

(11) Número de Publicação: **PT 1588699 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 9/127 (2007.10) **A61K 49/00** (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **1995.07.26**

(30) Prioridade(s): **1994.09.16 US 307305**

(43) Data de publicação do pedido: **2005.10.26**

(45) Data e BPI da concessão: **2009.10.14**
012/2010

(73) Titular(es):

LANTHEUS MEDICAL IMAGING, INC.
331 TREBLE COVE ROAD NORTH BILLERICA,
MA 01862 **US**

(72) Inventor(es):

EVAN C. UNGER **US**
DAVID YELLOWHAIR **US**
TERRY O. MATSUNAGA **US**

(74) Mandatário:

MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA
RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **LIPOSSOMAS CHEIOS COM GÁS COMPREENDENDO UM GÁS INSOLÚVEL EM COMBINAÇÃO COM UM GÁS SOLÚVEL**

(57) Resumo:

RESUMO

"LIPOSSOMAS CHEIOS COM GÁS COMPREENDENDO UM GÁS INSOLÚVEL EM COMBINAÇÃO COM UM GÁS SOLÚVEL"

É divulgado um recipiente compreendendo uma suspensão lipídica aquosa e uma fase gasosa substancialmente separada da fase estabilizadora aquosa, útil em imagiologia de diagnóstico, como imagiologia por ultra-sons e por ressonância magnética, e em aplicações terapêuticas.

DESCRIÇÃO

"LIPOSSOMAS CHEIOS COM GÁS COMPREENDENDO UM GÁS INSOLÚVEL EM COMBINAÇÃO COM UM GÁS SOLÚVEL"

Os ultra-sons são uma técnica de imagiologia de diagnóstico que proporciona algumas vantagens significativas relativamente a outras metodologias de diagnóstico. Ao contrário de técnicas de imagiologia como medicina nuclear e raios X, os ultra-sons não expõem o paciente aos efeitos nocivos da radiação ionizante. Além disso, os ultra-sons são relativamente baratos e podem ser conduzidos na forma de um exame portátil.

Na imagiologia por ultra-sons, o som é transmitido para o interior de um paciente ou animal via um transdutor. Quando as ondas sonoras se propagam pelo corpo encontram interfaces de tecidos e fluidos. Dependendo das propriedades acústicas dos tecidos e fluidos do corpo, as ondas sonoras de ultra-sons são parcial ou totalmente reflectidas ou absorvidas. Quando as ondas sonoras são reflectidas por uma interface, são detectadas pelo receptor do transdutor e processadas para formar uma imagem. As propriedades acústicas dos tecidos e fluidos no interior do corpo determinam o contraste que aparece na imagem resultante.

A imagiologia por ressonância magnética (MRI) é uma técnica de imagiologia relativamente nova que, ao contrário dos raios X, não emprega radiação ionizante. Tal como a tomografia computadorizada, a MRI consegue formar imagens da secção transversal do corpo; todavia, a MRI tem a vantagem adicional de ser capaz de formar imagens em qualquer plano de varrimento (isto é, axial, coronal, sagital ou ortogonal).

A MRI emprega um campo magnético, energia de radiofrequência e gradientes do campo magnético para formar imagens do corpo. As diferenças de contraste ou intensidade do sinal entre tecidos reflectem principalmente os valores de relaxação T1 e T2 e a densidade de prótons (efectivamente, o teor de água livre) dos tecidos.

Em anos recentes foram feitos progressos na tecnologia de diagnóstico por ultra-sons e MRI. No entanto, apesar dos vários aperfeiçoamentos tecnológicos, os ultra-sons e a MRI ainda são ferramentas imperfeitas nalguns aspectos, particularmente no que se refere à imagiologia e detecção de doença no fígado e baço, rins, coração e rede vascular, incluindo a medição do fluxo sanguíneo. A capacidade para detectar estas regiões e fazer essas medições depende da diferença das propriedades acústicas (ultra-sons) ou intensidade do sinal T1 e T2 (MRI) entre tecidos ou fluidos e os tecidos ou fluidos envolventes. Em conformidade, têm sido procurados agentes de contraste que aumentem estas diferenças entre tecidos ou fluidos e os tecidos ou fluidos envolventes e que melhorem a imagiologia e detecção de doença por ultra-sons ou ressonância magnética. Devido a este esforço têm sido desenvolvidos novos e melhores agentes de contraste. Ainda assim, um problema recorrente associado a muitos desses agentes de contraste tem sido a estabilidade por armazenamento, o que transforma o armazenamento de longo prazo num problema.

RESUMO DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona um lipossoma cheio com gás como descrito nas reivindicações adjuntas. Também é divulgado aqui um recipiente que compreende (i) uma fase de suspensão lipídica aquosa e (ii) uma fase gasosa

substancialmente separada da fase de suspensão lipídica aquosa. Antes da utilização, o conteúdo do recipiente pode ser agitado, desse modo produzindo uma composição de lipossomas cheios com gás que tem excelente utilidade como agente de contraste para utilização, por exemplo, em imagiologia ultra-sónica ou por ressonância magnética, bem como em aplicações terapêuticas. A capacidade para preparar o agente de contraste imediatamente antes da utilização evita problemas de estabilidade por armazenamento sentidos com muitos agentes de contraste da técnica anterior. A unidade autónoma também permite uma esterilização fácil.

Estes e outros aspectos e vantagens são discutidos mais pormenorizadamente abaixo.

DESCRIÇÃO BREVE DAS FIGURAS

A **FIGURA 1** é uma perspectiva da secção transversal de um recipiente cheio com uma suspensão aquosa de lípidos e uma secção de topo substancialmente separada de gás.

A **FIGURA 2** é um diagrama de um dispositivo de agitação que pode ser empregue para agitar o recipiente da Figura 1, desse modo misturando a suspensão lipídica aquosa e o gás e produzindo um agente de contraste para imagiologia ultra-sónica ou por ressonância magnética.

A **FIGURA 3** é uma fotomicrografia de lipossomas cheios com gás produzidos utilizando o recipiente apresentado na Figura 1 e o dispositivo de agitação apresentado na Figura 2.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

O lipossoma cheio com gás da presente invenção é descrito na reivindicação 1. Formas de realização preferidas são apresentadas nas reivindicações dependentes.

O recipiente compreende uma fase de suspensão lipídica aquosa e uma fase gasosa substancialmente separada. Antes da utilização, o recipiente e o seu conteúdo podem ser agitados fazendo com que as fases lipídica e gasosa se misturem, originando a formação de lipossomas cheios com gás que encerram o gás. Os lipossomas resultantes cheios com gás proporcionam um excelente agente de intensificação do contraste para imagiologia de diagnóstico, particularmente usando imagiologia por ultra-sons ou ressonância magnética.

Uma grande variedade de lípidos pode ser empregue na fase de suspensão lipídica aquosa. Os lípidos podem ser saturados ou insaturados e podem estar em forma linear ou ramificada, consoante o desejado. Esses lípidos podem compreender, por exemplo, moléculas de ácidos gordos que contêm uma gama larga de átomos de carbono, preferivelmente entre cerca de 12 átomos de carbono e cerca de 22 átomos de carbono. Também podem ser empregues grupos hidrocarbonados consistindo em unidades isoprenóides, grupos prenilo e/ou fracções esterol (por exemplo, colesterol, sulfato de colesterol e seus análogos). Os lípidos também podem conter cadeias poliméricas, como os polímeros anfipáticos polietilenoglicol (PEG) ou polivinilpirrolidona (PVP) ou seus derivados (para abordagem selectiva *in vivo*), ou aminoácidos com carga, como polilisina ou poliarginina (para ligação de um composto de carga negativa), ou hidratos de carbono (para abordagem selectiva *in vivo*), como descrito na Patente U.S. N° 4,310,505, ou glicolípidos (para abordagem selectiva *in vivo*), ou anticorpos e outros péptidos e proteínas (para abordagem selectiva *in vivo*),

etc., consoante o desejado. Esses compostos de abordagem selectiva ou ligação podem ser simplesmente adicionados à fase de suspensão lipídica aquosa ou podem ser acoplados especificamente de forma química aos lípidos. Os lípidos também podem ser lípidos aniónicos ou catiónicos, se desejado, de modo a poderem ser eles próprios capazes de se ligar a outros compostos, como agentes farmacêuticos, material genético ou outros agentes terapêuticos.

Exemplos de classes de lípidos adequados e de lípidos específicos adequados incluem: fosfatidilcolinas, tais como dioleoílfosfatidilcolina, dimiristoílfosfatidilcolina, dipalmitoílfosfatidilcolina (DPPC) e distearoílfosfatidilcolina; fosfatidiletanolaminas, tais como dipalmitoílfosfatidiletanolamina (DPPE), dioleoílfosfatidiletanolamina e N-succinil-dioleoílfosfatidiletanolamina; fosfatidilserinas; fosfatidilgliceróis; esfingolípido; glicolípido, tais como gangliósido GM1; glucolípido; sulfatídeos; glicoesfingolípido; ácidos fosfatídicos, tais como ácido dipalmitoílfosfatídico (DPPA); ácidos gordos palmíticos; ácidos gordos esteáricos; ácidos gordos araquidónicos; ácidos gordos láuricos; ácidos gordos mirísticos; ácidos gordos lauroleicos; ácidos gordos fisetéricos; ácidos gordos miristoleicos; ácidos gordos palmitoleicos; ácidos gordos petroselinicos; ácidos gordos oleicos; ácidos gordos isoláuricos; ácidos gordos isomirísticos; ácidos gordos isopalmíticos; ácidos gordos isoesteáricos; colesterol e derivados do colesterol, tais como hemissuccinato de colesterol, sulfato de colesterol, e butanoato de colesteril-(4'-trimetilamónio); ésteres de ácidos gordos de polioxietileno; álcoois de ácidos gordos de polioxietileno; éteres de álcoois de ácidos gordos de polioxietileno; ésteres de ácidos gordos de sorbitano polioxietilados; oxiestearato de glicerol e polietilenoglicol; ricinoleato

de glicerol e polietilenoglicol; esteróis de soja etoxilados; óleo de rícino etoxilado; polímeros de ácidos gordos de polioxietileno-polioxipropileno; estearatos de ácidos gordos de polioxietileno; ácido 12-(((7'-dietilaminocumarin-3-il)carbonil)metilamino)octadecanóico; ácido N-[12-(((7'-dietilaminocumarin-3-il)carbonil)metilamino)octadecanoí]l]-2-aminopalmítico; 1,2-dioleoí]l-sn-glicerol; 1,2-dipalmitoí]l-sn-3-succinilglicerol; 1,3-dipalmitoí]l-2-succinilglicerol, e 1-hexadecil-2-palmitoí]lglicerofosfoetanolamina e palmitoí]l-homocisteína; brometo de lauril-trimetilamónio (lauril- = dodecil-); brometo de cetil-trimetilamónio (cetril- = hexadecil-); brometo de miristil-trimetilamónio (miristil- = tetradecil-); cloretos de alquildimetilbenzilamónio, tais como em que alquilo é um C₁₂, C₁₄ ou C₁₆ alquilo; brometo de benzildimetildodecilamónio; cloreto de benzildimetildodecilamónio, brometo de benzildimetil-hexadecilamónio; cloreto de benzildimetil-hexadecilamónio; brometo de benzildimetiltetradecilamónio; cloreto de benzildimetiltetradecilamónio; brometo de cetildimetiletetilamónio; cloreto de cetildimetiletetilamónio; brometo de cetilpiridínio; cloreto de cetilpiridínio; cloreto de N-[1,2,3-dioleoí]loxi)-propil]-N,N,N-trimetilamónio (DOTMA); 1,2-dioleoí]loxi-3-(trimetilamónio)propano (DOTAP), e 1,2-dioleoí]l-e-(4'-trimetilamónio)butanoí]l-sn-glicerol (DOTB).

Como será claro para os profissionais, depois de equipados com as presentes divulgações, a lista anterior de lípidos é apenas exemplificativa, e podem ser empregues outros lípidos, ácidos gordos e derivados úteis e suas combinações, e também se pretende que esses compostos adicionais estejam abrangidos pelo termo lípido, tal como é usado aqui. Como será reconhecido pelo profissional, esses lípidos e/ou suas combinações, por agitação do recipiente,

podem formar lipossomas (isto é, esferas lipídicas com um espaço vazio interno) que encerram gás da fase aquosa no seu espaço vazio interno. Os lipossomas podem ser compreendidos por uma única camada lipídica (uma monocamada lipídica), duas camadas lipídicas (uma bicamada lipídica) ou mais do que duas camadas lipídicas (uma multicamada lipídica).

Como consideração geral, é preferido que os lípidos permaneçam no estado de gel, isto é, inferior à temperatura de transição de fase do estado de gel para o estado cristalino líquido (T_m) do material lipídico, particularmente durante a agitação. As temperaturas de transição de fase do estado de gel para o estado cristalino líquido de vários lípidos são bem conhecidas. Essas temperaturas também podem ser facilmente calculadas usando técnicas bem conhecidas. A Tabela 1 abaixo, de Derek Marsh, "CRC Handbook of Lipid Bilayers", página 139, CRC Press, Boca Raton, Florida (1990), apresenta, por exemplo, as temperaturas de transição de fase da cadeia principal para uma variedade de lípidos fosfocolina saturados representativos.

TABELA 1

Diacil-sn-Glicero-(3)-Fosfocolinas Saturadas: Transições de Fusão da Cadeia Principal	
# Carbonos em Cadeias Acilo	Temperatura de Transição de Fase Principal °C
1,2-(12:0)	-1,0
1,2-(13:0)	13,7
1,2-(14:0)	23,5
1,2-(15:0)	34,5
1,2-(16:0)	41,4

Diacil-sn-Glicero-(3)-Fosfocolinas Saturadas: Transições de Fusão da Cadeia Principal	
# Carbonos em Cadeias Acilo	Temperatura de Transição de Fase Principal °C
1,2-(17:0)	48,2
1,2-(18:0)	55,1
1,2-(19:0)	61,8
1,2-(20:0)	64,5
1,2-(21:0)	71,1
1,2-(22:0)	74,0
1,2-(23:0)	79,5
1,2-(24:0)	80,1

Numa forma de realização preferida da invenção, a fase lipídica aquosa também compreende um polímero, preferivelmente um polímero anfipático e preferivelmente um que esteja directamente ligado (isto é, quimicamente acoplado) ao lípido. Preferivelmente, o polímero anfipático é polietilenoglicol ou seu derivado. A combinação mais preferida é o lípido dipalmitoílfosfatidiletanolamina (DPPE) ligado a polietilenoglicol (PEG), especialmente PEG com um peso molecular médio de cerca de 5000 (DPPE-PEG5000). O PEG ou outro polímero pode estar ligado ao DPPE ou outro lípido por uma ligação covalente, tal como através de uma ligação amida, carbamato ou amina. Alternativamente, ligações éster, éter, tioéster, tioamida ou dissulfureto (tioéster) podem ser utilizadas com o PEG ou outro polímero para ligar o polímero, por exemplo, a colesterol ou outros fosfolípidos. Uma combinação de lípidos particularmente preferida é DPPC, DPPE-PEG5000 e DPPA, especialmente numa razão de cerca de 82%:8%:10% (% molar) de DPPC:DPPE-PEG5000:DPPA.

Para preparar a fase aquosa, o lípido pode ser combinado com água (preferivelmente água destilada), solução salina normal (fisiológica), solução salina tamponada com fosfato ou outra solução de base aquosa, como será claro para os profissionais.

Uma grande variedade de diferentes gases pode ser empregue na fase gasosa da presente invenção. De preferência, os gases são substancialmente insolúveis na fase de suspensão lipídica aquosa. Por substancialmente insolúvel pretende-se significar que o gás mantém uma solubilidade em água a 20°C e 1 atmosfera de pressão igual ou inferior a cerca de 18 mL de gás por kg de água. Como tal, gases substancialmente insolúveis têm uma solubilidade que é inferior à solubilidade do azoto gasoso. Preferivelmente, a solubilidade é igual ou inferior a cerca de 15 mL de gás por kg de água, mais preferivelmente igual ou inferior a cerca de 10 mL de gás por kg de água, a 20°C e 1 atmosfera de pressão. Numa classe preferível de gases, a solubilidade situa-se entre cerca de 0,001 e cerca de 18 mL de gás por kg de água, ou entre cerca de 0,01 e cerca de 15 mL de gás por kg de água, ou entre cerca de 0,1 e cerca de 10 mg de gás por kg de água, ou entre cerca de 1 e cerca de 8 mg de gás por kg de água, ou entre cerca de 2 e 6 mL por kg de água, à temperatura e pressão acima mencionadas. Os gases perfluorocarbonados e o gás fluorado hexafluoreto de enxofre são, por exemplo, menos solúveis do que 10 mL de gás por kg de água, a 20°C e 1 atmosfera de pressão, e assim são preferidos. Os gases que não são substancialmente insolúveis, como definido aqui, são referidos como gases solúveis.

Outros gases adequados substancialmente insolúveis ou solúveis incluem, mas não se limitam a estes, hexafluoroacetona, isopropilacetileno, aleno, tetrafluoro-

aleno, trifluoreto de boro, 1,2-butadieno, 1,3-butadieno, 1,2,3-triclorobutadieno, 2-fluoro-1,3-butadieno, 2-metil-1,3-butadieno, hexafluoro-1,3-butadieno, butadiino, 1-fluorobutano, 2-metilbutano, decafluorobutano (perfluorobutano), decafluoroisobutano (perfluoroisobutano), 1-buteno, 2-buteno, 2-metil-1-buteno, 3-metil-1-buteno, perfluoro-1-buteno, perfluoro-1-buteno, perfluoro-2-buteno, 4-fenil-3-buteno-2-ona, 2-metil-1-buteno-3-ino, nitrato de butilo, 1-butino, 2-butino, 2-cloro-1,1,1,4,4,4-hexafluorobutino, 3-metil-1-butino, perfluoro-2-butino, 2-bromobutiraldeído, sulfureto de carbonilo, crotononitrilo, ciclobutano, metilciclobutano, octafluorociclobutano (perfluorociclobutano), perfluoroisobutano, 3-clorociclopenteno, ciclopropano, 1,2-dimetilciclopropano, 1,1-dimetilciclopropano, etilciclopropano, metilciclopropano, diacetileno, 3-etil-3-metildiaziridina, 1,1,1-trifluorodiazooetano, dimetilamina, hexafluorodimetilamina, dimetil-etilamina, bis-(dimetilfosfino)amina, 2,3-dimetil-2-norbornano, perfluorodimetilamina, cloreto de dimetil-oxónio, 1,3-dioxolano-2-ona, 1,1,1,1,2-tetrafluoroetano, 1,1,1-trifluoroetano, 1,1,2,2-tetrafluoroetano, 1,1,2-tricloro-1,2,2-trifluoroetano, 1,1-dicloroetano, 1,1-dicloro-1,2,2,2-tetrafluoroetano, 1,2-difluoroetano, 1-cloro-1,1,2,2,2-pentafluoroetano, 2-cloro-1,1-difluoroetano, 1-cloro-1,1,2,2-tetrafluoroetano, 2-cloro-1,1-difluoroetano, cloroetano, cloropentafluoroetano, diclorotrifluoroetano, fluoroetano, nitropentafluoroetano, nitrosopentafluoroetano, perfluoroetano, perfluoro-etilamina, éter de etilvinilo, 1,1-dicloroetileno, 1,1-dicloro-1,2-difluoroetileno, 1,2-difluoroetileno, metano, cloreto de trifluorometanossulfonilo, fluoreto de trifluorometanossulfonilo, (pentafluorotio)trifluorometano, difluoronitrosobromometano, fluorobromometano, fluorocloro-

bromometano, trifluorobromometano, difluoronitroclorometano, dinitroclorometano, fluoroclorometano, trifluoroclorometano, difluoroclorometano, difluorodibromometano, difluorodiclorometano, fluorodiclorometano, difluorometano, iododifluorometano, dissilanometano, fluorometano, trifluoroiiodoiodomethanometano, trifluoronitrometano, trifluoronitrosometano, tetrafluorometano, fluorotriclorometano, trifluorometano, cloreto de trifluorometanossulfenilo, 2-metilbutano, éter de metilo, éter de metilisopropilo, lactato de metilo, nitrito de metilo, sulfureto de metilo, éter de metilvinilo, neopentano, azoto (N_2), óxido nitroso, éster de 2-hidroxitrimetilo do ácido 1,2,3-nonadecanotricarboxílico, 1-noneno-3-ino, oxigénio (O_2), oxigénio 17 ($^{17}O_2$), 1,4-pentadieno, n-pentano, dodecafluoropentano (perfluoropentano), tetradecafluorohexano (perfluorohexano), perfluoroisopentano, perfluoroneopentano, 4-amino-4-metil-2-pentanona, 1-penteno, 2-penteno {cis}, 2-penteno {trans}, 3-bromo-1-penteno, perfluoro-1-penteno, ácido tetracloroftálico, 2,3,6-trimetilpiperidino, propano, 1,1,1,2,2,3-hexafluoropropano, 1,2-epoxipropano, 2,2-difluoropropano, 2-aminopropano, 2-cloropropano, heptafluoro-1-nitropropano, heptafluoro-1-nitrosopropano, perfluoropropano, propeno, 1,1,1,2,3,3-hexafluoro-2,3-dicloropropilo, 1-cloropropileno, cloro{trans}propileno, 2-cloropropileno, 3-fluoropropileno, perfluoropropileno, propino, 3,3,3-trifluoropropino, 3-fluoroestireno, hexafluoreto de enxofre, (di)-decafluoroenxofre (S_2F_{10}), 2,4-diaminotolueno, trifluoroacetoneitrilo, peróxido de trifluorometilo, sulfureto de trifluorometilo, hexafluoreto de tungsténio, vinilacetileno, éter de vinilo, néon, hélio, cripton, xénon (especialmente xénon gasoso hiperpolarizado enriquecido em rubídio), dióxido de carbono, hélio e ar. São preferidos gases fluorados (isto

é, um gás que contém uma ou mais moléculas de flúor, como hexafluoreto de enxofre), gases fluorocarbonados (isto é, um gás fluorado que é um carboneto ou gás fluorado) e gases perfluorocarbonados (isto é, um gás fluorocarbonado que está totalmente fluorado, como perfluoropropano e perfluorobutano).

Apesar de virtualmente qualquer gás poder ser teoricamente empregue nas fases gasosas divulgadas aqui da presente invenção, pode ser escolhido um gás particular para otimizar as propriedades desejadas do meio de contraste resultante e para servir a aplicação de diagnóstico particular. Verificou-se, por exemplo, que certos gases formam lipossomas cheios com gás mais estáveis por agitação do que outros gases, e esses gases são preferidos. Também se verificou que certos gases proporcionam melhores resultados de imagiologia em imagiologia de diagnóstico, como ultra-sons ou MRI.

Como exemplo da estabilidade crescente dos lipossomas cheios com gás, verificou-se: dióxido de carbono < oxigénio < ar < azoto < néon = hélio < gases perfluorocarbonados. Por estes e por outros motivos são preferidos gases fluorados, particularmente gases perfluorocarbonados.

Além disso, apesar de nalguns casos gases solúveis funcionarem adequadamente como fase gasosa, os gases substancialmente insolúveis tendem a originar maior estabilidade do que gases com maior solubilidade, particularmente por criação do agente de contraste por agitação. Além disso, será mais fácil manter uma fase gasosa com esses gases insolúveis substancialmente separados da fase lipídica aquosa antes da agitação. Assim, são preferidos gases substancialmente insolúveis como definido anteriormente.

A qualidade das imagens de ultra-sons e a duração dessas imagens também estão correlacionadas com a solubilidade do gás no meio aquoso. Em geral, o decréscimo da solubilidade do gás oferece uma imagem melhor resolvida com maior duração por ultra-sons.

Adicionalmente, foi geralmente observado que a dimensão de lipossomas cheios com gás produzidos por agitação está correlacionada com a solubilidade do gás no meio aquoso, em que os gases de maior solubilidade originam lipossomas maiores cheios com gás. Também se crê que a dimensão dos lipossomas pode ser influenciada pela interacção do gás com a parede interna dos lipossomas. Especificamente, crê-se que a interacção na interface afecta a tensão e, em consequência, a força para fora do gás interior na parede lipídica interna do lipossoma. Um decréscimo da tensão permite a formação de lipossomas menores por decréscimo da força exercida pelo gás interior, desse modo permitindo que a força exercida no exterior do lipossoma pelo meio aquoso contraia o lipossoma cheio com gás.

A solubilidade de gases em solventes aquosos pode ser estimada usando a Lei de Henry, pois é geralmente aplicável a pressões até cerca de 1 atmosfera de pressão e para gases ligeiramente solúveis (Daniels, F. e Alberty, R.A., "Physical Chemistry", 3ª Edição, Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque, 1966). Como exemplo, o ar atmosférico tem uma solubilidade de 18,68 mL em 1 kg de água a 25°C, o azoto mantém uma solubilidade de aproximadamente 18,8 mL kg⁻¹ a 25°C. O hexafluoreto de enxofre, por outro lado, tem uma solubilidade de aproximadamente 5,4 mL kg⁻¹ a 25°C.

Em resumo, os gases fluorados, gases fluorocarbonados e gases perfluorocarbonados são preferidos por motivos de estabilidade, insolubilidade e dimensão resultante dos

lipossomas. São particularmente preferidos o gás fluorado hexafluoreto de enxofre e os gases perfluorocarbonados perfluoropropano, perfluorobutano, perfluorociclobutano, perfluorometano, perfluoroetano e perfluoropentano, especialmente perfluoropropano e perfluorobutano.

Deve notar-se que perfluorocarbonetos com menos de cinco átomos de carbono são gases à temperatura ambiente. O perfluoropentano, por exemplo, é um líquido até cerca de 27°C. Acima desta temperatura irá ocupar a secção de topo do recipiente. No entanto, foi demonstrado que o perfluoropentano também pode ser usado para preencher a secção de topo (isto é, o espaço do frasco acima da fase da suspensão lipídica) mesmo à temperatura ambiente. Ao seleccionar um valor definido de perfluoropentano líquido calculado para preencher a secção de topo e adicionar o líquido ao recipiente a baixa temperatura, por exemplo, -20°C, depois evacuar o recipiente (remover efectivamente o ar que ocupa a secção de topo) e depois selar o recipiente, o perfluoropentano irá sofrer uma transição da fase líquida para a fase de vapor a uma temperatura menor do que o seu ponto de ebulição a 1 atmosfera. Assim, à temperatura ambiente, irá ocupar uma parte ou a totalidade da secção de topo com gás. Como será reconhecido pelos profissionais, é possível estimar o decréscimo da temperatura de transição da fase líquida para a fase de vapor usando uma estimativa prática comum. Especificamente, para cada decréscimo da pressão para metade, a temperatura de ebulição irá decrescer cerca de 10°C. Alternativamente, é possível calcular o decréscimo da temperatura em função da pressão decrescida usando relações baseadas na lei dos gases ideais baseada na lei de Boyle. Outro método para preencher a secção de topo com perfluoropentano consiste em evacuar primeiramente a secção de topo e depois preencher a secção

de topo com perfluoropentano gasoso acima de 27°C. Obviamente, este método não se limita apenas ao perfluoropentano, aplica-se a todos os gases perfluorocarbonados bem como a gases em geral, desde que o ponto de ebulição do gás seja conhecido.

Se desejado, podem ser utilizados dois ou mais gases diferentes para preencher a secção de topo. Uma mistura de gases poderá ter algumas vantagens numa grande variedade de aplicações dos lipossomas resultantes cheios com gás (como aplicações em imagiologia por ultra-sons, imagiologia por MR, etc.). Verificou-se que uma pequena quantidade de um gás substancialmente insolúvel pode ser misturada com um gás solúvel para proporcionar maior estabilidade do que seria esperado da combinação. Por exemplo, uma pequena quantidade de gás perfluorocarbonado (em geral pelo menos cerca de 1% molar, por exemplo) pode ser misturada com ar, azoto, oxigénio, dióxido de carbono ou outros gases mais solúveis. O agente de contraste resultante de lipossomas cheios com gás produzido pós-agitação pode então ser mais estável do que o ar, azoto, oxigénio, dióxido de carbono ou outros gases mais solúveis isoladamente.

Adicionalmente, a utilização de uma mistura de gases pode ser empregue para compensar o aumento do tamanho de lipossomas cheios com gás que de outro modo poderia ocorrer *in vivo* se lipossomas contendo gás perfluorocarbonado puro fossem injectados *in vivo*. Verificou-se que alguns gases perfluorocarbonados podem tender a absorver ou embeber outros gases como oxigénio. Assim, se o gás perfluorocarbonado for injectado intravenosamente, poderá captar o oxigénio ou outros gases solúveis dissolvidos no sangue em circulação. As bolhas resultantes podem então crescer *in vivo* devido a esta captação. Dotado do conhecimento deste fenómeno, é então possível pré-misturar

o gás perfluorocarbonado com um gás solúvel, como ar, azoto, oxigénio, dióxido de carbono, desse modo saturando o perfluorocarboneto das suas propriedades de absorção ou imbibição. Consequentemente, isto irá retardar ou mesmo eliminar o potencial de expansão dos lipossomas cheios com gás na corrente sanguínea. Isto é importante à luz do facto seguinte: se um lipossoma crescer para uma dimensão maior do que 10 μM poderão ocorrer eventos embólicos potencialmente perigosos se for administrado na corrente sanguínea. Ao preencher a secção de topo com mais gases solúveis do que gás perfluorocarbonado, juntamente com o gás perfluorocarbonado, os lipossomas cheios com gás geralmente não sofrerão este aumento de tamanho após injeção *in vivo*. Assim, devido à presente invenção, o problema de eventos embólicos resultante da expansão dos lipossomas pode ser ultrapassado por produção de lipossomas nos quais essa expansão é eliminada ou suficientemente retardada.

Assim, de acordo com a presente invenção, um gás substancialmente insolúvel pode ser combinado com um gás solúvel para produzir de modo eficiente lipossomas cheios com gás altamente eficazes e estáveis.

A Tabela 2 abaixo apresenta uma análise de amostras de lipossomas cheios com gás preparados utilizando percentagens variáveis do gás substancialmente insolúvel perfluoropropano (PFP) e ar como gases da secção de topo. Os gases foram combinados com uma fase aquosa lipídica por agitação durante 60 segundos a 3300 RPM. Utilizou-se um Dimensionador Óptico de Partículas ("Optical Particle Sizer") (Particle Sizing Systems, Santa Barbara, CA) para analisar a dimensão e contagens totais dos lipossomas cheios com gás. Para cada análise utilizou-se um volume de

amostra de 5 microlitros, com quatro amostras utilizadas para cada determinação.

Como mostrado na Tabela 2, mesmo quando apenas 20% do gás foi PFP (um gás substancialmente insolúvel) e 80% do gás foi ar (uma mistura de gases solúveis), foram produzidos 100 vezes mais lipossomas do que quando foi utilizado ar isoladamente (0% PFP). Além disso, quando foi utilizado ar isoladamente (0% PFP), os lipossomas foram muito menos estáveis e uma fracção maior estava acima dos 10 micrones. No entanto, os lipossomas com 20% de PFP e 80% de ar aparentaram ser tão estáveis como os lipossomas com 80% de PFP e 20% de ar, bem como as outras amostras de concentrações intermédias de PFP, e a composição de 20% de PFP com 80% de ar produziu aproximadamente o mesmo número de lipossomas cheios com gás da composição de 80% de PFP com 20% de ar.

TABELA 2

Efeito da Percentagem de Perfluoropropano na Dimensão e Número de Bolhas						
% PFP Gasoso	Número Média Ponderada	Volume Média Ponderada	Número Estimado de Partículas	Percentagem de Partículas <10 µm	# Estimado de Partículas por mL	Percentagem de Partículas >10 µm
80 %						
Média	2,37	28,76	5,45E+05	98,94	1,10E+09	1,05
DP	0,07	0,82	4,67E+04	0,08	8,20E+07	0,07
CV	3%	3%	9%	0%	7%	7%
60 %						
Média	2,14	20,75	5,87E+05	99,36	1,15E+09	0,64
DP	0,02	5,93	7,08E+04	0,10	1,27E+08	0,09
CV	1%	29%	12%	0%	11%	14%
50 %						
Média	2,13	30,35	5,23E+05	99,29	1,07E+09	0,68
DP	0,07	12,15	1,49E+04	0,11	4,37E+07	0,10

Efeito da Percentagem de Perfluoropropano na Dimensão e Número de Bolhas						
% PFP Gasoso	Número Média Ponderada	Volume Média Ponderada	Número Estimado de Partículas	Percentagem de Partículas <10 µm	# Estimado de Partículas por mL	Percentagem de Partículas >10 µm
CV	3%	40%	3%	0%	4%	15%
20%						
Média	2,00	13,64	5,35E+05	99,61	1,07E+09	0,41
DP	0,04	6,79	2,26E+04	0,06	3,92E+07	0,07
CV	2%	50%	4%	0%	4%	16%
0 %						
Média	2,30	93,28	5,03E+03	98,23	1,00E+07	1,93
DP	0,21	66,05	4,96E+02	0,26	8,60E+05	0,36
CV	9%	71%	10%	0%	9%	19%

Na Tabela 2, DP = Desvio Padrão e CV = Coeficiente da Variância. Também na Tabela 2, E+ designa levantado a uma certa potência, por exemplo, 5,45E+05 = $5,45 \times 10^5$.

Em resumo, verificou-se que só é necessária uma pequena quantidade de um gás relativamente insolúvel (como PFP) para estabilizar os lipossomas, em que a grande maioria do gás é um gás solúvel. Apesar da solubilidade efectiva da combinação de dois ou mais gases, calculada pela fórmula abaixo:

$$(\text{solubilidade gás A}) \times (\text{percentagem molar gás A}) + (\text{solubilidade gás B}) \times (\text{percentagem molar gás B})$$

poder ser apenas ligeiramente diferente da solubilidade do gás solúvel, ainda há uma elevada contagem de lipossomas cheios com gás e estabilidade de lipossomas cheios com gás

com apenas uma pequena quantidade de gás insolúvel adicionado.

Apesar de não se pretender ficar limitado a qualquer teoria de funcionamento, crê-se que o gás substancialmente insolúvel é importante para um efeito estabilizador de membranas. De facto, crê-se que o gás substancialmente insolúvel (como PFP) actua como barreira contra a membrana lipídica, sendo possível que forme efectivamente uma camada na superfície interna da membrana que retarda a saída do gás solúvel (como ar, azoto, etc.). Esta descoberta é tão surpreendente quanto útil, pois permite utilizar apenas uma pequena quantidade do gás substancialmente insolúvel (por exemplo, um perfluorocarboneto ou outro gás fluorado) e maioritariamente um gás mais biocompatível (potencialmente menos tóxico), como ar ou azoto, para ocupar a maior parte do volume do lipossoma.

A quantidade de gases substancialmente insolúveis e de gases solúveis em qualquer mistura pode variar amplamente, como será reconhecido pelo profissional. De acordo com a presente invenção, pelo menos 1% da quantidade total do gás é um gás substancialmente insolúvel, muito preferivelmente pelo menos cerca de 10%. As gamas adequadas de gás substancialmente insolúvel variam dependendo de vários factores, como o gás solúvel a ser adicionalmente empregue, o tipo de lípido, a aplicação particular, etc. Gamas exemplificativas incluem entre cerca de 1% e cerca de 99% de gás substancialmente insolúvel, preferivelmente entre cerca de 1% e cerca de 95%, mais preferivelmente entre cerca de 10% e cerca de 90%, e muito preferivelmente entre cerca de 30% e cerca de 85%.

Para outras utilizações para além da imagiologia de diagnóstico por ultra-sons, como utilizações em imagiologia por ressonância magnética (MRI) de diagnóstico, gases

paramagnéticos, como o gás fortemente paramagnético oxigénio 17 ($^{17}\text{O}_2$), néon, xénon (especialmente xénon gasoso hiperpolarizado enriquecido em rubídio) ou oxigénio (que ainda é paramagnético, apesar de menos fortemente), por exemplo, são preferivelmente usados para preencher a secção de topo, apesar de também poderem ser utilizados outros gases. Muito preferivelmente, $^{17}\text{O}_2$ gasoso, néon, xénon gasoso hiperpolarizado enriquecido em rubídio, ou oxigénio gasoso é combinado com um gás substancialmente insolúvel, tal como, por exemplo, um gás perfluorocarbonado. Os gases paramagnéticos são bem conhecidos na área, e gases paramagnéticos adequados ocorrerão facilmente aos profissionais. O gás mais preferido para aplicações de MRI, utilizado isoladamente ou em combinação com outro gás, é $^{17}\text{O}_2$.

Ao utilizar uma combinação de gases, o $^{17}\text{O}_2$ ou outro gás paramagnético proporciona o contraste óptimo, e o perfluorocarboneto estabiliza o $^{17}\text{O}_2$ gasoso no gás encerrado após a agitação. Sem a adição do gás perfluorocarbonado, gases tais como $^{17}\text{O}_2$ são geralmente muito menos eficazes pois, devido à sua solubilidade, difundem-se para fora do confinamento lipídico após injeção intravenosa. Adicionalmente, o $^{17}\text{O}_2$ gasoso é bastante dispendioso. A combinação do gás perfluorocarbonado com o $^{17}\text{O}_2$ gasoso aumenta grandemente a eficácia do produto e diminui os custos por uma utilização mais eficiente do $^{17}\text{O}_2$ gasoso dispendioso. De modo semelhante, outros gases com propriedades paramagnéticas desejáveis, como néon, podem ser misturados com os gases perfluorocarbonados.

Como revelado na Tabela 3 abaixo, uma grande variedade de diferentes gases pode ser utilizada em aplicações de imagiologia por MR. Na Tabela 3 apresenta-se o $R2$ ($1/T2/\text{mmol/L.s}^{-1}$) para diferentes gases em lipossomas

cheios com gás. Como mostrado na Tabela 3, há diferenças dramáticas na relaxividade dos diferentes lipossomas cheios com gás: quanto maiores os valores de relaxação R_2 , mais eficazes são os lipossomas como agentes de imagiologia por MR. Dos gases mostrados, o ar é o que tem o valor R_2 mais elevado. Crê-se que o ar é o mais elevado devido ao efeito paramagnético do oxigénio no ar. No entanto, o oxigénio puro é um pouco menos eficaz, provavelmente devido à maior solubilidade do oxigénio e equilibração do oxigénio no meio aquoso que envolve os lipossomas. Com o ar, o azoto (o ar consiste em cerca de 80% de azoto) ajuda a estabilizar o oxigénio no interior dos lipossomas. O azoto é muito menos solúvel em água do que o ar. Como notado acima, o PFP ou outros gases perfluorocarbonados podem ser misturados com um gás mais activo do ponto de vista magnético, como ar, oxigénio, $^{17}\text{O}_2$ ou xénon hiperpolarizado enriquecido em rubídio. Ao fazê-lo é possível preparar lipossomas estáveis cheios com gás altamente activos do ponto de vista magnético.

TABELA 3

Distribuição de Tamanhos e Relaxividade			
Gás	Distribuição Ponderada em Número (μm)	Distribuição Ponderada em Volume (μm)	R_2
Azoto	$6,96 \pm 0,63$	$31,08 \pm 7,42$	$474,6 \pm 59,9$
Hexafluoreto de Enxofre	$4,31 \pm 0,13$	$44,25 \pm 1,23$	$319,3 \pm 42,5$
Xénon (Rb)	$7,02 \pm 1,19$	$160,90 \pm 92,46$	$191,2 \pm 30,8$
Árgon	$8,14 \pm 0,49$	$41,45 \pm 13,02$	$55,29 \pm 41,3$
Ar	$6,05 \pm 1,05$	$23,28 \pm 0,41$	$1510,4 \pm 0,41$
Perfluoro-propano	$4,24 \pm 0,72$	$49,88 \pm 11,11$	$785 \pm 31,8$

Distribuição de Tamanhos e Relaxividade			
Gás	Distribuição Ponderada em Número (μm)	Distribuição Ponderada em Volume (μm)	R₂
Oxigénio	7,26 $\pm$ 0,98	30,99 $\pm$ 3,90	732,4 $\pm$ 73,9
Néon	7,92 $\pm$ 0,71	26,20 $\pm$ 1,03	595,1 $\pm$ 97,2
Perfluoro-butano	5,88 $\pm$ 0,36	51,25 $\pm$ 3,97	580,1 $\pm$ 45,5

A secção de topo do recipiente pode ser preenchida com o gás à pressão ambiente, uma pressão decrescida ou aumentada, consoante o desejado.

No recipiente divulgado aqui, a fase gasosa está substancialmente separada da fase de suspensão lipídica aquosa. Por substancialmente separado pretende-se significar que menos de cerca de 50% do gás é combinado com a fase lipídica aquosa antes da agitação. Preferivelmente menos de cerca de 40%, mais preferivelmente menos de cerca de 30%, ainda mais preferivelmente menos de cerca de 20% e muito preferivelmente menos de cerca de 10% do gás é combinado com a fase lipídica aquosa. A fase gasosa é mantida substancialmente separada da fase lipídica aquosa até ao instante da utilização, altura em que o recipiente é agitado e a fase gasosa e a fase lipídica aquosa são combinadas para formar uma suspensão aquosa de lipossomas cheios com gás. Deste modo é produzido um excelente agente de contraste para imagiologia ultra-sónica ou por ressonância magnética. Além disso, uma vez que o agente de contraste é preparado imediatamente antes da utilização, os problemas de estabilidade por armazenamento são minimizados.

A agitação pode ser efectuada de uma grande variedade de modos e pode incluir agitação mecânica e/ou manual, bem

como agitação por outros meios, como sonicação (ondas sonoras). É preferida a agitação mecânica e/ou manual. A agitação pode ser efectuada, por exemplo, por agitação, agitação forte, formação de vórtice, vibração, etc. Preferivelmente pode ser empregue um dispositivo de agitação como o ilustrado na Figura 2. Especificamente ilustra-se na Figura 2 um dispositivo de agitação mecânica (10). A agitação pode ser iniciada e cessada utilizando o botão "start-stop" (11). O dispositivo de agitação (10) também compreende uma maçaneta (12) que proporciona um ajustamento variável da velocidade (RPM). Ao rodar a maçaneta (12) no sentido dos ponteiros do relógio obtém-se uma velocidade de agitação aumentada (em RPMs). Inversamente, rodar a maçaneta (12) no sentido contrário aos ponteiros do relógio diminui a velocidade da agitação. O conteúdo de um recipiente pode ser agitado colocando o recipiente no módulo de encaixe (13) do dispositivo de agitação (10). O módulo de encaixe (13) é o meio de agitação do dispositivo de agitação (10). Para que o recipiente fique firmemente no lugar do módulo de encaixe para agitação utiliza-se um parafuso (14).

O recipiente empregue pode ter uma variedade de formas diferentes. Se desejado, pode ser como ilustrado na Figura 1, em que o recipiente (1) tem um corpo (2) e tampa (3), contendo uma secção de topo de gás (4) e uma suspensão aquosa de lípidos (5) substancialmente separadas uma da outra. Alternativamente, o recipiente pode ter a forma de uma seringa pré-cheia que pode ser dotada, se desejado, de um ou mais filtros. Neste caso, as seringas são cheias com uma fase aquosa e uma secção de topo de um gás pré-seleccionado. As seringas são geralmente montadas no dispositivo de agitação com os seus eixos maiores orientados perpendicularmente à direcção da agitação. Após

a agitação, os lipossomas cheios com gás são produzidos na seringa, que então está pronta a usar. Preferivelmente, o recipiente, quer seja um recipiente do tipo mostrado na Figura 1, uma seringa ou outro tipo de recipiente, juntamente com o seu conteúdo, é esterilizado.

Pode ser utilizada uma variedade de diferentes materiais para produzir os recipientes, incluindo as seringas, como vidro, vidro de borossilicato, vidro de silicato, polietileno, polipropileno, politetrafluoroetileno, poliacrilatos, poliestireno ou outros plásticos. Os recipientes preferidos, incluindo seringas, são impermeáveis a gases ou então são envoltos numa barreira externa impermeável a gases externos antes de serem cheios com gás. Obviamente, isto é desejável para manter a integridade do gás pré-seleccionado no interior do recipiente. Exemplos de materiais de seringas com capacidades estanques a gases podem incluir, mas de modo nenhum se limitam a estes, vidro de silicatos ou borossilicatos, equipados com seringas fundidas com sílica ou seringas do tipo Luer-Lock, e êmbolos com pontas de teflon ou revestidos com teflon.

Como será reconhecido pelo profissional, depois de equipado com a matéria da presente divulgação, podem ser empregues vários aditivos na fase de suspensão lipídica aquosa para estabilizar essa fase, ou para estabilizar os lipossomas cheios com gás por agitação. Se desejado, estes aditivos podem ser adicionados à fase lipídica aquosa antes da agitação, ou podem ser adicionados à composição após a agitação e preparação resultante dos lipossomas cheios com gás. A utilização desses aditivos irá obviamente depender da aplicação particular pretendida para os lipossomas resultantes cheios com gás, como será claro para os profissionais.

Estão disponíveis alguns agentes estabilizadores que podem ser empregues na presente invenção, incluindo goma de xantano, acácia, agar, agarose, ácido algínico, alginato, alginato de sódio, carragenano, dextrano, dextrina, gelatina, goma de guar, tragacanto, semente de alfarroba, bassorina, Karaya, goma-arábica, pectina, caseína, bentonite, bentonite não purificada, bentonite purificada, magma de bentonite, coloidal, celulose, celulose (microcristalina), metilcelulose, hidroxietilcelulose, hidroxipropilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, carboximetilcelulose, carboximetilcelulose de cálcio, carboximetilcelulose sódica, carboximetilcelulose de sódio 12, bem como outras celulosas naturais ou naturais modificadas, polissorbato, carbómero 934P, silicato de alumínio e magnésio, monoestearato de alumínio, óxido de polietileno, álcool polivinílico, povidona, polietilenoglicol, propilenoglicol, polivinilpirrolidona, dióxido de silício, dióxido de silício coloidal.

Também podem utilizar-se compostos como brometo de perfluorooctilo (PFOB), iodeto de perfluorooctilo, perfluorotripropilamina e perfluorobutilamina na fase lipídica como agentes estabilizadores. Os perfluorocarbonetos com mais do que cinco átomos de carbono serão geralmente líquidos à temperatura do corpo, e esses perfluorocarbonetos também são altamente preferidos como agentes estabilizadores. Perfluorocarbonetos adequados incluem perfluoro-hexano, perfluoro-heptano, perfluoro-octano, perfluorodecalina e perfluorododecalina. Adicionalmente, lípidos perfluorados ou lípidos parcialmente fluorados também podem ser utilizados para auxiliar a estabilização. Como será claro para os profissionais, pode ser utilizada uma grande variedade de análogos perfluorados e parcialmente fluorados dos lípidos

descritos na presente invenção. Devido à sua natureza hidrófoba relativa no que se refere aos lípidos hidrocarbonados, esses lípidos perfluorados ou parcialmente fluorados podem mesmo proporcionar vantagens em termos de estabilidade. Exemplos de lípidos perfluorados ou parcialmente fluorados são F_6C_{11} fosfatidilcolina (PC) e F_8C_5PC . Esses análogos são descritos, por exemplo, em Santaella *et al.*, *Federation of European Biochemical Societies (FEBS)*, Volume 336, N° 3, páginas 418-484 (1993), cuja divulgação é aqui incorporada por referência na sua totalidade.

Uma grande variedade de óleos biocompatíveis também pode ser utilizada para auxiliar a estabilização, como óleo de amendoim, óleo de canola, azeite, óleo de açafrão, óleo de milho, óleo de amêndoas, óleo de sementes de algodão, óleo de pérsico, óleo de sésamo, óleo de soja, óleo mineral, frações leves de óleo mineral, oleato de etilo, álcool de miristilo, miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, octildodecanol, propilenoglicol, glicerol, esqualeno, ou qualquer outro óleo que se saiba habitualmente que pode ser ingerido. Estes também podem incluir lecitina, esfingomiéline, colesterol, sulfato de colesterol e triglicéridos.

A estabilização também pode ser efectuada adicionando uma grande variedade de modificadores da viscosidade (isto é, agentes modificadores da viscosidade), que podem actuar como agentes estabilizadores de acordo com a presente invenção. Esta classe de compostos inclui, mas de modo nenhum se limita aos seguintes: 1) hidratos de carbono e seus derivados fosforilados e sulfonados; 2) poliéteres com gamas de pesos moleculares entre 400 e 8000; 3) di- e tri-hidroxialcanos e seus polímeros na gama de pesos moleculares entre 800 e 8000. Os lipossomas também podem

ser utilizados em conjunção com agentes emulsionantes e/ou solubilizadores, que podem consistir mas de modo nenhum se limitam a acácia, colesterol, dietanolamina, monoestearato de glicerilo, álcoois de lanolina, lecitina, mono e diglicéridos, monoetanolamina, ácido oleico, álcool oleílico, poloxâmero, estearato de polioxietileno 50, óleo de rícino de polioxilo 35, éter de oleílo de polioxilo 10, éter cetoestearílico de polioxilo 20, estearato de polioxilo 40, polissorbato 20, polissorbato 40, polissorbato 60, polissorbato 80, diacetato de propilenoglicol, monoestearato de propilenoglicol, laurilsulfato de sódio, estearato de sódio, monolaurato de sorbitano, monooleato de sorbitano, monopalmitato de sorbitano, monoestearato de sorbitano, ácido esteárico, trolamina, cera emulsionante, Pluronic F61, Pluronic F64 e Pluronic F68.

Outros agentes que podem ser adicionados incluem agentes de tonicidade, como poliálcoois, como glicerol, propilenoglicol, álcool polivinílico, polietilenoglicol, glucose, manitol, sorbitol, cloreto de sódio e afins.

Se desejado, agentes antibacterianos e/ou conservantes podem ser incluídos na formulação. Esses agentes incluem benzoato de sódio, todos os sais de amónio quaternário, azida de sódio, metilparabeno, propilparabeno, ácido sórbico, sorbato de potássio, sorbato de sódio, palmitato de ascorbilo, hidroxianisolo butilado, hidroxitolueno butilado, clorobutanol, ácido desidroacético, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), monotioglicerol, benzoato de potássio, metabissulfito de potássio, sorbato de potássio, bissulfito de sódio, dióxido de enxofre e sais orgânicos de mercúrio.

Se desejado, pode utilizar-se um agente de osmolaridade para controlar a osmolaridade. Materiais

osmoticamente activos adequados incluem compostos fisiologicamente compatíveis tais como açúcares monossacarídicos, açúcares dissacarídicos, álcoois de açúcares, aminoácidos e vários compostos sintéticos. Açúcares monossacarídicos ou álcoois de açúcares adequados incluem, por exemplo, eritrose, treose, ribose, arabinose, xilose, lixose, alose, altrose, glucose, manose, idose, galactose, talose, trealose, ribulose, frutose, sorbitol, manitol e sedo-heptulose, em que os monossacáridos preferidos são frutose, manose, xilose, arabinose, manitol e sorbitol. Açúcares dissacarídicos adequados incluem, por exemplo, lactose, sucrose, maltose e celobiose. Aminoácidos adequados incluem, por exemplo, glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina, arginina e histidina. Compostos sintéticos incluem, por exemplo, glicerol, propilenoglicol, polipropilenoglicol, etilenoglicol, polietilenoglicol e polivinilpirrolidona. Vários outros materiais osmoticamente activos adequados são bem conhecidos dos profissionais e pretende-se que estejam abrangidos no âmbito do termo agente osmoticamente activo, como utilizado aqui.

Também pode adicionar-se uma variedade de polímeros, como os discutidos acima, para uma variedade de diferentes finalidades e utilizações.

Como será reconhecido pelos profissionais, uma gama larga de quantidades de aditivos, como os agentes de suspensão descritos acima, pode ser empregue na fase de suspensão lipídica aquosa, consoante o necessário ou desejado, dependendo da utilização final particular. Em geral, esses aditivos podem compreender desde 0,01% por volume até cerca de 95% por volume da formulação do agente de contraste resultante, apesar de poderem ser empregues quantidades maiores ou menores. Como directriz geral, um

agente de suspensão está tipicamente presente numa quantidade de pelo menos cerca de 0,5% por volume, mais preferivelmente pelo menos cerca de 1% por volume, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 10% por volume. Em geral, o agente de suspensão está tipicamente presente numa quantidade menor do que cerca de 50% por volume, mais preferivelmente menor do que cerca de 40% por volume, ainda mais preferivelmente menor do que cerca de 30% por volume. Uma quantidade típica de agente de suspensão poderá ser cerca de 20% por volume, por exemplo. Também tipicamente, para se atingirem gamas de osmolaridade geralmente preferidas, são empregues menos de cerca de 25 g/L, mais preferivelmente menos de cerca de 20 g/L, ainda mais preferivelmente menos de cerca de 15 g/L e ainda mais preferivelmente menos de cerca de 10 g/L dos materiais osmoticamente activos, e nalguns casos não são empregues materiais osmoticamente activos. Uma gama muito preferida de materiais osmoticamente activos situa-se geralmente entre cerca de 0,002 g/L e cerca de 10 g/L. Estas e outras gamas adequadas de aditivos serão claras para os profissionais depois de estarem na posse da presente invenção.

Uma grande variedade de agentes terapêuticos e/ou de diagnóstico também pode ser incorporada na fase de suspensão lipídica aquosa simplesmente por adição a essa fase dos agentes terapêuticos ou de diagnóstico desejados. Agentes terapêuticos e de diagnóstico adequados, e suas quantidades adequadas, serão claros para os profissionais depois de equipados com a presente divulgação. Estes agentes podem ser incorporados no interior ou sobre as membranas lipídicas, ou podem ser encapsulados nos lipossomas resultantes.

Para melhorar suplementarmente o efeito magnético dos lipossomas resultantes cheios com gás para MRI pode adicionar-se, por exemplo, um ou mais agentes intensificadores do contraste em MRI, como agentes intensificadores do contraste paramagnéticos ou superparamagnéticos. Agentes intensificadores do contraste para MRI que são úteis incluem iões paramagnéticos, como metais de transição, incluindo ferro (Fe^{+3}), cobre (Cu^{+2}) e manganês (Mn^{+2}), e os lantanídeos, tais como gadolínio (Gd^{+3}) e disprósio (Dy^{+3}), óxidos de azoto, óxidos de ferro (Fe_3O_4), sulfuretos de ferro e partículas paramagnéticas, como hidroxiapatites substituídas com manganês (Mn^{+2}). Também agentes como crómio (Cr^{+3}), níquel (Ni^{+2}), cobalto (Co^{+2}) e európio (Eu^{+2}) são outros exemplos de iões paramagnéticos que podem ser utilizados. Podem utilizar-se outros agentes intensificadores do contraste, como radicais de óxido de azoto ou qualquer outro átomo que mantenha um spin electrónico desemparelhado com propriedades paramagnéticas. Idealmente, o agente intensificador do contraste é adicionado à fase lipídica aquosa antes da agitação e é concebido de modo que, após a agitação, o agente intensificador de contraste é incorporado no interior ou sobre a superfície do lipossoma resultante cheio com gás, apesar de também ser possível a adição após a preparação do lipossoma. O lipossoma resultante cheio com gás pode ter uma relaxividade grandemente aumentada, proporcionando um agente de contraste especialmente eficaz para imagiologia por ressonância magnética. A título exemplificativo, o manganês (Mn^{+2}) irá incorporar-se a si próprio sobre os grupos principais do lípido quando for utilizada fosfatidilcolina ou fosfatidilserina na fase lipídica aquosa. Se desejado, os metais podem ser sujeitos a quelação utilizando compostos lipossolúveis, como

mostrado, por exemplo, em Unger *et al.*, Patente U.S. N° 5,312,617, cuja divulgação é aqui incorporada por referência na sua totalidade. Esses compostos lipossolúveis são bastante úteis, pois serão rapidamente incorporados na membrana do lipossoma. Óxidos de ferro e outras partículas devem ser geralmente pequenas, preferivelmente menores do que cerca de 1 μ , mais preferivelmente menores do que cerca de 200 nm e muito preferivelmente menores do que 100 nm para se obter uma incorporação ótima no interior ou sobre a superfície do lipossoma. Para uma incorporação melhorada podem utilizar-se óxidos de ferro revestidos com compostos alifáticos ou lipófilos, pois estes tenderão a incorporar-se a si próprios no revestimento lipídico da superfície da bolha.

A fase de suspensão lipídica aquosa pode conter um ingrediente para causar gelificação com polímeros lipídicos e metais que não gelificam espontaneamente, ou então, para aumentar a gelificação, podem ser empregues agentes de gelificação tais como catiões metálicos polivalentes, açúcares e poliálcoois. Catiões metálicos polivalentes exemplificativos úteis como agentes de gelificação incluem cálcio, zinco, manganês, ferro e magnésio. Açúcares úteis incluem monossacáridos, como glucose, galactose, frutose, arabinose, alose e altrose, dissacáridos como maltose, sucrose, celobiose e lactose, e polissacáridos, como amido. Preferivelmente, o açúcar é um açúcar simples, isto é, um monossacárido ou um dissacárido. Agentes de gelificação de poliálcoois úteis na presente invenção incluem, por exemplo, glicidol, inositol, manitol, sorbitol, pentaeritritol, galacitol e álcool polivinílico. Muito preferivelmente, o agente de gelificação empregue na presente invenção é sucrose e/ou cálcio. Os agentes de gelificação particulares que podem ser empregues nas várias

formulações da presente invenção serão claros para o profissional depois de equipado com a presente divulgação. Combinações de lípidos, por exemplo, ácido fosfatídico com sais de cálcio ou magnésio, e polímeros, como ácido algínico, ácido hialurónico ou carboximetilcelulose, podem ser utilizados para estabilizar lípidos. Põe-se a hipótese dos catiões divalentes formarem pontes metálicas entre os lípidos e polímeros para estabilizar os lipossomas cheios com gás nos sistemas lipídico/polimérico. De modo semelhante, podem preparar-se suspensões contendo misturas de quitosano (ou materiais à base de quitina), polilisina, polietilenoimina e ácido algínico (ou seus derivados) ou ácido hialurónico.

Verificou-se que a velocidade da agitação, a quantidade dos lípidos que compreendem a fase lipídica aquosa e o tamanho do recipiente vedado podem afectar a dimensão final de qualquer lipossoma cheio com gás. Adicionalmente, verificou-se que as proporções desses agentes também podem ser importantes para a distribuição de tamanhos dos lipossomas cheios com gás. Também se crê que a tensão superficial na interface do lipossoma cheio com gás e o meio aquoso é um factor adicional determinante da dimensão final do lipossoma cheio com gás quando considerado juntamente com a velocidade da agitação, o tamanho do frasco e a concentração de lípidos.

Num recipiente esterilizado cheio com uma fase aquosa e uma secção de topo de gás foi descoberto como podem ser feitas alterações de modo fácil e simples de modo a alterar a dimensão dos lipossomas pós-agitação e, desse modo, obter um produto com lipossomas com a distribuição desejada de tamanhos. Adicionalmente, podem ser utilizados filtros para refinar suplementarmente a distribuição de tamanhos do agente de contraste após a agitação. A seguir apresenta-se

uma revisão de como alterações nos componentes da invenção podem ser usadas para modificar a dimensão dos lipossomas.

Em primeiro lugar, verificou-se que os diferentes materiais da fase aquosa podem ser importantes no controlo do tamanho do lipossoma resultante cheio com gás. A Tabela 4 apresenta os tamanhos de lipossomas produzidos por agitação de recipientes esterilizados cheios com uma fase aquosa e uma secção de topo de azoto. Em todos os casos, o tamanho dos lipossomas foi medido com um dimensionador de partículas por obscurecimento de luz da Particle Sizing Systems Modelo 770 (Particle Sizing Systems, Santa Barbara, CA). Como revelado pelos dados, a razão de lípidos na fase aquosa afecta a distribuição de tamanhos dos lipossomas resultantes cheios com gás. Especificamente, a Tabela 4 abaixo mostra o efeito da composição lipídica na dimensão média dos lipossomas.

TABELA 4

Efeito da Composição Lipídica na Dimensão Média dos Lipossomas	
Composição Lipídica*	Dimensão Média dos Lipossomas
77,5:15:7,5	5,26 µm
77,5:20:2,5	7,33 µm
82:10:8	6,02 µm
* Razões de dipalmitoílfosfatidilcolina:ácido dipalmitoílfosfatídico:dipalmitoílfosfatidiletanolamina-PEG5000, em % molar.	

A Tabela 5 demonstra o efeito da concentração de uma mistura definida de composição lipídica na dimensão média dos lipossomas. Como mostrado na Tabela 5, variações nas concentrações totais de lípidos também são importantes para afectar a dimensão dos lipossomas após a agitação. Nestas

experiências, a razão dos três componentes lipídicos diferentes foi mantida constante e a concentração de lípidos variou entre 0,5 e 5,0 mg mL⁻¹ na fase aquosa. O gás utilizado foi azoto. Foram produzidas bolhas de dimensão óptima para diagnóstico ultra-sónico com uma secção de topo de perfluorobutano quando a concentração de lípidos na fase aquosa foi 1,0 mg mL⁻¹.

TABELA 5

Efeito da Concentração de Lípidos na Dimensão Média dos Lipossomas	
Concentração de Lípidos*	Dimensão Média dos Lipossomas
1 mg mL ⁻¹	1,8 µm
3 mg mL ⁻¹	4,0 µm
5 mg mL ⁻¹	7,2 µm
*A concentração de lípidos para todas as amostras baseou-se numa razão de % molar de dipalmitoílfosfatidilcolina:ácido dipalmitoílfosfatídico:dipalmitoílfosfatidiletanolamina-PEG5000 de 82:10:8. O gás utilizado foi azoto.	

A dimensão dos lipossomas também pode depender da composição do gás na secção de topo, para além da concentração de meios estabilizadores, por exemplo, lípidos. Por exemplo, verificou-se que uma concentração de lípidos de 1,0 mg mL⁻¹ produz lipossomas cheios com gás com diâmetro aproximadamente igual aos produzidos quando se utiliza azoto, tal como com a concentração de 5,0 mg mL⁻¹ de lípidos com perfluorobutano. No entanto, verificou-se que a concentração mais elevada pode originar uma distribuição um pouco mais distorcida para lipossomas maiores cheios com gás. Este fenómeno tende a reflectir a estabilidade aumentada dos lipossomas cheios com gás a uma concentração de lípidos mais elevada. Em consequência, crê-

se que a concentração mais elevada de lípidos contribui para a estabilidade ao actuar como agente estabilizador na fase aquosa, ou então a concentração mais elevada de lípidos proporciona maior quantidade de lamelas em redor do gás, tornando-o mais estável e, assim, permitindo a persistência de uma maior proporção dos lipossomas maiores. Adicionalmente, verificou-se que o tamanho da secção de topo de gás também pode ser utilizado para afectar a dimensão de lipossomas cheios com gás. Secções de topo maiores contendo proporcionalmente mais gás relativamente à dimensão da fase aquosa irão produzir geralmente lipossomas maiores do que secções de topo de menor dimensão.

A velocidade da agitação é importante para gerar os lipossomas apropriadamente dimensionados. Verificou-se que velocidades de agitação entre 100 e 10 000 rotações por minuto (RPMs) podem ser utilizadas para preparar lipossomas; no entanto, há óptimos em termos da produção rápida e reprodutível de lipossomas de tamanho definido. Uma rotação, tal como o termo é usado aqui, refere-se a um único movimento para trás e para a frente, para cima e para baixo, de lado até lado, circular, etc., em que o movimento começa e termina (isto é, regressa) no ponto de origem. A Tabela 3 mostra as dimensões de lipossomas produzidos a partir de uma fase aquosa de 82% molar de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) com 10% molar de ácido dipalmitoilfosfatídico (DPPA) com 8% molar de dipalmitoilfosfatidiletanolamina-PEG5000 (DPPE-PEG5000) e uma secção de topo compreendendo perfluoropropano gasoso. As preparações foram agitadas durante dois minutos num dispositivo Wig-L-Bug™ (Crescent Dental Mfg., Lyons, Ill.). Utilizando frascos de âmbar de 2 mL (Wheaton Industries, Millville, NJ; volume real 3,7 mL) cheios com uma fase lipídica aquosa e uma secção de topo de gás, o recipiente com múltiplas fases foi

colocado no dispositivo Wig-L-Bug™ e a velocidade foi medida via um tacómetro Co-Palmer Modelo 08210 Pistol Grip (Code-Palmer, Nile, Ill.). A Tabela 6 apresenta os resultados e demonstra o efeito das velocidades de agitação na dimensão média dos lipossomas resultantes.

TABELA 6

Efeito da Velocidade da Agitação na Dimensão Média dos Lipossomas	
Velocidade (RPM)	Dimensão Média dos Lipossomas
1500	3,4 μm
2800	3,3 μm
3300	2,9 μm

De facto, verificou-se que há uma velocidade de agitação óptima para produzir os lipossomas com a dimensão desejada. À velocidade óptima, os lipossomas cheios com gás formam-se muito rapidamente, em menos de 5 minutos, mesmo num período de um minuto ou dois, e mesmo num período de 30 segundos ou menos. De notar que o método e movimento da agitação são importantes na formação de lipossomas apropriadamente dimensionados. Em particular, verificou-se que se formam lipossomas de dimensões óptimas quando o movimento recíproco da agitação ocorre na forma de um arco. É preferido que o grau do movimento do arco esteja entre 2° e 20°. É ainda mais preferido que o grau do movimento do arco esteja entre 4° e 10°. É ainda mais preferido que o grau do movimento do arco esteja entre 5° e 8°. O mais preferido é que o grau do movimento do arco esteja entre 6° e 7°. Como forma de realização suplementar, verificou-se que o número de RPMs está preferivelmente situado entre

cerca de 500 e cerca de 10 000, mais preferivelmente entre cerca de 1000 e cerca de 5000 e muito preferivelmente entre cerca de 2500 e cerca de 4000.

Também é uma descoberta importante o facto de a dimensão, forma e quantidade da secção de topo disponível para a agitação do conteúdo líquido também serem vitais para a formação de lipossomas optimamente dimensionados cheios com gás. Por exemplo, uma descoberta consiste no seguinte: quando se utilizam frascos de 3,7 mL de volume real (Vidro de borossilicato Wheaton 300, Wheaton Industries, Millville, NJ, referidos como dimensão de 2 mL, diâmetro x altura = 15 mm x 32 mm), o volume da secção de topo que contém gás está preferivelmente situada entre cerca de 10% e cerca de 60% do volume total do frasco. Em geral, a secção de topo que contém gás de um frasco está situada entre cerca de 10% e cerca de 80% do volume total desse frasco, apesar de mais ou menos gás poder ser apropriado dependendo das circunstâncias particulares e aplicação desejada. Mais preferivelmente, a secção de topo compreende entre cerca de 30% e cerca de 70% do volume total. Em geral, é mais preferido que o volume da secção de topo que contém gás compreenda cerca de 60% do volume total do frasco.

Assim, é claro da discussão acima da invenção que a dimensão óptima depende de uma variedade de factores, incluindo a intensidade e movimento da agitação, e a dimensão, forma e volume de enchimento real dos frascos.

Apesar de uma variedade de diferentes dispositivos de agitação poder ser utilizada para preparar os lipossomas cheios com gás, como misturadores de tinta, agitadores de mesa e indutores de vórtice, a geometria da agitação e a velocidade são importantes para otimizar a produção dos

lipossomas cheios com gás. O dispositivo Wig-L-Bug™ é o dispositivo mais preferido para agitação.

A dimensão do recipiente esterilizado, a geometria do recipiente e a orientação do recipiente relativamente ao aparato de agitação são todos factores importantes na determinação da dimensão dos lipossomas cheios com gás. O dispositivo de agitação, por exemplo, Wig-L-Bug™, irá geralmente agitar mais lentamente quando o peso do recipiente esterilizado aumentar para além de um certo nível. O dispositivo comum Wig-L-Bug™ agita mais rapidamente um frasco de 2 mL (volume real 3,7 mL) do que um frasco de 10 mL. Esta experiência foi realizada utilizando um frasco transparente de 10 mL (Wheaton Industries, Millville, Nova Jersey) e um frasco de âmbar de 2 mL (volume real 3,7 mL) (Wheaton Industries, Millville, Nova Jersey). Mais uma vez, utilizando um tacómetro Code-Palmer Pistol Grip (Code-Palmer, Nile, Ill.) mediu-se a velocidade da agitação. A Tabela 7 lista os resultados.

A Tabela 7 demonstra como a velocidade da agitação de um agitador eléctrico depende da dimensão do frasco utilizado para a agitação.

TABELA 7

Efeito da Dimensão do Frasco na Velocidade da Agitação do Dispositivo Wig-L-Bug™	
Tamanho do Frasco	Velocidade Medida (RPM)
frasco de 2 mL	3250
frasco de 10 mL	2950

Em geral utilizam-se recipientes esterilizados nos quais a fase aquosa já está presente na garrafa. No entanto e para aplicações seleccionadas, o meio estabilizador pode ser armazenado dentro do recipiente num estado seco ou

lioofilizado. Neste caso, a solução aquosa, por exemplo, solução salina tamponada com fosfato esterilizada, é adicionada ao recipiente esterilizado imediatamente antes da agitação. Ao fazê-lo, o meio estabilizador re-hidratado no seio da fase aquosa irá interagir novamente com a secção de topo de gás durante a agitação, desse modo produzindo lipossomas cheios com gás como acima. A re-hidratação de um meio de suspensão seco ou lioofilizado complica necessária e adicionalmente o produto e geralmente é indesejada, mas para certas preparações poderá ser útil para prolongar suplementarmente o tempo de vida por armazenamento do produto. Por exemplo, certos agentes terapêuticos, como ciclofosfamida, péptidos e materiais genéticos (como DNA), poderão ser hidrolisados por armazenamento aquoso de longa duração. A re-hidratação de uma amostra previamente lioofilizada para formar a fase aquosa e secção de topo antes da agitação pode tornar prático produzir lipossomas cheios com gás contendo compostos que, de outro modo, poderiam não ter um tempo de vida por armazenamento suficiente.

O anteriormente exposto apresenta vários parâmetros para determinar a dimensão de lipossomas cheios com gás. A dimensão dos lipossomas é importante em termos da maximização da eficácia do produto e minimização da toxicidade. Adicionalmente, os lipossomas devem ser tão flexíveis quanto possível, para maximizar a eficácia e minimizar interacções adversas com tecidos, como alojamento nos pulmões. O processo divulgado aqui cria lipossomas com a dimensão desejada com membranas ajustadas muito finas. Uma vez que as membranas dos lipossomas são tão finas e ajustadas, sendo apenas necessários, por exemplo, 1 mg mL^{-1} de lípidos para estabilizar as membranas, verificou-se que lipossomas cheios com gás de maior diâmetro podem ser

utilizados sem produzir hipertensão pulmonar. Por exemplo, porcos receberam doses até cinco vezes a dose necessária para imagiologia de diagnóstico sem quaisquer evidências de hipertensão pulmonar. Em comparação, doses muito menores de bolhas de ar revestidas com albumina de menor diâmetro nestes animais causam hipertensão pulmonar grave. Como os lipossomas da presente invenção são tão flexíveis e deformáveis, deslizam facilmente através dos capilares pulmonares. Adicionalmente, as tecnologias de revestimento empregues com os presentes lípidos (por exemplo, lípidos com polietilenoglicol) diminuem interacções pulmonares adversas e simultaneamente aumentam a estabilidade e eficácia *in vitro* e *in vivo* do produto.

A dimensão dos lipossomas cheios com gás para utilização como meio geral de contraste para ultra-sons deve ser tão grande quanto possível (sem causar efeitos embólicos) porque a retrodispersão ou o efeito de ultra-sons é proporcional ao raio à sexta potência quando as frequências são tais que os lipossomas cheios com gás estão no regime de dispersão de Rayleigh. Para MRI também são preferidos lipossomas maiores da invenção. A capacidade para preparar e empregar tamanhos maiores de lipossomas com menor potencial de efeitos tóxicos aumenta a sua eficácia relativamente a outros produtos.

Um parâmetro adicional que influencia o contraste em ultra-sons é a elasticidade da membrana lipossómica. Quanto maior for a elasticidade maior será o efeito de contraste. Uma vez que os presentes lipossomas são revestidos por membranas ultra-finas de lípidos, a elasticidade é muito semelhante à do gás não confinado, e a reflectividade e efeito de contraste são maximizados.

O procedimento de agitação produz facilmente lipossomas a partir de uma fase aquosa e uma secção de topo

de gás num recipiente esterilizado. O processo divulgado aqui é suficiente para produzir lipossomas com propriedades altamente desejáveis para aplicações de imagiologia ultra-sónica ou por ressonância magnética. No entanto, para aplicações seleccionadas, poderá ser empregue um filtro para produzir lipossomas com distribuições de tamanho ainda mais homogéneas e de diâmetros desejados. Por exemplo, para medir pressões *in vivo* com ultra-sons usando fenómenos harmónicos de lipossomas cheios com gás, poderá ser útil dispor de diâmetros de lipossomas definidos de modo muito restrito com uma gama estreita de dimensões. Isto é facilmente conseguido injectando os lipossomas (produzidos por agitação do recipiente com fase aquosa e secção de topo de gás) através de um filtro de dimensão definida. Os lipossomas resultantes não serão maiores do que uma aproximação muito estreita do tamanho dos poros do filtro na membrana de filtração. Como notado acima, para muitas aplicações ultra-sónicas ou de MRI, é desejável que os lipossomas cheios com gás sejam tão grandes quanto possível. No entanto, para certas aplicações, poderão ser desejáveis lipossomas muito menores cheios com gás. Na abordagem selectiva, por exemplo, de tumores ou outros tecidos doentes, poderá ser necessário que os lipossomas cheios com gás abandonem o espaço vascular e entrem no interstício tecidual. Lipossomas muito menores cheios com gás podem ser úteis para estas aplicações. Estes lipossomas menores cheios com gás (por exemplo, apreciavelmente com diâmetro menor do que um micron) podem ser produzidos, em grande extensão, por modificações dos compostos presentes na fase aquosa (composição e concentração) bem como na secção de topo (composição do gás e volume da secção de topo), mas também por injeção através de um filtro. Lipossomas muito pequenos cheios com gás de dimensão

substancialmente homogénea podem ser produzidos por injeção, por exemplo, através de um filtro de 0,22 micrones. Os lipossomas cheios com gás resultantes com dimensões da ordem dos nanómetros podem então ter propriedades desejáveis para abordagem selectiva.

Os exemplos acima de suspensões lipídicas também podem ser esterilizados via autoclave sem alteração apreciável da dimensão das suspensões. A esterilização do meio de contraste pode ser efectuada por autoclave e/ou esterilização por filtração antes ou após o passo de agitação, ou por outros meios conhecidos dos profissionais.

Após o enchimento dos recipientes com a fase aquosa e a secção de topo do gás pré-seleccionado, as garrafas vedadas podem ser armazenadas indefinidamente. É necessário que não haja partículas que precipitem, lipossomas cheios com gás que expludam ou outras interacções indesejadas entre lipossomas cheios com gás, partículas, colóides ou emulsões. O tempo de vida por armazenamento do recipiente cheio com a fase aquosa e a secção de topo de gás depende apenas da estabilidade dos compostos na fase aquosa. Estas propriedades de longo tempo de vida por armazenamento e aptidão para esterilização conferem vantagens substanciais à presente invenção relativamente à técnica anterior. O problema da estabilidade, tal como com agregação e precipitação de partículas, que era tão comum na área dos meios de contraste para ultra-sons, foi abordado aqui.

Verificou-se que os lipossomas cheios com gás que são produzidos por agitação do recipiente com múltiplas fases têm excelente utilidade como agentes de contraste para imagiologia de diagnóstico, como imagiologia por ultra-sons ou por ressonância magnética. Os lipossomas são úteis em imagiologia de um paciente em geral e/ou no diagnóstico específico da presença de tecido doente num paciente. O

processo de imagiologia pode ser conduzido administrando a um paciente um lipossoma cheio com gás da invenção e depois submetendo o paciente a varrimento utilizando imagiologia por ultra-sons ou ressonância magnética para se obterem imagens visíveis de uma região interna de um paciente e/ou de qualquer tecido doente nessa região. Por região de um paciente pretende-se significar todo o paciente ou uma área ou porção particular de um paciente. O agente de contraste lipossômico pode ser empregue para proporcionar imagens da rede vascular, coração, fígado e baço, e na imagiologia da região gastrointestinal ou outras cavidades do corpo, ou de outros modos que serão claros para os profissionais, tais como na caracterização de tecidos, imagiologia de bancos de sangue, etc. Qualquer um dos vários tipos de dispositivos de imagiologia por ultra-sons ou ressonância magnética pode ser empregue, o tipo ou modelo particular do dispositivo não é crítico para o método.

Os lipossomas cheios com gás da invenção também podem ser empregues para distribuir uma grande variedade de agentes terapêuticos num paciente para o tratamento de várias doenças, padecimentos ou sofrimentos, como será reconhecido pelo profissional.

Além disso, lipossomas magneticamente activos podem ser utilizados para estimar a pressão por MRI. Os lipossomas aumentam a susceptibilidade em volume e, em conformidade, aumentam a relaxação T_2 e ainda mais a relaxação T_2^* . Uma vez que os efeitos de gradientes de campo estático são maioritariamente compensados em experiências de eco de spin (em virtude do pulso de refocagem de radiofrequência de 180°), o efeito dos lipossomas é menos acentuado em sequências de pulso ponderado T_2 do que T_2^* onde os efeitos de campo estático não são compensados. O aumento da pressão origina perda de

lipossomas ou desagregação de lipossomas (para gases mais solúveis), bem como um decréscimo do diâmetro dos lipossomas. Em conformidade, $1/T_2$ decresce com pressão crescente. Após libertação da pressão, alguns dos lipossomas remanescentes expandem-se novamente e $1/T_2$ aumenta de novo ligeiramente. Os lipossomas compostos por cerca de 80% de PFP com 20% de ar exibem estabilidade aumentada e um ligeiro decréscimo de $1/T_2$ com a pressão, que regressa à referência após libertação da pressão (isto é, os lipossomas são estáveis mas exibem um ligeiro efeito de pressão em $1/T_2$). Quando se obtêm imagens do eco do gradiente e se mede a intensidade do sinal, estes efeitos são muito mais acentuados. A intensidade do sinal aumenta com pressão crescente ($1/T_2^*$ decresce com pressão aumentada). Uma vez que a experiência é efectuada de forma relativamente rápida (demora menos de um décimo do tempo a produzir as imagens do eco do gradiente do que a medir T_2). A duração da exposição à pressão é muito menor e os lipossomas cheios com azoto regressam praticamente à referência após a libertação da pressão (isto é, a perda de lipossomas é muito pequena). Em conformidade, a intensidade do sinal no eco do gradiente diminui quase até à referência no regresso para a pressão ambiente. Para a medição da pressão por MRI, os lipossomas podem ser concebidos para se desagregarem com pressão crescente ou para serem estáveis mas o diâmetro dos lipossomas diminuir com pressão crescente. Uma vez que o raio dos lipossomas em MRI afecta $1/T_2^*$, esta relação pode ser utilizada para estimar a pressão por MRI.

Como será reconhecido pelo profissional, a administração dos lipossomas cheios de gás ao paciente pode ser efectuada de vários modos, tais como intravenosamente ou intra-arterialmente por injeção, oralmente ou

rectalmente. A dosagem útil a ser administrada e o modo particular da administração irão variar dependendo da idade, peso e do mamífero particular e sua região a ser submetida a varrimento ou tratada, e o meio de contraste ou agente terapêutico particular a ser empregue. Tipicamente, a dosagem é iniciada a níveis menores e é aumentada até se atingir a intensificação do contraste ou efeito terapêutico desejado. O paciente pode ser qualquer tipo de mamífero, mas muito preferivelmente é um ser humano.

Pretende-se que os seguintes exemplos reais ilustrem o modo como a presente invenção é empregue e ilustrem princípios relacionados com a presente invenção, bem como algumas das áreas de utilidade extraordinária da invenção. Estes exemplos são meramente exemplificativos, não devendo ser considerados limitadores do âmbito das reivindicações adjuntas.

EXEMPLOS

Exemplo 1

Formação de Lipossomas Cheios com Azoto Gasoso

Prepararam-se bicamadas lipídicas cheias com gás em dois frascos de 20 mL com 6 mL de um diluente contendo solução salina normal (fisiológica):propilenoglicol:glicerol (8:1:1, v:v:v). A estes sistemas adicionou-se, numa concentração final de 5 mg mL⁻¹, uma mistura de dipalmitoílfosfatidilcolina (DPPC):ácido dipalmitoílfosfatídico (DPPA):dipalmitoílfosfatidiletanolamina-PEG5000 (DPPE-PEG5000) numa razão molar de 82:10:8 (% molar). Em seguida, as amostras foram vedadas com tampas com septo estanques ao ar que mantêm a pressão. Foram seguidamente

purgadas e evacuadas pelo menos três vezes com azoto gasoso (99,98%, Arizona Welding Co., Tucson, AZ). As amostras foram submetidas a autoclavagem durante 15 minutos a 121°C num Esterilizador por Vapor da Barnstead Modelo C57835 (Barnstead/Thermolyne Corporation, Dubuque, Iowa) ou foram esterilizadas por filtração desde uma até três vezes num filtro Nuclepore de 0,22 µm (Costar, Pleasanton, CA). Depois as amostras foram removidas da autoclave e foram deixadas arrefecer para aproximadamente a temperatura ambiente. As amostras foram submetidas a vórtice num dispositivo indutor de vórtice Wig-L-Bug (Crescent Dental Mfg. Co., Lyons, IL) durante dois minutos. As misturas resultantes eram significativas para a formação de bicamadas cheias de gás semelhantes a uma espuma. As bicamadas lipídicas cheias com gás foram dimensionadas por três métodos num detector por obscurecimento de luz da Particle Sizing Systems Modelo 770 (Particle Sizing Systems, Santa Barbara, CA), um Microscópio Óptico Reichert-Jung Modelo 150 equipado com uma ocular de calibração (Cambridge Instruments, Buffalo, NI) e um Modelo Coulter (Coulter Industries, Luton Beds, Inglaterra). As amostras exibiram uma dimensão média ponderada em número de cerca de 5-7 micrones com pelo menos 95% das partículas menores do que 10 micrones.

Exemplo 2

Formação de Lipossomas Cheios com Perfluoropentano Gasoso

Prepararam-se bicamadas lipídicas cheias com gás em dois frascos de 20 mL com 6 mL de um diluente contendo solução salina normal (fisiológica):propilenoglicol:glicerol (8:1:1, v:v:v). A estes sistemas adicionou-se, em

concentrações finais que variaram entre 1 mg mL⁻¹ e 5 mg mL⁻¹, uma mistura de dipalmitoílfosfatidilcolina (DPPC):ácido fosfatídico:dipalmitoílfosfatidiletanolamina-PEG5000 numa razão de pesos de 82:10:8 (p:p:p). A esta mistura adicionaram-se 50 µL (30,1 µmoles) de perfluoropentano (PCR, Gainesville, FL). As amostras foram preparadas a -20°C e foram vedadas com tampas com septo estanques ao ar que mantêm a pressão. As amostras foram submetidas a autoclavagem durante 15 minutos a 121°C num Esterilizador por Vapor da Barnstead Modelo C57835 (Barnstead/Thermolyne Corporation, Dubuque, Iowa). As amostras foram removidas da autoclave e foram deixadas arrefecer para aproximadamente 40°C. As amostras foram submetidas a vórtice num dispositivo indutor de vórtice Wig-L-Bug™ (Crescent Dental Mfg. Co., Lyons, IL) durante dois minutos. As misturas resultantes eram significativas para a formação de bicamadas cheias com gás semelhantes a uma espuma. Registou-se o volume e altura da espuma, e uma amostra foi colocada num congelador a -20°C (Kenmore Brand, Sears-Roebuck, Chicago, IL). A amostra foi removida passadas 3 horas, altura em que se notou que aproximadamente 90% do volume original permaneceu. A amostra foi deixada no congelador durante a noite (aproximadamente 17 horas) e foi removida na altura em que foi descoberto que 50% do volume original permaneceu. O frasco remanescente, utilizado como controlo, foi mantido numa incubadora a 30°C durante o mesmo período de tempo. Verificou-se que não ocorreu perda de volume, indicador de que o arrefecimento do gás nas bicamadas cheias com gás tinha condensado, desse modo diminuindo o volume de gás. Por fim, a amostra fria foi colocada na incubadora a 30°C, altura em que se verificou que, após aproximadamente 45 minutos, 20% do volume da espuma original tinha sido restabelecido. Isto é indicador

do facto do gás condensado ter novamente sido volatilizado e expandido a dimensão dos lipossomas cheios com gás.

Exemplo 3

Formulação de Lipossomas Cheios com Perfluoropropano Gasoso

Utilizou-se o mesmo procedimento do Exemplo 1 com a excepção do gás utilizado ter sido perfluoropropano (99,99%, Alcon Surgical, Fort Worth, TX) e do tamanho do frasco utilizado ter sido um frasco de âmbar de 2 mL (volume real = 3,7 mL) (Wheaton, Millville, NJ). Os frascos foram cheios com 1,5 mL da mistura de veículo lípidos/diluente. O processo foi dimensionado via o mesmo método do Exemplo 1, mas agora produzindo uma dimensão de 4 - 6 micrones com mais do que 95% das partículas menores do que 10 micrones.

Exemplo 4

Formulação de Lipossomas Cheios com Perfluorobutano Gasoso

Utilizou-se o mesmo procedimento do Exemplo 1 com a excepção do gás utilizado ter sido perfluorobutano (97+%, Flura Corporation, Nashville, TN) e do tamanho do frasco utilizado ter sido um frasco de âmbar de 2 mL (volume real = 3,7 mL) (Wheaton, Millville, NJ). Os frascos foram cheios com 1,5 mL da mistura de veículo lípidos/diluente. O processo foi dimensionado via o mesmo método do Exemplo 1, mas agora produzindo uma dimensão de 4 - 6 micrones com mais do que 95% das partículas menores do que 10 micrones.

Exemplo 5

Formulação de Lipossomas Cheios com Perfluorociclobutano Gasoso

Utilizou-se o mesmo procedimento do Exemplo 1 com a exceção do gás utilizado ter sido perfluorociclobutano (99,8%, Pfaultz & Bauer, Waterbury, Connecticut) e do tamanho do frasco utilizado ter sido um frasco de âmbar de 2 mL (volume real = 3,7 mL) (Wheaton, Millville, NJ). Os frascos foram cheios com 1,5 mL da mistura de veículo lípidos/diluente. O processo foi dimensionado via o mesmo método do Exemplo 1, mas agora produzindo uma dimensão de 4 - 6 micrones com mais do que 95% das partículas menores do que 10 micrones.

Exemplo 6

Formulação de Lipossomas Cheios com Hexafluoreto de Enxofre Gasoso

Utilizou-se o mesmo procedimento do Exemplo 1 com a exceção do gás utilizado ter sido hexafluoreto de enxofre (99,99%, Alcon Surgical, Fort Worth, TX) e do tamanho do frasco utilizado ter sido um frasco de âmbar de 2 mL (volume real = 3,7 mL) (Wheaton, Millville, NJ). Os frascos foram cheios com 1,5 mL da mistura de veículo lípidos/diluente. O processo foi dimensionado via o mesmo método do Exemplo 1, mas agora produzindo uma dimensão de 4 - 6 micrones com mais do que 95% das partículas menores do que 10 micrones.

Exemplo 7

Estabilidade de Lipossomas Cheios com Perfluorobutano Gasoso Sob Pressão Utilizando o Teste de Atenuação Acústica *In Vitro*

Bicamadas lipídicas cheias com perfluorobutano gasoso formuladas como descrito no Exemplo 4. Recolheram-se amostras de concentrações lipídicas variáveis entre 1 mg mL⁻¹ e 5 mg mL⁻¹ em alíquotas de 200 µL, tendo sido diluídas 10 000:1 com o diluente solução salina normal. As amostras foram inicialmente misturadas com um agitador magnético para induzir homogeneidade, que depois foi desligado. Utilizou-se uma placa de aço inoxidável como reflector perfeito, situada aproximadamente a 25 cm da origem do transdutor. O transdutor utilizado foi um transdutor de imersão não focalizado de banda larga de 5,0 MHz (Panametrics, Waltham MA). Todos os dados foram transferidos via uma placa 488.2 GPIB (National Instruments, Austin, TX) e foram processados num processador Gateway 2000 80486.

Antes da amostragem das bicamadas lipídicas cheias com gás efectuou-se um controlo na referência apenas em solução salina normal. Imediatamente depois de estabelecidas as condições de controlo, a alíquota de 200 µL foi adicionada à solução salina e os dados foram acumulados durante 90 segundos à temperatura ambiente (20°C). A atenuação (ver Figura 4) do som foi constante durante os 90 segundos, com uma atenuação de $2,0 \pm 0,5$ dB cm⁻¹. Obteve-se uma segunda amostra; a pressão da amostra foi então aumentada para 120 mm Hg e a atenuação foi registada. Tal como na experiência à temperatura ambiente, a atenuação permaneceu constante com poucas variações durante o período de teste de 90 segundos, mas a atenuação foi aproximadamente entre 0,9 dB cm⁻¹. Mediu-se outra amostra em condições de temperatura

constante de 37°C. Mais uma vez, durante o período de 90 segundos, a atenuação foi constante e a atenuação aproximou-se dos 0,9 dB cm⁻¹. Mediu-se uma amostra final a 37°C e pressão de 120 mm Hg. Desta vez, a atenuação decresceu de um modo linear ao longo do tempo, de 0,9 dB cm⁻¹ para 0,4 dB cm⁻¹ durante 90 segundos. Isto demonstrou a estabilidade acrescida desta formulação relativamente às bicamadas lipídicas cheias com azoto.

Exemplo 8

Estabilidade de Lipossomas Cheios com Azoto Gasoso Sob Pressão Utilizando o Teste de Atenuação Acústica *In Vitro*

Realizaram-se as experiências idênticas ao Exemplo 7 com a exceção das bicamadas lipídicas cheias com gás serem compostas por azoto gasoso como descrito no Exemplo 1. A atenuação foi significativa para atenuação estável à temperatura ambiente (20°C) e à temperatura do corpo humano (37°C); no entanto, por exposição do conteúdo da diluição a 120 mm Hg de pressão, a atenuação caiu de forma precipitada para perto dos valores do controlo na referência. Isto demonstrou a ausência de estabilidade com bicamadas lipídicas cheias com azoto sob pressão comparadas com bicamadas lipídicas cheias com perfluorobutano.

Exemplo 9

Efeito da Concentração de Lípidos na Dimensão Média Ponderada em Número de Lipossomas Cheios com Perfluorociclobutano Gasoso

Prepararam-se bicamadas lipídicas cheias com perfluorociclobutano gasoso como descrito no Exemplo 5 com a exceção de se terem utilizado 3 concentrações diferentes da formulação lipídica. A formulação compreendeu um diluente contendo solução salina normal (fisiológica): propilenoglicol:glicerol (8:1:1, v:v:v). A este sistema adicionou-se, em concentrações finais que variaram entre 1 mg mL⁻¹ e 5 mg mL⁻¹, uma mistura de dipalmitoílfosfatidilcolina (DPPC):ácido dipalmitoílfosfatídico (DPPA): dipalmitoílfosfatidiletanolamina-PEG5000 (DPPE-PEG5000) numa razão molar 82:10:8 (% molar). As amostras foram preparadas em frascos de 2 mL (volume real = 3,7 mL) (Wheaton Industries, Millville, NJ) e foram dimensionadas num sistema de dimensionamento por obscurecimento da luz da Particle Sizing Systems Modelo 770. A tabela seguinte descreve os resultados.

A Tabela 9 demonstra o efeito da concentração lipídica na dimensão média de bicamadas lipídicas cheias com um perfluorocarboneto gasoso, utilizando como exemplo perfluorociclobutano.

TABELA 9

Efeito da Concentração Lipídica em Lipossomas Cheios com Perfluorociclobutano Gasoso	
Concentração Lipídica	Dimensão Média Ponderada em Número
1,0 mg mL ⁻¹	3,1 µm
3,0 mg mL ⁻¹	3,8 µm
5,0 mg mL ⁻¹	4,7 µm

Exemplo 10

Demonstração da Ausência de Alterações Hemodinâmicas Utilizando Lipossomas Cheios com Gás Substancialmente Insolúvel

Prepararam-se amostras de bicamadas lipídicas cheias com gás contendo as misturas lipídicas descritas nos Exemplos 3, 4, 5 e 6 com concentrações lipídicas totais de 1 mg mL^{-1} e 3 mg mL^{-1} de lípidos utilizando perfluoropropano (PFP), perfluorociclobutano (PFCB), perfluorobutano (PFB) e hexafluoreto de enxofre (SHF). A imagiologia foi realizada num cão doméstico, pesando aproximadamente 28 kg, utilizando uma máquina de ultra-sons da Acoustic Imaging Modelo 5200S equipada com um transdutor de 5 megahertz. O animal foi sedado com pentobarbital de sódio, foi ventilado com ar ambiente e monitorizado quanto à pressão arterial pulmonar, pressão arterial sistémica e pulsação. A imagiologia do coração foi realizada na posição do eixo menor e o animal recebeu doses de *bolus* de 5 microlitros por kg de PFP, PFCB, PFB e SHF, testando ambas as concentrações lipídicas de 1 mg mL^{-1} e 3 mg mL^{-1} . Fez-se um intervalo de pelo menos 15 minutos entre cada injeção para permitir a eliminação de qualquer contraste residual. Todos os lipossomas cheios com perfluorocarbonetos (PFP, PFCB e PFB) exibiram aumento da perfusão do miocárdio a 1 mg mL^{-1} de lípidos, mas o PFB mais intensamente do que os outros. O PFP melhorou a 3 mg mL^{-1} . Os lipossomas cheios com SHF não exibiram intensificação da perfusão do miocárdio demonstrável a 1 mg por mL de lípidos, mas exibiram intensificação do miocárdio acentuada a 3 mg por mL de lípidos.

Repetiu-se substancialmente o descrito acima noutro cão, tendo-se obtido os mesmos resultados.

Realizaram-se estudos hemodinâmicos noutro cão utilizando lipossomas cheios com perfluoropropano. O animal recebeu múltiplas doses via *bolus* rápido até 300 microlitros por quilograma cada, isto é, 50 vezes mais elevado do que a dose de imagiologia. O animal não exibiu absolutamente nenhuma alteração em quaisquer parâmetros hemodinâmicos apesar das múltiplas doses, demonstrando assim a elevada segurança hemodinâmica do agente.

Exemplo 11

Determinação da Razão (Janela) Terapêutica com Base em Testes de Toxicidade em Ratinhos Balb/C

Realizaram-se testes de toxicidade em ratinhos Balb/C pesando entre cerca de 20 e 25 gramas. Os LD₅₀ de concentrações lipídicas de 1 mg mL⁻¹ de lipossomas encerrando amostras de perfluoropropano (PFP), perfluorociclobutano (PFCB), perfluorobutano (PFB) e hexafluoreto de enxofre (SHF) foram testados via *bolus* rápido. Os LD₅₀ de cada uma das amostras de PFCB, PFB e PFP foram, cada um, maiores do que 12 mL kg⁻¹ e para as bicamadas lipídicas cheias com SHF gasoso foram maiores do que 30 mg kg⁻¹, indicando índices terapêuticos maiores do que 2 400 para 1 e 6 000 para 1, respectivamente, para estes produtos úteis em diagnóstico ultra-sónico.

Exemplo 12

Utilização de Lipossomas Cheios com Perfluoropentano Gasoso como Agente de Contraste em Ultra-Sons

Coelhos Brancos da Nova Zelândia foram anestesiados com uma injeção intramuscular de 1 cc kg⁻¹ de Rabbit Mix (8:5:2:, v:v:v, xilazina, 20 mg mL⁻¹:cetamina, 10 mg mL⁻¹:acepromazina, 100 mg mL⁻¹). Os coelhos foram submetidos a imagiologia num instrumento de ultra-sons de diagnóstico da Acoustic Imaging Modelo 5200 e num instrumento Doppler a Cores de diagnóstico da Acoustic Imaging Modelo 5200S (Acoustic Imaging, Phoenix, AZ). Os coelhos foram injectados, via um cateter do tipo borboleta 23 G, através da veia marginal da orelha. O coelho recebeu doses que variaram desde 0,01 cc kg⁻¹ até 0,1 cc kg⁻¹ das bicamadas lipídicas cheias com perfluoropentano durante um período de 5 - 10 segundos. Perspectivas do eixo maior utilizando um transdutor de 7,5 MHz revelaram imagiologia brilhante das quatro câmaras do coração e miocárdio durante um período que variou desde 20 minutos até mais de uma hora. O transdutor foi então movido para a região do fígado, onde se observou um contraste brilhante na veia hepática, veia portal hepática, bem como nos seios hepáticos. O transdutor foi então colocado sobre o rim, que revelou contraste nas regiões da medula e córtex, bem como visualização da artéria renal. O transdutor de ultra-sons de diagnóstico foi então substituído por um Doppler a cores, tendo-se observado um contraste prolongado e brilhante em todos os tecidos vascularizados do corpo do animal.

Exemplo 13

Efeito de Diferentes Concentrações de Perfluoropropano e Ar no Número e Dimensão de Lipossomas Cheios com Gás

Múltiplas amostras de soluções lipídicas (1 mg por mL; razões 82:10:8 % molar de DPPC:DPPA:DPPE-PEG5000) em razões

de pesos 8:1:1 de solução salina normal:glicerol:propileno-glicol em frascos de 2 mL (tamanho real 3,7 mL) da Wheaton Industries (Millville; NJ) foram colocadas num liofilizador modificado Edwards Modelo S04 de quatro pés cúbicos de capacidade e foram sujeitas a pressão reduzida. As secções de topo dos frascos foram então instiladas com 80% de PFP com 20% de ar, 60% de PFP com 40% de ar, 50% de PFP com 50% de ar, 20% de PFP com 80% de ar ou 100% de ar. As percentagens de gás nas secções de topo das diferentes amostras foram confirmadas por cromatografia gasosa num Cromatógrafo Gasoso da Hewlett Packard Modelo 1050L com interface de "software" Hewlett Packard Chem™. O modo de detecção foi Detecção de ionização de chama. As amostras foram então agitadas a 3 300 RPM durante 60 segundos utilizando o dispositivo Wig-L-Bug™, e os tamanhos e contagens dos lipossomas foram determinados por dimensionamento óptico de partículas como previamente descrito. Os resultados estão apresentados acima na Tabela 2.

Lisboa, 13 de Janeiro de 2010

REIVINDICAÇÕES

1. Lipossoma cheio com gás compreendendo um gás substancialmente insolúvel em combinação com um gás solúvel, em que pelo menos 1% da quantidade total do gás consiste num gás substancialmente insolúvel.
2. Lipossoma cheio com gás da Reivindicação 1, em que o referido gás substancialmente insolúvel é um gás perfluorocarbonado.
3. Lipossoma cheio com gás da Reivindicação 1, em que o referido gás solúvel é seleccionado do grupo que consiste em ar, oxigénio, azoto e dióxido de carbono.
4. Lipossoma cheio com gás da Reivindicação 1, em que o referido gás substancialmente insolúvel é um gás perfluorocarbonado e o referido gás solúvel é seleccionado do grupo que consiste em ar, oxigénio, azoto e dióxido de carbono.
5. Lipossoma cheio com gás da Reivindicação 1, em que o referido lipossoma é compreendido por uma monocamada lipídica.
6. Lipossoma cheio com gás da Reivindicação 1, em que o referido lipossoma é compreendido por uma bicamada lipídica.
7. Lipossoma cheio com gás de qualquer uma das Reivindicações precedentes, em que o referido gás substancialmente insolúvel tem uma solubilidade igual

ou menor do que 15 mL de gás por kg de água a 20°C e 1 atmosfera de pressão.

8. Lipossoma cheio com gás da Reivindicação 7, em que o referido gás substancialmente insolúvel tem uma solubilidade igual ou menor do que 10 mL de gás por kg de água a 20°C e 1 atmosfera de pressão.
9. Lipossoma cheio com gás de qualquer uma das Reivindicações precedentes, em que pelo menos 10% da quantidade total do gás consiste num gás substancialmente insolúvel.

Lisboa, 13 de Janeiro de 2010

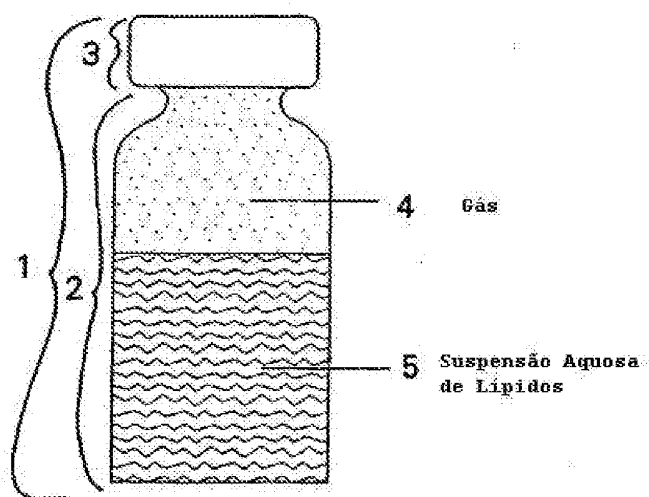
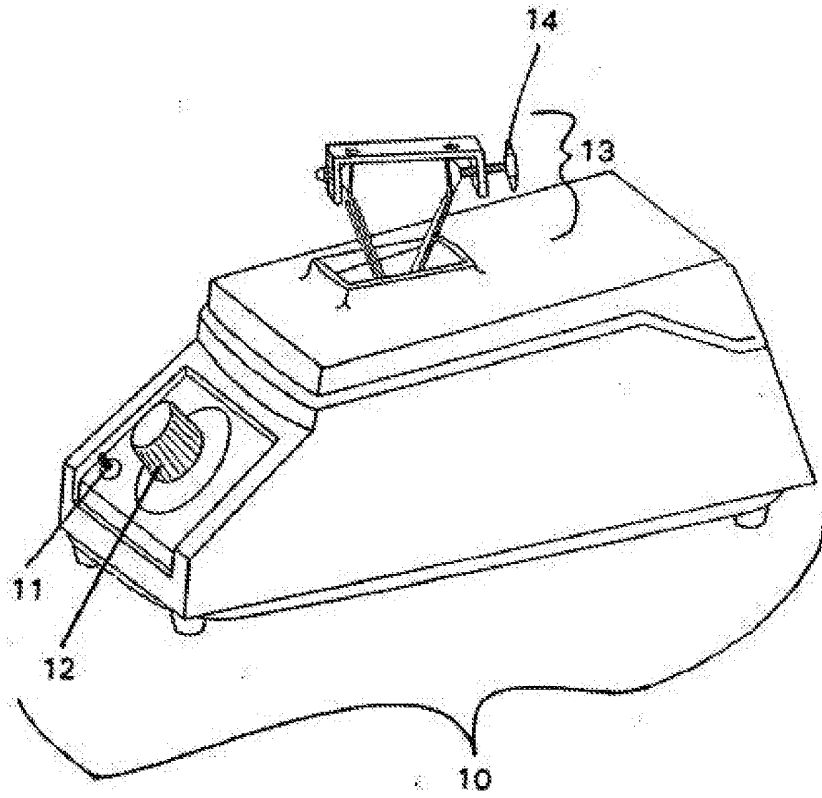


FIG. 1

**FIG. 2**

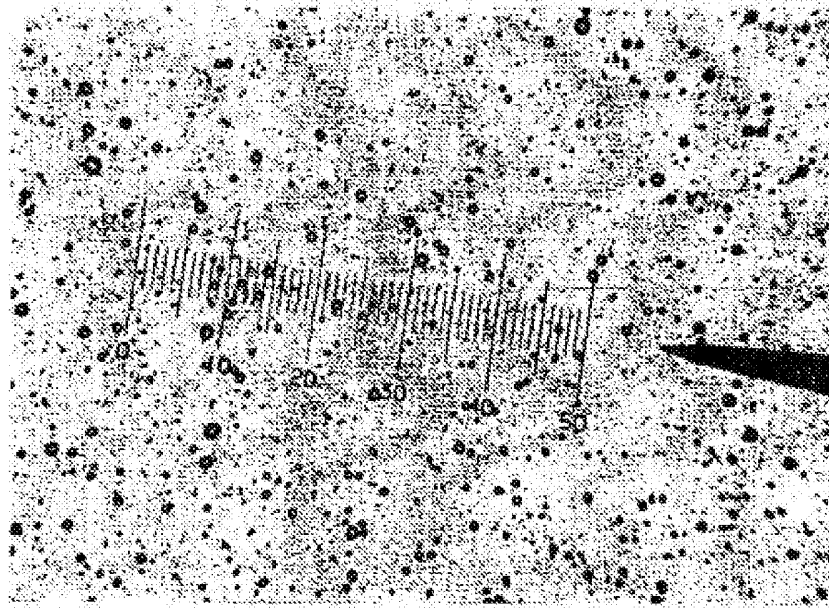


FIG. 3