сниженные уровни DPPA. Этот эффект был очевидным как для добавленных по отдельности фосфолипидов, так и для фосфолипидов, добавленных в виде однородной смеси.

Пример 3.4. Влияние добавления неводного раствора фосфолипидов в водный растворитель, содержащий кальций.

Ряд исследований проводили для изучения влияния кальция в водном растворе на получение суспензии фосфолипидов. Они включают стадии 1) получения неводного раствора фосфолипидов, 2) получения водного раствора и 3) объединения растворов со стадий 1 и 2.

Пример 3.4.1. Получение неводного раствора.

В соответствии с примером 1 первую стадию в исследованиях 26, 27 и 29 проводили следующим образом. Порошок DPPC, DPPA и MPEG5000-DPPE, характеризующихся низкой концентрацией кальция (см. табл. 1 в примерах способа), добавляли по отдельности (в последовательности, показанной в табл. 6) в нагретый ($55 \pm 5^\circ\text{C}$) и перемешанный пропиленгликоль. Проверляли визуальным осмотром, что фосфолипид полностью растворялся, и полученный раствор был прозрачным. Данные концентраты в пропиленгликоле переносили в водную фазу, как описано ниже.

Пример 3.4.2. Получение водного раствора.

В отдельной емкости хлорид натрия (NaCl), гептагидрат двухосновного фосфата натрия ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) и одноосновный фосфат натрия ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) добавляли в воду в емкость с мешалкой, и перемешивали до растворения (для исследования 29 фосфатные соли исключали из состава). Пропиленгликоль и глицерин также добавляли, при необходимости, так что конечное добавление неводного раствора фосфолипидов будет ресуспендировано в композиции 8:1:1 воды:глицерина:пропиленгликоля. В некоторых исследованиях раствор ацетата кальция [$\text{Ca}(\text{OAc})_2$] в воде добавляли, как показано в табл. 6. Данный водный раствор перемешивали, поддерживали при $55 \pm 5^\circ\text{C}$. Определили, что добавление 48,4 мг/г кальция вызывало заметную флокуляцию в водном растворе в отсутствие каких-либо фосфолипидов (см. табл. 6, исследование А). 12,2 мкг/г кальция не давали осаждения в водном растворе (см. табл. 6, исследование В).

Пример 3.4.3. Объединение неводного и водного растворов.

Для всех исследований добавление неводного концентрата фосфолипидов в водный раствор проводили следующим образом. Теплый фосфолипид, растворенный в пропиленгликоле, добавляли и перемешивали при 100-150 об/мин. Визуальные наблюдения записывали и отмечали время для полного диспергирования или растворения (или прозрачный, или мутный). Для исследования 27 водный состав был изначально прозрачным. Кальций титровали, и при концентрациях $\geq 30,4$ мкг/г образовывался мутный осадок (см. табл. 6). Однако отмечали, что водный раствор без фосфолипида характеризовался заметным осаждением при 48,4 мкг/г (исследование А: табл. 6). В исследовании 27 при уровнях кальция, где на сам водный раствор не воздействовали (12,2 мкг/г на основе исследования В, табл. 6), не обнаруживали никакого влияния на прозрачность водного состава фосфолипидов. Это было подтверждено в исследовании 26, где кальций добавляли в водный раствор (12,2 мкг/г) перед объединением с неводным концентратом фосфолипидов. Это также продолжали в исследовании 29, где фосфатный буфер исключали из водного раствора. Изначально, кальций добавляли в водный раствор (12,2 мкг/г) перед объединением с неводным концентратом фосфолипидов, и состав был прозрачным. Дополнительное количество кальция добавляли

после добавления фосфолипида в состав, не более 96 мкг/г, и не наблюдали осаждения.

Водные составы из исследований 26 и 29 затем собирали и фильтровали через 0,2 мкм фильтр при 55°C при давлении над продуктом, составляющим 5 фунтов/кв. дюйм. Расход на 10 мин не снижался по сравнению с исходным расходом; все образцы фильтровали, и в целом фильтрация была подобной составам, не содержащим кальций (см. исследования 19, 23 и 25). Образцы перед и после фильтрации собирали и сравнивали для определения потери фосфолипидов, связанной с фильтрацией. Никакой значимой потери фосфолипида не наблюдали (см. табл. 6).

Таблица 6

Влияние добавления неводного раствора фосфолипидов в водный растворитель, содержащий ионы двухвалентных металлов

Исследование	Неводный концентрат липидов		Водная суспензия ^a						
	Добавление фосфолипида РС ^b	Наблюдаемая мутность ^c	Концентрация кальция в водном растворе (мкг Са ²⁺ /г)	Внешний вид после добавления концентрата липидов в водный раствор	Содержание PO ₄ буфер	Процент начальной скорости фильтрации на 9-	% фосфолипида после фильтрации ^d		
							DPPC	DPPA	MPEG5000-DPPE
27	C,E,A	0	Титрование 0-48,7 мкг Са ²⁺ /г	Прозрачный до 12,2, незначительно мутный при 30,4 и мутный с осадком при 36,5 мкг Са ²⁺ /г воды	Да	n/a			
26	C,E,A	0	12,2 °	Прозрачный	Да	114,3	99	101	98
29	C,A,E	0	12,2 °	Прозрачный	Нет	100,8	99	99	98
A	n/a	n/a	48,4 °	Осадок	Да	n/a	n/a	n/a	n/a
B	n/a	n/a	12,2 °	Прозрачный	Да	n/a	n/a	n/a	n/a

^a Все составление проводили при 55°C. Неводные растворы фосфолипидов добавляли в емкость для составления водного состава, содержащую воду (800 мг); двухосновный фосфат натрия, гептагидрат (2,16 мг/мл), одноосновный фосфат натрия, моногидрат (2,34 мг/мл), хлорид натрия (4,84 мг/мл), глицерин (126 мг) и пропиленгликоль (51,75 мг), если иное не указано в сносках.

^b "A" представляет собой DPPA (0,9 мг/мл), "C" представляет собой DPPC (8,02 мг/мл), и "E" представляет собой MPEG5000-DPPE (6,08 мг/мл), которые добавляли в указанном порядке в 25 мл пропиленгликоля.

^c Определен в способах в разделе 1.4.

^d HPLC с детектированием CAD, описанная в разделе 1.6.

^e Перед добавлением концентрата липидов в емкость для составления водного состава 1 мл, 1 мл, 4 мл и 1 мл концентрата ацетата кальция (6,085 мг Са²⁺ на г воды) добавляли для исследований 26, 29, A и B соответственно.

Данные исследования показали, что кальций не вызывает осаждение фосфолипидов в водном составе даже до 96 мкг/г. Однако при уровнях кальция выше 12,2 мкг/г фосфатные соли начинают осаждаться.

Пример 4. Влияние ионов двухвалентных металлов на растворение фосфолипидов в забуференном пропиленгликоле и с добавлением глицерина.

Пример 4.1. Титрование кальция в забуференном неводном концентрате фосфолипидов.

Исследования 31 и 32 проводили следующим образом. Порошок DPPC, DPPA и MPEG5000-DPPE, характеризующийся низкой концентрацией кальция (см. табл. 1 в примерах способа), добавляли либо по отдельности (в последовательности, показанной в табл. 7), либо в виде однородной смеси фосфолипидов (полученной с применением толуола и метанола для растворения и добавлением МТВЕ для осаждения смеси липидов) в нагретый (55±5°C) и перемешанный забуференный ацетатом пропиленгликоль. Проверили визуальным осмотром, что липид полностью растворялся, и полученный раствор был прозрачным (см. примеры способа в разделе 1.4). Раствор ацетата кальция [Са(ОАс)₂] в пропиленгликоле использовали для титрования раствора фосфолипидов посредством серий небольших добавлений. Раствор перемешивали и наблюдали изменения во внешнем виде в ходе титрования, по сравнению с холостым растворителем после каждого добавления и записывали оценивание прозрачности. Получали показатель прозрачности (см. раздел 1.4, фиг. 1, для способа) на основе данного оценивания и самая низкая концентрация кальция, которая дает показатель +, ++ и +++, показана в табл. 7.

Таблица 7

Влияние кальция на растворение фосфолипидов
в забуференном пропиленгликоле

Иссл едова ние	Порядок добавления липидов ^a				Концентраци я кальция (мкг/мл Ca ⁺²)	Наблюдаемые пороговые значения для мутности (мкг/мл Ca ⁺²) ^b		
	DPP C	DPPA	MPEG500 0-DPPE	Одно родна я смесь липид ов		+	++	+++
31	n/a	n/a	n/a	1 ^c	Титрование ^r	5,8	11,2	22,3
32	1	3	2	n/a	Титрование ^s	11,3	17,0	>33,5

^a Липиды [DPPC (4,01 мг), DPPA (0,45 мг) и MPEG5000-DPPE (3,04 мг), в указанном порядке] по отдельности или однородную смесь липидов (7,5 мг) добавляли в каждый миллилитр пропиленгликоля, содержащего ацетат натрия (0,74 мг) и уксусную кислоту (0,06 мг), при 60°C с перемешиванием.

^b Определен в разделе 1.4 способов.

^c Получали с применением толуола и метанола для растворения липидов и добавлением МТВЕ для осаждения однородной смеси липидов.

Пример 4.2. Титрование кальция в забуференном неводном концентрате фосфолипидов из MPEG5000-DPPE.

Исследования 33-36 проводили следующим образом. DPPC, DPPA и MPEG5000-DPPE либо с высоким (980 ppm, партия 1), либо с низким содержанием Ca⁺² (4 ppm) добавляли по отдельности (в последовательности, показанной в табл. 8) или в виде однородной смеси фосфолипидов (полученной с применением толуола и метанола для растворения и добавлением МТВЕ для осаждения смеси липидов) в нагретый (55±5°C) и перемешанный забуференный ацетатом пропиленгликоль. Оценивали прозрачность (см. примеры способа в разделе 1.4) и наблюдали мутность (+ или ++; см. примеры способа, фиг. 1) однородной смеси фосфолипидов, содержащей высокую концентрацию кальция. Это отличалось от прозрачного раствора, полученного растворением однородной смеси фосфолипидов с низким содержанием кальция (см. табл. 8).

Пример 4.3. Добавление глицерина.

В данные забуференные неводные растворы фосфолипидов переносили глицерин при перемешивании при 300 об/мин. Множество пузырьков газа улавливались в перемешиваемом растворе, но он становился прозрачным при остановке мешалке. Визуальные наблюдения записывали и отмечали уровень прозрачности (либо прозрачный, либо мутный). Данные растворы PG/G затем собирали и фильтровали через 0,2 мкм фильтр при 60°C при давлении над продуктом, составляющим 10 фунтов/кв. дюйм. Расход измеряли и образцы собирали для измерения фосфолипидов. Образцы перед и после фильтрации сравнивали для определения потери фосфолипидов, связанной с фильтрацией.

Таблица 8

Влияние кальция на растворение фосфолипидов
в забуференном пропиленгликоле и добавленном глицерине

Иссл едова ние	Концентрат на основе ацетата/пропиленгликоля ^a			Пропиленгликоль с добавленным глицерином ^b					
	Добавление липидов в PG	Ca ⁺² (Mg ⁺²) [мкг/г]	Наблюдаемая мутность ^c	Внешний вид после добавления глицерина	Концентрация Ca ⁺² и (Mg ⁺²) в продукте [мкг/г]	Процент начальной скорости фильтрации на 8-9 минутах	% фосфолипида после фильтрации ^d		
							DPPC	DPPA	MPEG 5000 DPPE
33	LB ^e	0 (0)	0	Прозрачный	0	174,2	97	90	96
34	LB ^e	2,7 (0,4)	+	Мутный	1,6 (0,2)	96,7; заблокир ованный фильтр	101	86	98
35	C.A.E	0 (0)	0	Прозрачный	0	245,2	97	100	98
36	C.A.E ^f	2,9 (0,4)	++	Мутный	1,7 (0,2)	19,8; заблокир ованный фильтр	99	80	100

^a Липиды [DPPC (4,01 мг), DPPA (0,45 мг) и MPEG5000-DPPE (3,04 мг), в указанном порядке] по отдельности или однородную смесь липидов (7,5 мг) добавляли в каждый миллилитр пропиленгликоля, содержащего ацетат натрия (0,74 мг) и уксусную кислоту (0,06 мг), при 60°C с перемешиванием.

^b Пропиленгликоль, содержащий ацетатный буфер и фосфолипиды, разбавляли 1:1 (об./об.) глицерином.

^c Определен в способах в разделе 1.4.

^d HPLC с детектированием CAD, описанная в разделе 1.6.

^e Однородная смесь липидов, полученная с применением толуола и метанола для растворения липидов и добавлением МТВЕ для осаждения однородной смеси липидов, с низким содержанием Ca^{+2} (партия 1) для исследования 33 и высоким содержанием Ca^{+2} (370 Ca^{+2} и 54 ppm Mg^{+2} партия 2) для исследования 34.

^f MPEG5000-DPPE, содержащий Ca^{+2} (3,04 мг/мл; 980 и 150 ppm Ca^{+2} и Mg^{+2} ; партия 1), использовали в данном эксперименте.

Эти исследования показали, что осаждение происходило в забуференном неводном растворе фосфолипидов зависимым от концентрации кальция образом. Это происходило независимо от того, получали забуференный неводный раствор фосфолипидов с отдельными фосфолипидами или с однородной смесью липидов и при концентрациях, которые были незначительно различными. Концентрация, которая вызывает изначальное осаждение, для забуференного раствора была выше (5,8-11,3 мкг/г Ca^{+2}), чем для незабуференных растворов (1,5-2,3 мкг Ca^{+2} /г, см. табл. 2, исследования 1-4), что указывает на влияние буфера.

Кальций из однородной смеси липидов вызывал осаждение в забуференном неводном растворе фосфолипидов, как наблюдали и в незабуференном растворе. Как только образовался осадок, он не диспергируется при смешивании с глицерином. Это обеспечивает в результате мутный неводный состав, который имеет изначальную сниженную скорость фильтрации и часто закупоривает 0,2 мкм фильтр (табл. 8, фиг. 6). Фильтрат мутных составов был прозрачным, но измерение фосфолипидов показало слегка сниженные уровни DPPA.

Пример 5. Образование микросфер и акустическое обнаружение для изготовленного продукта.

Пример 5.1. Водная суспензия фосфолипидов.

Исследования 37 и 38 проводили следующим образом. Отфильтрованные материалы из исследований 19 и 23 получали во флаконах (см. примеры способа в разделе 1.7.1). После VIALMIX® образцы после активации анализировали в отношении размера и количества микросфер (см. способы в разделе 1.7.3) и клинические ультразвуковые акустические параметры (см. способы в разделе 1.7.4), см. табл. 9.

Таблица 9

Количество, и размер, и акустическая активность микросфер
из водной суспензии фосфолипидов

Исследование	Основа получения	Средний диаметр микросфер (микроны) ^a N=2	Микросфер на мл ($\times 10^9$) ^b N=2	Среднее акустическое затухание (SD) (дБ/см/10 ⁶ пузырьков/мл) ^c
37	Отдельные фосфолипиды с низким содержанием Ca^{+2} , измеренным в MPEG-5000 DPPE и других компонентах	1,38, 1,36	3,73, 2,92	8,9 (0,3)
38	Однородная смесь фосфолипидов с низким содержанием Ca^{+2} , измеренным в MPEG-5000 DPPE и других компонентах	1,34, 1,35	3,4, 2,5	9,0 (1,3)

^a Средний диаметр микросфер для микросфер в диапазоне от 1 до 80 мкм.

^b Средняя концентрация микросфер для микросфер в диапазоне от 1 до 80 мкм.

^c См. раздел примеры способов для более подробной информации.

Данные исследования показывают, что водную суспензию фосфолипидов можно получить с применением отдельных фосфолипидов или однородной смеси фосфолипидов, когда компоненты характеризуются низкой концентрацией кальция. Оба продукта характеризуются диаметром микросфер в пределах спецификации DEFINITY® (см. листок-вкладыш в упаковке для DEFINITY®) и обладают сильным акустическим затуханием ультразвука на клиническом аппарате для ультразвукового исследования.

Аспекты и варианты осуществления

Различные аспекты и варианты осуществления, представленные в настоящем изобретении, перечислены ниже.

Пункт 1. Способ получения суспензии фосфолипидов, включающий обеспечение исходных форм DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE;

измерение концентрации кальция в одной или нескольких исходных формах DPPC, DPPA и MPEG5000-DPPE;

объединение исходных форм DPPA, DPPC и/или MPEG5000-DPPE с неводным растворителем с образованием раствора фосфолипидов и

объединение раствора фосфолипидов с водным растворителем с образованием суспензии фосфолипидов.

Пункт 2. Способ по п.1, дополнительно включающий измерение концентрации кальция в неводном растворителе.

Пункт 3. Способ по п.1, где объединенная измеренная концентрация кальция исходных форм DPPA, DPPC и/или MPEG-DPPE является низкой.

Пункт 4. Способ по п.1 или 3, где объединенная измеренная концентрация кальция в исходных формах DPPA, DPPC и/или MPEG-DPPE и неводного растворителя является низкой.

Пункт 5. Способ по п.1, где измеряют концентрации кальция в исходных формах DPPC, DPPA и MPEG5000-DPPE.

Пункт 6. Способ по п.2, где измеряют концентрации кальция в исходных формах DPPC, DPPA и MPEG5000-DPPE, и при этом объединенная измеренная концентрация кальция в исходных формах DPPA, DPPC, MPEG-DPPE и неводном растворителе является низкой.

Пункт 7. Способ получения суспензии фосфолипидов, включающий обеспечение исходных форм DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE;

измерение концентрации кальция в одной или нескольких исходных формах DPPC, DPPA и MPEG5000-DPPE;

объединение исходных форм DPPA, DPPC и/или MPEG5000-DPPE, характеризующихся объединенной измеренной низкой концентрацией кальция, с неводным растворителем с образованием раствора фосфолипидов и

объединение раствора фосфолипидов с водным растворителем с образованием суспензии фосфолипидов.

Пункт 8. Способ по п.7, где измеряют концентрацию кальция в неводном растворителе, и при этом исходные формы DPPA, DPPC, MPEG500-DPPE и неводный растворитель характеризуются объединенной измеренной низкой концентрацией кальция.

Пункт 9. Способ получения суспензии фосфолипидов, включающий

объединение исходной формы MPEG5000-DPPE, исходной формы DPPA, исходной формы DPPC и неводного растворителя, каждое из которых характеризуется характеристической концентрацией кальция, с образованием раствора фосфолипидов, причем объединенная характеристическая концентрация кальция исходной формы MPEG5000-DPPE, исходной формы DPPA, исходной формы DPPC и неводного растворителя соответствует низкой концентрации кальция; и

объединение раствора фосфолипидов с водным растворителем с образованием суспензии фосфолипидов.

Пункт 10. Способ получения суспензии фосфолипидов, включающий

выбор исходной формы MPEG5000-DPPE, исходной формы DPPA и исходной формы DPPC, одна, две или все три из которых характеризуются характеристической концентрацией кальция, где объединенная характеристическая концентрация кальция соответствует низкой концентрации кальция;

объединение указанных исходной формы MPEG5000-DPPE, исходной формы DPPA, исходной формы DPPC и неводного растворителя с образованием раствора фосфолипидов и

объединение раствора фосфолипидов с водным растворителем с образованием суспензии фосфолипидов.

Пункт 11. Способ получения суспензии фосфолипидов, включающий

выбор исходной формы MPEG5000-DPPE, исходной формы DPPA и исходной формы DPPC, при этом каждая из них характеризуется характеристической концентрацией кальция, где объединенная характеристическая концентрация кальция соответствует низкой концентрации кальция;

объединение указанных исходной формы MPEG5000-DPPE, исходной формы DPPA, исходной формы DPPC и неводного растворителя с образованием раствора фосфолипидов и

объединение раствора фосфолипидов с водным растворителем с образованием суспензии фосфолипидов.

Пункт 12. Способ по п.11, где неводный растворитель характеризуется характеристической концентрацией кальция, и при этом объединенная характеристическая концентрация кальция в исходных формах MPEG5000-DPPE, DPPA и DPPC и неводном растворителе является низкой.

Пункт 13. Способ получения суспензии фосфолипидов, включающий

измерение концентрации кальция в исходной форме MPEG5000-DPPE;

объединение исходной формы MPEG5000-DPPE, характеризующейся измеренной низкой концентрацией кальция, с исходной формой DPPA, исходной формой DPPC и неводным растворителем с образованием раствора фосфолипидов и

объединение раствора фосфолипидов с водным растворителем с образованием суспензии фосфолипидов.

Пункт 14. Способ по п.11, где неводный растворитель содержит (i) пропиленгликоль или (ii) пропиленгликоль и глицерин.

Пункт 15. Способ по п.13 или 14, где неводный растворитель содержит буфер.

Пункт 16. Способ по п.13 или 14, где неводный растворитель содержит ацетатный буфер.

Пункт 17. Способ по п.13 или 14, где водный растворитель содержит буфер.

Пункт 18. Способ по п.13 или 14, где водный растворитель содержит фосфатный буфер.

Пункт 19. Способ по любому из пп.13-18, где исходные формы DPPC, DPPA и MPEG5000-DPPE по

отдельности объединяют с неводным растворителем с образованием раствора фосфолипидов.

Пункт 20. Способ по любому из пп.13-18, где исходные формы DPPC, DPPA и MPEG5000-DPPE последовательно объединяют с неводным растворителем, независящим от порядка добавления образцом, с образованием раствора фосфолипидов.

Пункт 21. Способ по любому из пп.13-18, где исходные формы DPPC, DPPA и MPEG5000-DPPE объединяют друг с другом с образованием смеси фосфолипидов и затем смесь фосфолипидов объединяют с неводным растворителем с образованием раствора фосфолипидов.

Пункт 22. Способ по любому из пп.13-18, где исходные формы DPPC, DPPA и MPEG5000-DPPE объединяют друг с другом с образованием однородной смеси фосфолипидов и однородную смесь фосфолипидов объединяют с неводным растворителем с образованием раствора фосфолипидов.

Пункт 23. Способ по п.22, где однородную смесь фосфолипидов образуют с помощью способа растворения-осаждения в органическом растворителе, включающего растворение исходных форм DPPC, DPPA и MPEG5000-DPPE в смеси метанола/толуола, необязательно концентрирование однородной смеси фосфолипидов/метанола/толуола, а затем приведение в контакт концентрированной смеси фосфолипид/метанола/толуола с метил-трет-бутиловым эфиром (МТБЕ) для осаждения фосфолипидов с образованием однородной смеси фосфолипидов.

Пункт 24. Способ по любому из пп.13-23, где низкая концентрация кальция составляет менее 115 ppm.

Пункт 25. Способ по любому из пп.13-24, дополнительно включающий помещение суспензии фосфолипидов во флакон и введение газообразного перфторуглерода в пространство над продуктом во флаконе.

Пункт 26. Способ по п.25, дополнительно включающий активацию суспензии фосфолипидов с помощью газообразного перфторуглерода с образованием контрастного средства для ультразвукового исследования, содержащего фосфолипидные микросферы с инкапсулированным газом.

Пункт 27. Способ по п.26, дополнительно включающий введение контрастного средства для ультразвукового исследования субъекту и получение одного или нескольких изображений субъекта в результате ультразвукового исследования с контрастным усилением.

Пункт 28. Способ по любому из пп.13-27, дополнительно включающий измерение концентрации кальция в исходной форме DPPA и/или исходной форме DPPC и/или смеси фосфолипидов и/или однородной смеси фосфолипидов.

Пункт 29. Способ получения суспензии фосфолипидов, включающий

измерение концентрации кальция в исходной форме DPPC;

объединение исходной формы DPPC, характеризующейся измеренной низкой концентрацией кальция, с исходной формой DPPA, исходной формой MPEG5000-DPPE и неводным растворителем с образованием раствора фосфолипидов и

объединение раствора фосфолипидов с водным растворителем с образованием суспензии фосфолипидов.

Пункт 30. Способ по п.29, где низкая концентрация кальция составляет менее 90 ppm.

Пункт 31. Способ получения суспензии фосфолипидов, включающий

измерение концентрации кальция в исходной форме DPPA;

объединение исходной формы DPPA, характеризующейся измеренной низкой концентрацией кальция, с исходной формой DPPC, исходной формой MPEG5000-DPPE и неводным растворителем с образованием раствора фосфолипидов и

объединение раствора фосфолипидов с водным растворителем с образованием суспензии фосфолипидов.

Пункт 32. Способ по п.31, где низкая концентрация кальция составляет менее 780 ppm.

Пункт 33. Способ получения суспензии фосфолипидов, включающий

измерение концентрации кальция в неводном растворителе;

объединение неводного растворителя, характеризующегося измеренной низкой концентрацией кальция, с исходной формой DPPA, исходной формой DPPC и исходной формой MPEG5000-DPPE с образованием раствора фосфолипидов и

объединение раствора фосфолипидов с водным растворителем с образованием суспензии фосфолипидов.

Пункт 34. Способ по п.33, где низкая концентрация кальция составляет менее 0,7 ppm.

Пункт 35. Способ получения суспензии фосфолипидов, включающий

выбор исходной формы MPEG5000-DPPE, характеризующейся отсутствием кальция или его низкой концентрацией;

объединение указанных исходной формы MPEG5000-DPPE, исходной формы DPPA, исходной формы DPPC и неводного растворителя с образованием раствора фосфолипидов и

объединение раствора фосфолипидов с водным растворителем с образованием суспензии фосфолипидов.

Пункт 36. Способ по п.35, где исходная форма MPEG5000-DPPE также характеризуется отсутстви-

ем катионов двухвалентных металлов или их низким содержанием.

Пункт 37. Способ получения суспензии фосфолипидов, включающий объединение исходной формы MPEG5000-DPPE, исходной формы DPPA, исходной формы DPPC и неводного растворителя с образованием раствора фосфолипидов, характеризующегося отсутствием кальция или его низкой концентрацией; и

объединение раствора фосфолипидов с водным растворителем с образованием суспензии фосфолипидов.

Пункт 38. Способ визуализации субъекта, включающий

объединение суспензии фосфолипидов с газообразным перфторуглеродом с образованием контрастного средства для ультразвукового исследования, содержащего фосфолипидные микросферы с инкапсулированным газом;

введение контрастного средства для ультразвукового исследования субъекту и

получение одного или нескольких контрастных изображений субъекта в результате ультразвукового исследования с контрастным усилением, причем суспензия фосфолипидов получена с помощью способа по любому из пп.1-37.

Пункт 39. Способ визуализации субъекта, включающий

объединение суспензии фосфолипидов с газообразным перфторуглеродом с образованием контрастного средства для ультразвукового исследования, содержащего фосфолипидные микросферы с инкапсулированным газом;

введение контрастного средства для ультразвукового исследования субъекту и получение одного или нескольких контрастных изображений субъекта в результате ультразвукового исследования с контрастным усилением, причем суспензия фосфолипидов получена с помощью способа, включающего измерение концентрации кальция в исходной форме MPEG5000-DPPE;

объединение исходной формы MPEG5000-DPPE, характеризующейся измеренной низкой концентрацией кальция, с исходной формой DPPA, исходной формой DPPC и неводным растворителем с образованием раствора фосфолипидов и

объединение раствора фосфолипидов с водным растворителем с образованием суспензии фосфолипидов.

Пункт 40. Способ визуализации субъекта, включающий

объединение суспензии фосфолипидов с газообразным перфторуглеродом с образованием контрастного средства для ультразвукового исследования, содержащего фосфолипидные микросферы с инкапсулированным газом;

введение контрастного средства для ультразвукового исследования субъекту и

получение одного или нескольких контрастных изображений субъекта в результате ультразвукового исследования с контрастным усилением, причем суспензия фосфолипидов получена с помощью способа, включающего выбор исходной формы MPEG5000-DPPE, характеризующейся отсутствием кальция или его низкой концентрацией, объединение указанных исходной формы MPEG5000-DPPE, исходной формы DPPA, исходной формы DPPC и неводного растворителя с образованием раствора фосфолипидов и

объединение раствора фосфолипидов с водным растворителем с образованием суспензии фосфолипидов.

Пункт 41. Способ визуализации субъекта, включающий

объединение суспензии фосфолипидов с газообразным перфторуглеродом с образованием контрастного средства для ультразвукового исследования, содержащего фосфолипидные микросферы с инкапсулированным газом;

введение контрастного средства для ультразвукового исследования субъекту и получение одного или нескольких контрастных изображений субъекта в результате ультразвукового исследования с контрастным усилением, причем суспензия фосфолипидов получена с помощью способа, включающего объединение исходной формы MPEG5000-DPPE, исходной формы DPPA, исходной формы DPPC и неводного растворителя с образованием раствора фосфолипидов, характеризующегося отсутствием кальция или его низкой концентрацией; и

объединение раствора фосфолипидов с водным растворителем с образованием суспензии фосфолипидов.

Пункт 42. Способ получения суспензии фосфолипидов, включающий

объединение по отдельности исходных форм DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE с содержащим пропиленгликоль (PG) неводным растворителем, при условии низкого содержания кальция или его отсутствия, с образованием раствора фосфолипидов; и

объединение раствора фосфолипидов с водным растворителем с образованием суспензии фосфолипидов.

Пункт 43. Способ получения суспензии фосфолипидов, включающий

последовательное объединение исходных форм DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE с содержащим PG неводным растворителем, при условии низкого содержания кальция или его отсутствия, независимым от порядка добавления образом, с образованием раствора фосфолипидов и

объединение раствора фосфолипидов с водным растворителем с образованием суспензии фосфолипидов.

Пункт 44. Способ получения суспензии фосфолипидов, включающий:

объединение, при условии отсутствия метанола и толуола, исходных форм DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE с образованием однородной смеси фосфолипидов, объединение однородной смеси фосфолипидов с содержащим PG неводным растворителем, при условии низкого содержания кальция или его отсутствия, с образованием раствора фосфолипидов и объединение раствора фосфолипидов с водным растворителем с образованием суспензии фосфолипидов.

Пункт 45. Способ получения суспензии фосфолипидов, включающий

объединение исходных форм DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE с растворителем для однородной смеси с образованием однородной смеси фосфолипидов;

выпаривание растворителя для однородной смеси с образованием высушенной однородной смеси фосфолипидов;

объединение высушенной однородной смеси фосфолипидов с содержащим PG неводным растворителем, при условии низкого содержания кальция или его отсутствия, с образованием раствора фосфолипидов и

объединение раствора фосфолипидов с водным растворителем с образованием суспензии фосфолипидов.

Пункт 46. Способ получения суспензии фосфолипидов, включающий

объединение исходных форм DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE с растворителем для однородной смеси с образованием однородной смеси фосфолипидов;

осаждение, при условии отсутствия MTBE, однородной смеси фосфолипидов с применением второго растворителя для однородной смеси;

объединение осажденной однородной смеси фосфолипидов с неводным растворителем, при условии низкого содержания кальция или его отсутствия, с образованием раствора фосфолипидов и

объединение раствора фосфолипидов с водным растворителем с образованием суспензии фосфолипидов.

Пункт 47. Способ по любому из пп.42-46, где низкая концентрация кальция составляет менее 0,7 ppm.

Пункт 48. Способ по любому из пп.42-47, дополнительно включающий объединение суспензии фосфолипидов с газообразным перфторуглеродом с образованием контрастного средства для ультразвукового исследования, содержащего фосфолипидные микросферы с инкапсулированным газом.

Пункт 49. Способ по п.48, дополнительно включающий введение контрастного средства для ультразвукового исследования субъекту и получение одного или нескольких изображений субъекта в результате ультразвукового исследования с контрастным усилением.

Пункт 50. Способ визуализации субъекта, включающий

объединение суспензии фосфолипидов с газообразным перфторуглеродом с образованием контрастного средства для ультразвукового исследования, содержащего фосфолипидные микросферы с инкапсулированным газом;

введение контрастного средства для ультразвукового исследования субъекту и

получение одного или нескольких контрастных изображений субъекта в результате ультразвукового исследования с контрастным усилением, причем суспензия фосфолипидов получена с помощью способа по любому из пп.42-47.

Пункт 51. Композиция, содержащая раствор фосфолипидов, содержащий DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE в неводном растворителе и характеризующийся низкой концентрацией кальция.

Пункт 52. Композиция, содержащая раствор фосфолипидов, содержащий DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE в неводном растворителе, причем DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE и неводный растворитель характеризуются объединенным характеристическим низким содержанием ионов кальция.

Пункт 53. Композиция по п.51 или 52, где неводный растворитель содержит пропиленгликоль.

Пункт 54. Композиция по п.51 или 52, где неводный растворитель содержит пропиленгликоль и глицерин.

Пункт 55. Композиция по любому из пп.51-54, где неводный растворитель содержит буфер.

Пункт 56. Композиция по п.55, где буфер представляет собой ацетатный буфер.

Пункт 57. Композиция по любому из пп.51-56, дополнительно содержащая газообразный перфторуглерод.

Пункт 58. Композиция по п.57, где газообразный перфторуглерод представляет собой перфлутрен.

Пункт 59. Способ контрастной визуализации субъекта посредством ультразвукового исследования, включающий:

(а) активацию суспензии фосфолипидов с газообразным перфторуглеродом с образованием липидных микросфер с инкапсулированным газом, причем суспензия фосфолипидов содержит раствор фосфолипидов, содержащий один или несколько фосфолипидов и неводный растворитель, причем один или несколько из которых характеризуются низкой концентрацией кальция;

- (b) введение липидных микросфер с инкапсулированным газом субъекту и
- (c) получение изображения субъекта в результате ультразвукового исследования.

Пункт 60. Способ по п.59, где один или несколько фосфолипидов предусматривают DPPC и MPEG-5000-DPPE.

Пункт 61. Способ по п.59, где один или несколько фосфолипидов предусматривают DPPA, DPPC и MPEG-5000-DPPE.

Пункт 62. Способ по п.61, где DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE представлены в отношении в мол.%, составляющем 10 к 82 к 8 (10:82:8).

Пункт 63. Способ по любому из пп.60-62, где характеристическая низкая концентрация кальция для DPPA составляет менее 780 ppm, для DPPC составляет менее 90 ppm и для MPEG5000-DPPE составляет менее 115 ppm.

Пункт 64. Способ по любому из пп.59-63, где неводный растворитель содержит (a) пропиленгликоль или (b) пропиленгликоль и глицерин.

Пункт 65. Способ по любому из пп.59-64, где характеристическая низкая концентрация кальция для неводного растворителя составляет менее 0,7 ppm.

Пункт 66. Способ по любому из пп.59-65, где раствор фосфолипидов не содержит обнаруживаемый осадок фосфолипидов.

Пункт 67. Способ контрастной визуализации субъекта посредством ультразвукового исследования, включающий:

(a) активацию суспензии фосфолипидов с газообразным перфторуглеродом с образованием липидных микросфер с инкапсулированным газом, причем суспензия фосфолипидов содержит раствор фосфолипидов, содержащий один или несколько фосфолипидов и неводный растворитель, и получена при условии отсутствия метанола и толуола и при условии отсутствия метил-трет-бутилового эфира, причем один или несколько фосфолипидов и неводный растворитель характеризуются низкой концентрацией кальция,

(b) введение липидных микросфер с инкапсулированным газом субъекту и

(c) получение изображения субъекта в результате ультразвукового исследования.

Пункт 68. Способ по п.67, где один или несколько фосфолипидов предусматривают DPPC и MPEG-5000-DPPE.

Пункт 69. Способ по п.67, где один или несколько фосфолипидов предусматривают DPPA, DPPC и MPEG-5000-DPPE.

Пункт 70. Способ по п.69, где DPPA, DPPC и MPEG-5000-DPPE представлены в отношении в мол.%, составляющем 10 к 82 к 8 (10:82:8).

Пункт 71. Способ по любому из пп.67-70, где низкая концентрация кальция для DPPA составляет менее 780 ppm, для DPPC составляет менее 90 ppm и для MPEG5000-DPPE составляет менее 115 ppm.

Пункт 72. Способ по любому из пп.67-71, где неводный растворитель содержит (a) пропиленгликоль или (b) пропиленгликоль и глицерин.

Пункт 73. Способ по любому из пп.67-72, где низкая концентрация кальция для неводного растворителя составляет менее 0,7 ppm.

Пункт 74. Способ по любому из пп.67-73, где раствор фосфолипидов не содержит обнаруживаемый осадок фосфолипидов.

Пункт 75. Способ получения липидных микросфер с инкапсулированным газом, включающий:

объединение одного или нескольких фосфолипидов и неводного растворителя с образованием раствора фосфолипидов, причем один или несколько фосфолипидов и/или неводный растворитель характеризуются характеристической низкой концентрацией кальция, объединение раствора фосфолипидов с водным раствором с образованием суспензии фосфолипидов и активацию суспензии фосфолипидов с газообразным перфторуглеродом с образованием липидных микросфер с инкапсулированным газом.

Пункт 76. Способ по п.75, где один или несколько фосфолипидов предусматривают DPPC и MPEG-5000-DPPE.

Пункт 77. Способ по п.75, где один или несколько фосфолипидов предусматривают DPPA, DPPC и MPEG-5000-DPPE.

Пункт 78. Способ по п.77, где DPPA, DPPC и MPEG-5000-DPPE представлены в отношении в мол.%, составляющем 10 к 82 к 8 (10:82:8).

Пункт 79. Способ по любому из пп.75-78, где характеристическая низкая концентрация кальция для DPPA составляет менее 780 ppm, для DPPC составляет менее 90 ppm и для MPEG5000-DPPE составляет менее 115 ppm.

Пункт 80. Способ по любому из пп.75-79, где неводный растворитель содержит (a) пропиленгликоль или (b) пропиленгликоль и глицерин.

Пункт 81. Способ по любому из пп.75-80, где характеристическая низкая концентрация кальция для неводного растворителя составляет менее 0,7 ppm.

Пункт 82. Способ по любому из пп.75-81, где раствор фосфолипидов не содержит обнаруживаемый осадок фосфолипидов.

Пункт 83. Способ получения липидных микросфер с инкапсулированным газом, включающий объединение одного или нескольких фосфолипидов и неводного растворителя, при условии отсутствия метанола и толуола и при условии отсутствия метил-трет-бутилового эфира, с образованием раствора фосфолипидов, причем один или несколько фосфолипидов и/или неводный растворитель характеризуются низкой концентрацией кальция;

объединение раствора фосфолипидов с водным раствором с образованием суспензии фосфолипидов и активацию суспензии фосфолипидов с газообразным перфторуглеродом с образованием липидных микросфер с инкапсулированным газом.

Пункт 84. Способ по п.83, где один или несколько липидов предусматривают (а) DPPC и MPEG-5000-DPPE, или (b) DPPA, DPPC и MPEG-5000-DPPE, и/или (c) DPPA, DPPC и MPEG-5000-DPPE в отношении в мол.%, составляющем 10 к 82 к 8 (10:82:8).

Пункт 85. Способ по п.84, где низкая концентрация кальция для DPPA составляет менее 780 ppm, для DPPC составляет менее 90 ppm и для MPEG5000-DPPE составляет менее 115 ppm.

Пункт 86. Способ по любому из пп.83-85, где неводный растворитель содержит (а) пропиленгликоль или (b) пропиленгликоль и глицерин.

Пункт 87. Способ по любому из пп.83-86, где низкая концентрация кальция для неводного растворителя составляет менее 0,7 ppm.

Пункт 88. Способ по любому из пп.83-87, где раствор фосфолипидов не содержит обнаруживаемый осадок фосфолипидов.

Пункт 89. Способ по любому из пп.67-74, где один или несколько фосфолипидов или неводный растворитель характеризуются характеристической низкой концентрацией кальция.

Пункт 90. Способ по п.89, где характеристическую низкую концентрацию кальция определяют с помощью атомно-абсорбционной спектроскопии.

Пункт 91. Способ по любому из пп.67-74, где низкую концентрацию кальция определяют с помощью атомно-абсорбционной спектроскопии.

Эквиваленты

Хотя в данном документе было описано и проиллюстрировано несколько вариантов осуществления настоящего изобретения, средние специалисты в данной области техники легко предвидят ряд других способов и/или структур для выполнения функции и/или получения результатов и/или одного или нескольких преимуществ, описанных в данном документе, и считается, что каждый из таких вариантов и/или модификаций находится в пределах объема вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе. В общем, специалисты в данной области техники с легкостью поймут, что все параметры, размеры, материалы и конструкции, описанные в данном документе, приведены в качестве примера и что фактические параметры, размеры, материалы и/или конструкции будут зависеть от конкретного применения или применений, в отношении которых используют идеи настоящего изобретения. Специалисты в данной области техники поймут или смогут определить с помощью не более чем обычного эксперимента многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе. Следовательно, следует понимать, что вышеуказанные варианты осуществления представлены только в качестве примера и что в пределах объема приложенной формулы изобретения и ее эквивалентов варианты осуществления настоящего изобретения можно осуществлять на практике отличным образом, чем конкретно описано и заявлено. Варианты осуществления настоящего изобретения направлены на каждый отдельный признак, систему, изделие, материал, набор и/или способ, описанные в данном документе. Кроме того, любая комбинация двух или более таких признаков, систем, изделий, материалов, наборов и/или способов, если такие признаки, системы, изделия, материалы, наборы и/или способы не являются взаимно несовместимыми, включена в объем настоящего изобретения.

Все определения, как определено и используется в данном документе, следует понимать как преобладающие над словарными определениями, определениями в документах, включенных посредством ссылки, и/или обычным значением определенных терминов.

Все ссылки, патенты и патентные заявки, раскрытые в данном документе, включены посредством ссылки в отношении объекта, для которого каждая цитируется, которая в некоторых случаях может охватывать весь документ.

Форму единственного числа при использовании в описании и в формуле изобретения данного документа, если четко не указано иное, следует понимать как означающую "по меньшей мере один".

Фразу "и/или", как используется в данном документе в описании и в формуле изобретения, следует понимать как означающую "или один, или оба" элемента, сочетающихся таким образом, т.е. элемента, которые в некоторых случаях присутствуют вместе, и в других случаях присутствуют раздельно. Множество элементов, перечисленных с использованием "и/или", следует толковать таким же образом, т.е. "один или несколько" элементов, сочетающихся таким образом. Необязательно могут присутствовать другие элементы, отличные от элементов, конкретно определенных под указателем "и/или", независимо от того, связаны ли или не связаны они с такими элементами, которые конкретно определены. Таким образом, в качестве неограничивающего примера ссылка на "А и/или В" при использовании вместе с от-

крытой фразой, такой как "содержащий", может относиться в одном варианте осуществления только к А (необязательно включая элементы, отличные от В); в другом варианте осуществления только к В (необязательно включая элементы, отличные от А); в еще одном варианте осуществления как к А, так и В (необязательно включая другие элементы) и т.д.

Как используется в данном документе в описании и в формуле изобретения, "или" следует понимать как имеющее такое же значение, что и "и/или", как определено выше. Например, при разделении объектов в списке "или" или "и/или" следует понимать как включающие, т.е. включение по меньшей мере одного, но также включающие более одного из ряда или списка элементов и необязательно дополнительные перечисленные объекты. Только термины, четко указывающие иное, такие как "только один из" или "точно один из", или при использовании в формуле изобретения "состоящий из", будут относиться к включению точно одного элемента из ряда или списка элементов. В целом, термин "или", как используется в данном документе, следует интерпретировать только как указывающий исключительные альтернативы (т.е. "один или другой, но не оба"), когда перед ними идут термины исключительности, такие как "любой из двух", "один из", "только один из" или "точно один из". "Состоящий главным образом из" при использовании в формуле изобретения должен иметь его обычное значение, которое используется в области патентного права.

Как используется в данном документе в описании и в формуле изобретения, фраза "по меньшей мере один" в ссылке на список из одного или несколько элементов, следует понимать как означающий по меньшей мере один элемент, выбранный из любого одного или нескольких элементов в списке элементов, но необязательно включая по меньшей мере один из абсолютно всех элементов, конкретно указанных в списке элементов и не исключая любые комбинации элементов в списке элементов. Данное определение также допускает то, что могут присутствовать элементы, отличные от конкретно определенных в списке элементов, к которому относится фраза "по меньшей мере один", независимо от того, связаны ли они или не связаны с такими элементами, которые конкретно определены. Таким образом, в качестве неограничивающего примера "по меньшей мере один из А и В" (или эквивалентно "по меньшей мере один из А или В", или эквивалентно "по меньшей мере один из А и/или В") может относиться в одном варианте осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включая более одного А, причем В отсутствует (и необязательно включая элементы, отличные от В); в другом варианте осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включая более одного В, причем А отсутствует (и необязательно включая элементы, отличные от А); в еще одном варианте осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включая более одного А, и по меньшей мере одному, необязательно включая более одного В (и необязательно включая другие элементы) и т.д.

Следует также понимать, что, если четко не указано иное, в любых способах, заявленных в данном документе, которые включают более одной стадии или шага, порядок стадий или шагов способа необязательно ограничен порядком, в котором перечислены стадии или шаги способа.

В формуле изобретения, а также в описании выше все переходные фразы, такие как "содержащий", "включающий", "несущий", "имеющий", "вмещающий", "предусматривающий", "удерживающий", "состоящий из" и т.п., следует понимать как открытые, т.е. означающие включающий без ограничения. Только переходные фразы "состоящий из" и "состоящий главным образом из" будут представлять собой соответственно закрытые или полузакрытые переходные фразы, как изложено в разделе 2111.03 Руководства по проведению патентной экспертизы Бюро патентов США.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения раствора фосфолипидов, пригодного для получения суспензии фосфолипидов, включающий

объединение 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидной кислоты (DPPA), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолина (DPPC) и N-(метоксиполиэтиленгликоль-5000-карбамоил)-1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтаноламина (MPEG5000-DPPE) в пропиленгликоле и/или глицерине;

(a) в присутствии ни одного, одного или двух, но не всех трех из метанола, толуола, метил-трет-бутилового эфира (MTBE), причем MPEG5000-DPPE имеет концентрацию кальция и/или магния менее чем 115 частей на миллион (ppm); или

(b) MPEG5000-DPPE, выбранном с концентрацией ионов кальция и/или магния менее чем 115 частей на миллион (ppm), с образованием раствора фосфолипидов, имеющего концентрацию кальция и/или магния менее чем 0,7 частей на миллион (ppm).

2. Способ по п.1, в котором DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE представлены в отношении в мол.%, составляющем 5-15% к 77-90% к 5-15%.

3. Способ по п.1, в котором DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE представлены в отношении в мол.%, составляющем 10% к 82% к 8% (10:82:8).

4. Способ по любому из пп.1-3, в котором концентрация кальция и/или магния для DPPA составляет менее 780 ppm, а концентрация кальция и/или магния для DPPC составляет менее 90 ppm.

5. Способ по любому из пп.1-4, в котором DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE объединены в пропиленгликоле и глицерине.

6. Способ по любому из пп.1-5, в котором концентрация кальция и/или магния представляет собой общую концентрацию кальция и магния.

7. Способ по любому из пп.1-5, в котором концентрация кальция и/или магния представляет собой концентрацию кальция.

8. Способ по любому из пп.1-7, дополнительно включающий объединение раствора фосфолипидов с водным растворителем с образованием суспензии фосфолипидов, пригодной для получения липидных микросфер с инкапсулированным газом.

9. Способ по п.8, дополнительно включающий помещение суспензии фосфолипидов в контейнер.

10. Способ по п.9, дополнительно включающий введение газообразного перфторуглерода в контейнер.

11. Способ по п.9, в котором контейнер содержит газообразный перфторуглерод.

12. Способ по п.10 или 11, дополнительно включающий активацию суспензии фосфолипидов с газообразным перфторуглеродом с образованием липидных микросфер с инкапсулированным газом.

13. Способ по любому из пп.10-12, в котором газообразный перфторуглерод представляет собой газообразный перфторпропан.

14. Способ получения липидных микросфер с инкапсулированным газом, включающий активацию суспензии фосфолипидов, полученной способом по п.8, в присутствии газообразного перфторуглерода с образованием липидных микросфер с инкапсулированным газом.

15. Способ по п.14, в котором газообразный перфторуглерод представляет собой газообразный перфторпропан.

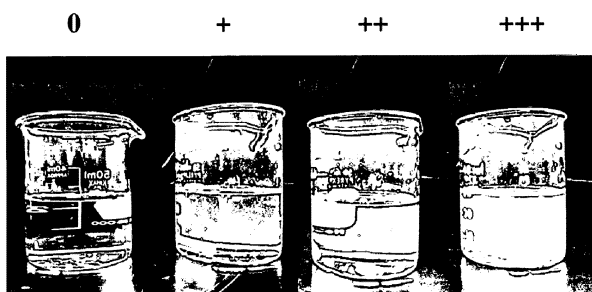
16. Способ по п.1, в котором на стадии (а) DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE по отдельности объединяют с пропиленгликолем и/или глицерином, при этом DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE необязательно находятся в твердой форме до объединения с пропиленгликолем и/или глицерином.

17. Способ по п.1, в котором на стадии (а) DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE растворяют в системе смешанных растворителей, концентрируют до твердого вещества путем высушивания, а затем объединяют с пропиленгликолем и/или глицерином, при этом система смешанных растворителей необязательно содержит метанол и/или толуол, и где сушка необязательно представляет собой лиофилизацию.

18. Способ по п.1, в котором на стадии (а) DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE растворяют в первой системе смешанных растворителей, включающей по меньшей мере один из диэтилового эфира, хлороформа (CHCl_3), этанола, дихлорметана (метилдихлорид, CH_2Cl_2), гексана, петролейного эфира, циклогексана и третичного бутанола (трет-бутанол или 1,1-диметилэтанол), где, необязательно, первая система смешанных растворителей включает хлороформ/метанол, или дихлорметан/метанол, или этанол/циклогексан, затем сушат или осаждают второй системой смешанных растворителей, где, необязательно, вторая система смешанных растворителей включает МТВЕ, а затем объединяют с пропиленгликолем и/или глицерином.

19. Способ по п.1, в котором на стадии (а) DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE смешивают с использованием метода водной суспензии-лиофилизации, а затем объединяют с пропиленгликолем и/или глицерином.

20. Способ по п.1, в котором на стадии (а) DPPA, DPPC и MPEG5000-DPPE объединяют в сухой форме и тщательно перемешивают с образованием однородной смеси, а затем объединяют с пропиленгликолем и/или глицерином.



Фиг. 1

PG PG + DPPC PG + DPPC + MPEG5000 DPPE PG + DPPC + MPEG5000 DPPE + DPPA PG + DPPC + MPEG5000 DPPE + DPPA + 11,1 мкг Ca²⁺/г



Фиг. 2

Концентрация Ca²⁺ (мкг/г концентрата липидов)

0 1,2 1,8 2,3 2,9 5,7



0 0 + + ++ ++

Оценка прозрачности

Фиг. 3

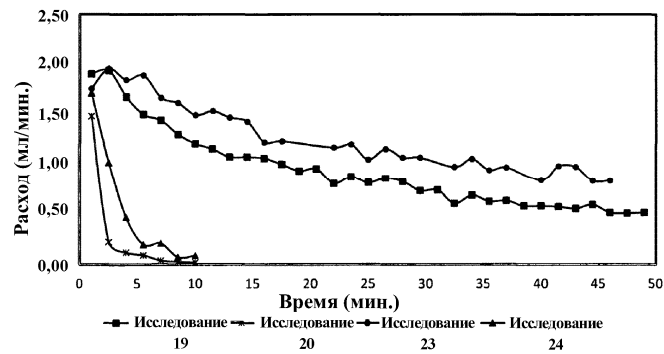
Отношение MPEG5000 DPPE к содержащему Ca²⁺
MPEG5000 DPPE

100:0 75:25 50:50 25:75 0:100

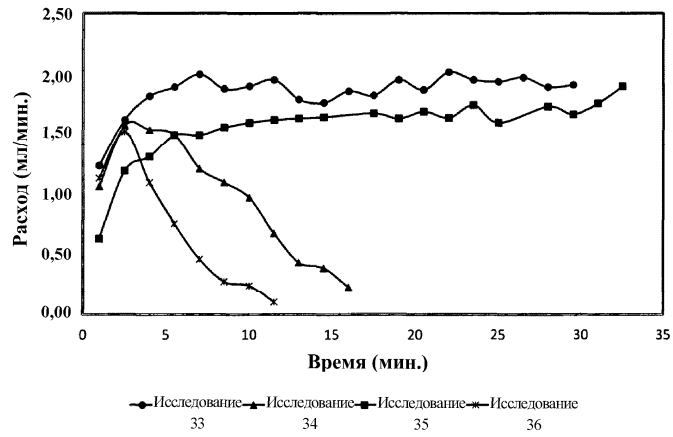


мкг Ca²⁺/г: 0,1 0,7 1,3 1,9 3,1
мкг Mg²⁺/г: 0 0,1 0,3 0,4 0,6

Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

