

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 928 401**

(51) Int. Cl.:

A61K 49/22 (2006.01)
A61K 47/10 (2007.01)
A61K 47/24 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.12.2015 PCT/US2015/067615**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **07.07.2016 WO16109400**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2015 E 15876086 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2022 EP 3240579**

(54) Título: **Composiciones de microesferas de gas encapsuladas en lípidos y métodos relacionados**

(30) Prioridad:

31.12.2014 US 201462098453 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.11.2022

(73) Titular/es:

**LANTHEUS MEDICAL IMAGING, INC. (100.0%)
331 Treble Cove Road
North Billerica, MA 01862, US**

(72) Inventor/es:

**ROBINSON, SIMON P.;
SIEGLER, ROBERT W.;
ONTHANK, DAVID C. y
NGUYEN, NHUNG TUYET**

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 928 401 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones de microesferas de gas encapsuladas en lípidos y métodos relacionados

5 SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reclama el beneficio bajo 35 USC § 119(e) de la solicitud provisional de EE. UU. número de serie 62/098,453, presentada el 31 de diciembre de 2014.

10 ANTECEDENTES

[0002] US 2008/009561 A1 se refiere a un método para preparar una composición formadora de microesferas.

15 RESUMEN

[0003] Las formas de realización de la presente invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

[0004] En una forma de realización, la invención proporciona una mezcla no acuosa que comprende DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE en

- 20
(a) propilenglicol y glicerol;
(b) propilenglicol; o
(c) glicerol;

25 proporcionado en contacto con un gas perfluorocarbonado,
donde una mezcla no acuosa es una mezcla que tiene menos o igual al 5% de agua en peso, calculado como el peso de agua al peso de la combinación de lípidos y propilenglicol y/o glicerol.

30 **[0005]** En otra forma de realización, la invención proporciona un kit que comprende una mezcla no acuosa proporcionada en contacto con un gas perfluorocarbonado de la invención en un recipiente, donde opcionalmente

- (A) el recipiente es un recipiente de una sola cámara o un recipiente de múltiples cámaras; y/o
(B) el kit comprende, además:

- 35 (a) un segundo recipiente, en el que opcionalmente el segundo recipiente
(i) comprende un diluyente acuoso;
(ii) es una jeringa precargada;
(iii) comprende propilenglicol; o
40 (iv) comprende glicerol; y opcionalmente
(b) un tercer recipiente que comprende un diluyente acuoso.

[0006] En otra forma de realización, la invención proporciona un método para formar microesferas de gas encapsuladas en lípidos que comprende

- 50 (1) agregar glicerol y/o un diluyente acuoso a la mezcla no acuosa proporcionada en contacto con un gas perfluorocarbonado de la invención, la mezcla no acuosa que comprende DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE en propilenglicol, y se pone en contacto con un gas perfluorocarbonado, y luego se activa la composición resultante para formar microesferas de gas encapsuladas en lípidos;
(2) activar la mezcla no acuosa proporcionada en contacto con un gas perfluorocarbonado de la invención, comprendiendo la mezcla no acuosa DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE en propilenglicol y/o glicerol, y proporcionada en contacto con un gas perfluorocarbonado, opcionalmente, en el que se añade un diluyente acuoso a la mezcla no acuosa proporcionada en contacto con un gas perfluorocarbonado antes de que se active; o
55 (3) agregar propilenglicol y/o un diluyente acuoso a la mezcla no acuosa proporcionada en contacto con un gas perfluorocarbonado de la invención, comprendiendo la mezcla no acuosa DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE en glicerol, y proporcionada en contacto con un gas de perfluorocarbono, y luego activando la composición resultante para formar microesferas de gas encapsuladas en lípidos; en donde, una mezcla no acuosa es una mezcla que tiene menos o igual al 5% de agua en peso calculado como el peso de agua al peso de la combinación de lípidos y propilenglicol y/o glicerol;

opcionalmente en donde

- 65 (i) la mezcla no acuosa proporcionada en contacto con un gas de perfluorocarbono, o la composición resultante, se activa durante 20-45 segundos; o

(ii) la mezcla no acuosa proporcionada en contacto con un gas de perfluorocarbono, o la composición resultante, se activa durante 60-120 segundos.

5 [0007] La invención proporciona, en parte, formulaciones nuevas y mejoradas para fabricar agentes de contraste para ultrasonidos, así como preparaciones de los propios agentes de contraste para ultrasonidos. Dichas formulaciones son menos complejas en su composición, su método de fabricación y su método de uso y, sorprendentemente, más robustas que las formulaciones de la técnica anterior utilizadas para fabricar agentes de contraste de ultrasonido, incluso más estables a temperatura ambiente durante períodos prolongados. Sorprendentemente, dichas formulaciones se pueden usar para fabricar agentes de contraste para ultrasonidos sin una manipulación compleja.

10 15 [0008] En el presente documento se proporcionan estas nuevas formulaciones, kits que comprenden estas nuevas formulaciones, métodos de uso de estas formulaciones que incluyen métodos de uso de estas formulaciones para fabricar agentes de contraste de ultrasonidos y composiciones o preparaciones de las propias microesferas de gas encapsuladas en lípidos. Estas nuevas formulaciones incluyen las mezclas no acuosas descritas con mayor detalle en este documento.

15 [0009] En un aspecto, en el presente documento se proporciona una composición que consiste o que consiste esencialmente en una mezcla no acuosa de DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE en propilenglicol y glicerol y un tampón.

20 25 [0010] En otro aspecto, en el presente documento se proporciona una composición que consiste o que consiste esencialmente en una mezcla no acuosa de DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE en propilenglicol y un tampón.

[0011] En otro aspecto, se proporciona aquí una composición que consiste o que consiste esencialmente en una mezcla no acuosa de DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE en glicerol y un tampón.

25 30 [0012] El tampón puede ser, sin limitación, un tampón de acetato (p. ej., una combinación de acetato de sodio y ácido acético), o un tampón de benzoato (p. ej., una combinación de benzoato de sodio y ácido benzoico), o un tampón de salicilato (p. ej., una combinación de salicilato de sodio y ácido salicílico).

35 40 [0013] Las composiciones anteriores se pueden proporcionar en un recipiente estéril, opcionalmente con un gas de perfluorocarbono, y además opcionalmente con instrucciones de uso que incluyen instrucciones para activar tales composiciones en presencia de un gas de perfluorocarbono y opcionalmente en presencia de un diluyente acuoso para generar microesferas de gas encapsuladas en lípidos. La composición a activar puede comprender el diluyente acuoso como una segunda fase y, por lo tanto, puede no ser homogénea antes de la activación.

45 50 [0014] En otro aspecto, se proporciona aquí una composición que comprende una mezcla no acuosa de DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE en propilenglicol y glicerol, y un gas perfluorocarbonado.

55 60 [0015] En algunas formas de realización, la relación peso a peso a peso (p/p/p) de DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE (combinados) a propilenglicol a glicerol está en un rango de aproximadamente 1:50:50 a aproximadamente 1:1000:1000, o aproximadamente 1:100:100 a aproximadamente 1:600:700. En algunas formas de realización, la proporción p/p/p de DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE (combinados) a propilenglicol a glicerol es de aproximadamente 1:120:120 a aproximadamente 1:400:400, o de aproximadamente 1:120:120 a aproximadamente 1:300:300, o aproximadamente 1:120:120 a aproximadamente 1:250:250. En algunas formas de realización, la relación p/p/p de DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE (combinados) a propilenglicol a glicerol es de aproximadamente 1:100:150 a aproximadamente 1:150:200. En algunas formas de realización, la proporción p/p/p de DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE (combinados) a propilenglicol a glicerol es de aproximadamente 1:250:300 a aproximadamente 1:300:350. En algunas formas de realización, la proporción p/p/p de DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE (combinados) a propilenglicol a glicerol es de aproximadamente 1:500:600 a aproximadamente 1:600:700. En algunas formas de realización, la proporción p/p/p de DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE (combinados) a propilenglicol a glicerol es de aproximadamente 1:138:168 o aproximadamente 1:276:336 o aproximadamente 1:552:673.

65 [0016] En algunas formas de realización, la proporción p/p/p de DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE (combinados) a propilenglicol a glicerol es de aproximadamente 0,75 mg: 103,5 mg: 126,2 mg. En algunas formas de realización, la proporción p/p/p de DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE (combinados) a propilenglicol a glicerol es de aproximadamente 0,375 mg: 103,5 mg: 126,2 mg. En algunas formas de realización, la relación p/p/p de DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE (combinados) a propilenglicol a glicerol es de aproximadamente 0,1875 mg: 103,5 mg: 126,2 mg.

[0017] En otro aspecto, se proporciona aquí una composición que comprende una mezcla no acuosa de DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE en propilenglicol y un gas perfluorocarbonado.

60 65 [0018] En algunas formas de realización, la proporción p/p de DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE (combinados) a propilenglicol está en un rango de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:2000, o de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:1500, o aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:1000, o aproximadamente 1:20 a aproximadamente 1:2000, o aproximadamente 1:50 a aproximadamente 1:1000, o aproximadamente 1:50 a aproximadamente 1:600, o aproximadamente 1:100 a aproximadamente 1:600.

- 5 [0019] En algunas formas de realización, la proporción p/p de DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE (combinados) a propilenglicol es de aproximadamente 1:100 a aproximadamente 1:200, o de aproximadamente 1:100 a aproximadamente 1:150. En algunas formas de realización, la proporción p/p de DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE (combinados) a propilenglicol es de aproximadamente 1:200 a aproximadamente 1:350, o de aproximadamente 1:250 a aproximadamente 1:300. En algunas formas de realización, la proporción p/p de DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE (combinados) a propilenglicol es de aproximadamente 1:500 a aproximadamente 1:600, o de aproximadamente 1:525 a aproximadamente 1:575. En algunas formas de realización, la proporción p/p de DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE (combinados) a propilenglicol es de aproximadamente 1:138 o aproximadamente 1:276 o aproximadamente 1:552.
- 10 [0020] En algunas formas de realización, la proporción p/p de DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE (combinados) a propilenglicol es de aproximadamente 0,75 mg: 103,5 mg o aproximadamente 0,375 mg: 103,5 mg o aproximadamente 0,1875 mg: 103,5 mg.
- 15 [0021] En otro aspecto, se proporciona aquí una composición que comprende una mezcla no acuosa de DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE en glicerol y un gas perfluorocarbonado.
- 20 [0022] En algunas formas de realización, la relación p/p de DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE (combinados) a glicerol está en un rango de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:2000, o de aproximadamente 1:15 a aproximadamente 1:1500., o aproximadamente 1:50 a aproximadamente 1:1000, o aproximadamente 1:50 a aproximadamente 1:7000, o aproximadamente 1:100 a aproximadamente 1:700. En algunas formas de realización, la relación p/p de DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE (combinados) a glicerol es de aproximadamente 1:100 a aproximadamente 1:200 o de aproximadamente 1:125 a aproximadamente 1:175. En algunas formas de realización, la proporción p/p de DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE (combinados) a glicerol es de aproximadamente 1:250 a aproximadamente 1:400, o de aproximadamente 1:300 a aproximadamente 1:350. En algunas formas de realización, la relación p/p de DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE (combinados) a glicerol es de aproximadamente 1:550 a aproximadamente 1:700 o de aproximadamente 1:650 a aproximadamente 1:700. En algunas formas de realización, la proporción p/p de DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE (combinados) a glicerol es de aproximadamente 1:168 o aproximadamente 1:336 o aproximadamente 1:673.
- 25 [0023] En algunas formas de realización, la proporción p/p de DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE (combinados) a glicerol es de aproximadamente 0,75 mg: 126,2 mg, o aproximadamente 0,375 mg: 126,2 mg, o aproximadamente 0,1875 mg: 126,2 mg.
- 30 [0024] En otros aspectos, aquí se proporciona un recipiente que comprende cualquiera de las composiciones anteriores.
- 35 [0025] En algunas formas de realización, el recipiente es un recipiente de una sola cámara.
- [0026] En algunas formas de realización, el recipiente comprende una primera y una segunda cámara, y en el que la mezcla no acuosa está en la primera cámara y el gas perfluorocarbonado está en la segunda cámara.
- 40 [0027] En otros aspectos, se proporciona aquí un recipiente que comprende cualquiera de las composiciones anteriores en una primera cámara y un diluyente acuoso en una segunda cámara.
- 45 [0028] En otros aspectos, en el presente documento se proporciona un recipiente que comprende cualquiera de las composiciones anteriores y un diluyente acuoso, en el que la mezcla no acuosa se proporciona en una primera cámara, el gas de perfluorocarbono se proporciona en una segunda cámara y el diluyente acuoso se dispone en una tercera cámara.
- 50 [0029] En algunas formas de realización, el diluyente acuoso es una solución salina acuosa. En algunas formas de realización, el diluyente acuoso es una solución tamponada acuosa. En algunas formas de realización, el diluyente acuoso es una solución salina tamponada acuosa.
- 55 [0030] En otro aspecto, se proporciona aquí una composición que comprende una mezcla de DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE en forma sólida y un gas perfluorocarbonado. La mezcla de DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE en forma sólida puede ser una forma sólida combinada (p. ej., una mezcla relativamente homogénea de los lípidos) o puede ser una combinación de las formas sólidas de cada lípido (p. ej., que puede o puede no ser una mezcla homogénea de los lípidos). En otro aspecto, se proporciona aquí un recipiente que comprende la composición en forma sólida anterior. En algunas formas de realización, el recipiente es un recipiente que tiene una sola cámara. En algunas formas de realización, el recipiente es un recipiente que tiene dos cámaras, donde una primera cámara comprende DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE en forma sólida, y una segunda cámara comprende el gas perfluorocarbonado. En algunas formas de realización, el recipiente es un recipiente que tiene dos cámaras, donde una primera cámara comprende DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE en forma sólida y el gas perfluorocarbonado, y una segunda cámara comprende (a) propilenglicol, (b) propilenglicol y glicerol, o (c) glicerol. Las proporciones p/p/p de los lípidos combinados con propilenglicol y/o glicerol pueden ser como se indica anteriormente. En algunas formas de realización, el recipiente es un recipiente que tiene tres cámaras, donde una primera cámara comprende DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE en forma sólida, una segunda cámara comprende el gas perfluorocarbono y una tercera cámara comprende (a) propilenglicol, (b) propilenglicol y glicerol, o (c) glicerol. En algunas formas de realización, el recipiente es un recipiente que tiene una cámara adicional que comprende un diluyente acuoso.

- [0031] En otro aspecto, se proporciona aquí una composición que comprende microesferas de gas encapsuladas en lípidos que comprenden DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE y gas perfluorocarbonado, en una solución no acuosa que comprende propilenglicol y glicerol.
- [0032] En otro aspecto, se proporciona aquí una composición que comprende microesferas de gas encapsuladas en lípidos que comprenden DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE, en una solución no acuosa que comprende propilenglicol.
- [0033] En otro aspecto, se proporciona aquí una composición que comprende microesferas de gas encapsuladas en lípidos que comprenden DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE y gas perfluorocarbonado, en una solución no acuosa que comprende glicerol.
- [0034] En algunas formas de realización, las microesferas de gas encapsuladas en lípidos tienen un diámetro medio que oscila entre aproximadamente 1,0 micrómetros y aproximadamente 2,0 micrómetros. En algunas formas de realización, las microesferas de gas encapsuladas en lípidos tienen un diámetro medio que oscila entre aproximadamente 1,2 micrómetros y aproximadamente 2,0 micrómetros. En algunas formas de realización, las microesferas de gas encapsuladas en lípidos tienen un diámetro medio de aproximadamente 1,4 a 1,8 micrómetros.
- [0035] En algunas formas de realización, las microesferas de gas encapsuladas en lípidos están presentes en la composición a una concentración superior a $10^8/\text{ml}$.
- [0036] Varias formas de realización se aplican igualmente a las composiciones anteriores y se enumerarán ahora.
- [0037] En algunas formas de realización, la mezcla no acuosa comprende menos del 5 % de agua en peso (es decir, peso de agua por peso de la combinación de lípido y propilenglicol y/o glicerol). En algunas formas de realización, la mezcla no acuosa comprende 1-4 % de agua en peso. En algunas formas de realización, la mezcla no acuosa comprende menos del 1 % en peso de agua.
- [0038] En algunas formas de realización, la composición no contiene sal, lo que significa que puede comprender los contraíones de los lípidos en la composición, pero está libre de otros iones. Los contraíones de lípidos son típicamente cationes como el sodio. Por tanto, en algunas formas de realización la composición no comprende aniones. En algunas formas de realización, la composición está libre de cloruro de sodio. En algunas formas de realización, la composición está libre de iones de cloruro.
- [0039] En algunas formas de realización, la composición comprende además un tampón. En algunas formas de realización, la composición comprende además un tampón sin fosfato. En algunas formas de realización, la composición comprende además un tampón de acetato, un tampón de benzoato o un tampón de salicilato.
- [0040] En algunas formas de realización, DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE combinados están presentes en una concentración de aproximadamente 0,9 a aproximadamente 8 mg de lípido por ml de mezcla no acuosa, aproximadamente 0,9 mg a aproximadamente 7,5 mg de lípido por ml de mezcla no acuosa, de aproximadamente 2 mg a aproximadamente 7,5 mg de lípido por ml de mezcla no acuosa, o de aproximadamente 2 mg a aproximadamente 4 mg de lípido por ml de mezcla no acuosa. En algunas formas de realización, DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE combinados están presentes en una concentración de aproximadamente 0,94 mg a aproximadamente 7,5 mg de lípido por ml de mezcla no acuosa, o aproximadamente 1,875 mg a aproximadamente 7,5 mg de lípido por ml de mezcla no acuosa, incluyendo de aproximadamente 1,875 mg a aproximadamente 3,75 mg de lípido por ml de mezcla no acuosa, y de aproximadamente 3,75 a aproximadamente 7,5 mg de lípido por ml de mezcla no acuosa. En algunas formas de realización, DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE están presentes en una proporción de aproximadamente 10: 82: 8 (% molar).
- [0041] En algunas formas de realización, la mezcla no acuosa, sola o en combinación con un gas de perfluorocarbono, comprende menos del 5 % de impurezas cuando se almacena a temperatura ambiente durante aproximadamente 3 meses. En algunas formas de realización, la mezcla no acuosa, sola o en combinación con un gas de perfluorocarbono, comprende menos impurezas que DEFINITY® cuando ambos se almacenan a temperatura ambiente (es decir, cuando la composición y DEFINITY® se almacenan a temperatura ambiente).
- [0042] En algunas formas de realización, el gas de perfluorocarbono es gas de perfluoropropano.
- [0043] En algunas formas de realización, PEG5000-DPPE es MPEG5000-DPPE.
- [0044] En algunas formas de realización, la composición se proporciona en un vial. En algunas formas de realización, la composición se proporciona en un vial con un volumen real menor o igual a aproximadamente 3,8 ml.
- [0045] En algunas formas de realización, la composición se proporciona en un vial con fondo en V. En algunas formas de realización, la composición se proporciona en un vial con fondo plano. En algunas formas de realización, la composición se proporciona en un vial con un fondo redondeado. En algunas formas de realización, el vial es un vial de vidrio. En algunas formas de realización, se proporciona una composición que comprende una mezcla no acuosa de DPPA, DPPC

5 y PEG5000-DPPE combinados en propilenglicol y glicerol, y un gas perfluorocarbonado, en un vial de Nipro (Wheaton) de 2 ml a una concentración de lípidos de aproximadamente 3,75 mg/ml. En algunas formas de realización, se proporciona una composición que comprende una mezcla no acuosa de DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE combinados en propilenglicol y glicerol, y un gas perfluorocarbonado, en un vial Schott de 2 ml con una concentración de lípidos de aproximadamente 3,75 mg/ml.

10 [0046] En algunas formas de realización, la composición se proporciona en un recipiente de una sola cámara. En algunas formas de realización, la composición se proporciona en un recipiente de múltiples cámaras. En algunas formas de realización, la composición se proporciona en una primera cámara y se proporciona un diluyente acuoso en una segunda cámara. El diluyente acuoso puede ser una solución salina o puede estar libre de sal. El diluyente acuoso puede ser una solución tamponada o puede estar libre de tampón. El diluyente acuoso puede ser una solución salina tamponada.

15 [0047] En otro aspecto, se proporciona aquí un kit que comprende cualquiera de las composiciones anteriores en un recipiente. En algunas formas de realización, el recipiente es un recipiente de una sola cámara.

20 [0048] En algunas formas de realización, el kit comprende un segundo recipiente. En algunas formas de realización, el segundo recipiente comprende un diluyente acuoso. En algunas formas de realización, el segundo recipiente es una jeringa precargada.

25 [0049] En algunas formas de realización, el recipiente es un recipiente de múltiples cámaras. En algunas formas de realización, el primer recipiente comprende los lípidos (es decir, DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE) en forma sólida, y el segundo recipiente comprende propilenglicol o glicerol o propilenglicol y glicerol. Un tercer recipiente puede comprender un diluyente acuoso.

30 [0050] En algunas formas de realización, el primer recipiente comprende los lípidos en propilenglicol, y el segundo recipiente comprende glicerol o diluyente acuoso. Alternativamente, el segundo recipiente comprende glicerol y un tercer recipiente comprende diluyente acuoso.

35 [0051] En algunas formas de realización, el primer recipiente comprende los lípidos en glicerol, y el segundo recipiente comprende propilenglicol o diluyente acuoso. Alternativamente, el segundo recipiente comprende propilenglicol y un tercer recipiente comprende diluyente acuoso.

[0052] En algunas formas de realización, el primer recipiente comprende los lípidos en propilenglicol y glicerol, y el segundo recipiente comprende un diluyente acuoso.

35 [0053] En algunas formas de realización, el kit comprende además un dispositivo de activación tal como, pero sin limitarse a un dispositivo VIALMIX®.

40 [0054] También se ha encontrado de acuerdo con la invención que algunas de las mezclas no acuosas (es decir, algunas de estas formulaciones de lípidos modificadas) pueden usarse para generar microesferas de gas encapsuladas en lípidos, a través de un proceso denominado en el presente documento "activación", ya sea como una mezcla no acuosa o después de la simple adición de diluyente acuoso sin tener en cuenta el grado de homogeneidad de la solución combinada. Esto fue sorprendente porque ciertos agentes de contraste comercializados se fabrican mediante la activación de una mezcla monofásica preformulada que comprende lípidos en una solución acuosa en exceso. Antes de la invención no se sabía que podían generarse microesferas encapsuladas en lípidos de tamaño y número adecuados sin formular previamente el lípido en una solución acuosa o en ausencia de solución acuosa.

45 [0055] Por lo tanto, en otro aspecto, se proporciona aquí un método para formar un agente de contraste de ultrasonido que comprende activar cualquiera de las mezclas no acuosas anteriores en presencia de un gas perfluorocarbonado, y en presencia o ausencia de un diluyente acuoso, para formar microesferas de gas encapsuladas en lípidos.

50 [0056] En otro aspecto, aquí se proporciona un método para formar un agente de contraste de ultrasonido que comprende combinar cualquiera de las mezclas no acuosas anteriores con un diluyente acuoso en presencia de un gas de perfluorocarbono, y activar la combinación para formar microesferas de gas encapsuladas en lípidos. El diluyente acuoso puede agregarse a la mezcla no acuosa con o sin agitación u otra modificación (p. ej., calentamiento, etc.), y dicha mezcla combinada puede activarse en presencia de un gas perfluorocarbonado, independientemente de si se trata de un gas de perfluorocarbono simple, mezcla de fases (es decir, las fases lipídica y acuosa se han mezclado sustancialmente y/o la mezcla parece relativamente homogénea) o una mezcla de dos fases (es decir, las fases lipídica y acuosa no se han mezclado sustancialmente y/o la mezcla no parece relativamente homogénea).

60 [0057] En otro aspecto, se proporciona aquí un método para formar un agente de contraste de ultrasonido que comprende combinar algunas de las mezclas no acuosas anteriores con propilenglicol solo o propilenglicol y un diluyente acuoso (simultáneamente o consecutivamente), y activar la combinación en la presencia de gas perfluorocarbonado para formar microesferas de gas encapsuladas en lípidos.

65 [0058] En otro aspecto, aquí se proporciona un método para formar un agente de contraste de ultrasonido que comprende

combinar algunas de las mezclas no acuosas anteriores con glicerol solo o glicerol y un diluyente acuoso (simultáneamente o consecutivamente), y activar la combinación en presencia de gas perfluorocarbonado para formar microesferas de gas encapsuladas en lípidos.

5 [0059] Las mezclas no acuosas pueden estar a temperatura ambiente y/o pueden haber sido almacenadas a temperatura ambiente antes de su uso. El almacenamiento a temperatura ambiente puede haber oscilado entre días, meses o años.

[0060] En algunas formas de realización, la activación se produce durante 20-45 segundos. En algunas formas de realización, la activación se produce durante 60 a 120 segundos.

10 [0061] En algunas formas de realización, el método comprende además diluir las microesferas de gas encapsuladas en lípidos en diluyente acuoso adicional.

15 [0062] En algunas formas de realización, el método comprende además administrar las microesferas de gas encapsuladas en lípidos a un sujeto que necesita imágenes de ultrasonido de contraste.

[0063] En algunas formas de realización, la composición está en un vial. En algunas formas de realización, la composición está en una jeringa. En algunas formas de realización, la composición se encuentra en un recipiente de una sola cámara. En algunas formas de realización, la composición se encuentra en un recipiente de varias cámaras.

20 [0064] En aún otros aspectos, en el presente documento se proporcionan métodos para detectar y/o medir los niveles de impurezas en cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento. Dichos métodos son particularmente útiles para evaluar la integridad de una composición y pueden usarse para determinar si la composición es adecuada para su uso o debe desecharse. Los métodos se pueden realizar en un lote recién fabricado de las composiciones descritas 25 en el presente documento, o se pueden realizar en un lote que ha estado en tránsito o almacenado durante un período de tiempo después de su fabricación.

30 [0065] El método comprende detectar e identificar componentes de la muestra. En algunas formas de realización, el método comprende además la separación de los componentes en función de las propiedades fisicoquímicas tales como, entre otras, la carga y la lipofilicidad, opcionalmente antes de la detección e identificación. En algunas formas de realización, la separación se realiza antes de la detección y la muestra se diluye con solución salina antes de la separación. En algunas formas de realización, la muestra se mezcla hasta obtener una solución homogénea. Las técnicas de separación basadas en propiedades fisicoquímicas son conocidas en la técnica e incluyen, pero no se limitan a HPLC tal como HPLC de fase inversa. A continuación, las impurezas se detectan y, opcionalmente, se miden utilizando técnicas 35 como, entre otras, la detección de aerosoles cargados (CAD). En otra forma de realización, la detección por dispersión de luz evaporativa (ELSD) puede usarse después de la separación. Un ejemplo de dicha detección se describe con mayor detalle en este documento.

[0066] Estos y otros aspectos y formas de realización de la invención se describirán con mayor detalle en este documento.

40 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0067]

45 FIG. 1. Estabilidad de una formulación de mezcla de lípidos/propilenglicol (LB/PG) frente a DEFINITY®.

FIG. 2. Estabilidad de una formulación de mezcla de lípidos/propilenglicol/glicerol (LB/PG/G) frente a DEFINITY®.

50 FIG. 3. Estabilidad de una formulación de mezcla de lípidos/propilenglicol/glicerol/tampón (LB/PG/G/tampón) frente a DEFINITY®.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

55 [0068] Se ha encontrado, de acuerdo con la invención, que las formulaciones de lípidos para generar microesferas de gas encapsuladas en lípidos para ser utilizadas como agentes de formación de imágenes por ultrasonido se pueden mantener a temperatura ambiente, incluso a temperatura ambiente durante períodos prolongados de tiempo, sin degradación significativa. Previamente, se pensaba que las formulaciones lipídicas para ser utilizadas con el mismo propósito tuvieron que ser almacenadas a 4 °C para evitar la degradación. Se ha encontrado, de acuerdo con la invención, que el almacenamiento de estas formulaciones lipídicas modificadas a temperatura ambiente durante varios meses da como resultado menos del 5% de impurezas, un nivel inferior al presente en un agente de contraste de ultrasonido comercializado actualmente cuando se almacena a temperatura ambiente durante el mismo período de tiempo.

60 [0069] Es importante destacar que el almacenamiento de estas formulaciones de lípidos modificadas, denominadas mezclas no acuosas que contienen lípidos, a temperatura ambiente, incluido el almacenamiento a largo plazo a temperatura ambiente, no afecta negativamente a su capacidad para formar microesferas para usar como contraste de ultrasonido como se demuestra por la capacidad de formar microesferas de tamaño y cantidad comparables a los agentes

de contraste de ultrasonido comercializados actualmente. Estas formulaciones de lípidos modificadas son, por lo tanto, más robustas que ciertas formulaciones de lípidos comercializadas, al menos en vista de esta estabilidad mejorada.

[0070] Las nuevas formulaciones de lípidos descritas aquí son más fáciles de usar que ciertas formulaciones existentes, al menos en parte porque no requieren refrigeración. Por el contrario, ciertas formulaciones de lípidos actualmente comercializadas deben refrigerarse durante todo su período de almacenamiento, pero luego se administran a los pacientes a temperatura ambiente. Esto significa que dichas formulaciones primero deben calentarse desde aproximadamente 4 °C hasta aproximadamente la temperatura ambiente antes de que puedan usarse. Por el contrario, las formulaciones de lípidos modificadas que se proporcionan en el presente documento se pueden usar esencialmente "listas para usar" sin esperar un período de tiempo requerido para alcanzar la temperatura ambiente. Esto hace que estas formulaciones modificadas sean más fáciles de usar y también facilita su uso inmediato, por ejemplo, en situaciones de emergencia.

[0071] Además, debido a la naturaleza inherentemente más robusta de las formulaciones de lípidos modificadas, hay menos posibilidades de que su integridad se haya visto comprometida antes del uso, incluso, por ejemplo, durante el transporte y el almacenamiento. En la práctica actual, si algunas de las formulaciones comercializadas se han almacenado durante un período de tiempo significativo a temperatura ambiente, entonces dichas formulaciones pueden ser de calidad cuestionable y, por lo tanto, es posible que deban desecharse. Con las nuevas formulaciones, un usuario final no necesita estar tan preocupado por los antecedentes o el tratamiento de la formulación. Por lo tanto, además de una mayor facilidad de uso, también debería haber menos formulaciones de lípidos modificadas desperdiciadas debido a problemas de integridad.

[0072] Estas formulaciones lipídicas modificadas están destinadas a ser utilizadas como agentes de contraste de ultrasonidos o como productos intermedios de los mismos. Como tales, y como se describe en el presente documento, cuando se proporcionan junto con un gas, pueden activarse para formar microesferas de gas encapsuladas en lípidos con o sin un diluyente acuoso. Además, cuando se utiliza un diluyente acuoso, dichas formulaciones pueden activarse tras la simple adición del diluyente acuoso sin necesidad de formular previamente o mezclar previamente la mezcla no acuosa y el diluyente acuoso. Como ejemplo, la adición del diluyente acuoso puede dar como resultado una mezcla heterogénea o de dos fases y esta mezcla de dos fases puede activarse. Ciertos agentes de contraste de ultrasonido comercializados se proporcionan como mezclas monofásicas, relativamente homogéneas y preformuladas de lípidos formulados en una matriz acuosa, y se activan en esta forma esencialmente formulada en agua. Por el contrario, las formulaciones de lípidos modificadas que se proporcionan en el presente documento pueden activarse en su forma no acuosa o pueden activarse después de la simple adición de un diluyente acuoso sin necesidad de formular previamente los lípidos y el diluyente acuoso o que la mezcla sea homogénea. Esto, a su vez, significa que el volumen de la formulación de lípidos puede ser mucho menor en el momento de la activación (y en el momento del envío y almacenamiento) y, si es necesario, puede diluirse justo antes de su uso. Esto también significa que es menos probable que la integridad de la formulación se vea comprometida porque es posible activarla sin agregar un diluyente acuoso, y luego, si la formulación no se usa, simplemente almacenar la formulación para su uso posterior. Si, en cambio, la mezcla no acuosa tuviera que combinarse con una solución acuosa para activarse, entonces este tipo de flexibilidad se perdería en esta circunstancia, y la formulación tendría que desecharse, lo que de nuevo daría lugar a un desperdicio innecesario.

[0073] En consecuencia, la invención se basa, en parte, en el descubrimiento inesperado y sorprendente de que los lípidos utilizados para fabricar microesferas de gas encapsuladas en lípidos, que son adecuadas como agentes de contraste de ultrasonido, cuando se formulan en una mezcla no acuosa, pueden ser almacenados durante largos períodos de tiempo a temperatura ambiente sin degradación significativa. La mezcla no acuosa puede comprender propilenglicol o glicerol, o una mezcla de propilenglicol y glicerol. Es importante destacar que las formulaciones de lípidos que se proporcionan en este documento producen microesferas de gas encapsuladas en lípidos a la par de las producidas por el agente de contraste de ultrasonidos comercializado actualmente, DEFINITY®, particularmente con respecto a la concentración y el tamaño de las microesferas, que afectan las propiedades acústicas de las microesferas. Tales formulaciones de lípidos son más sólidas e insensibles al almacenamiento, incluido el almacenamiento a largo plazo, a temperatura ambiente que DEFINITY®.

[0074] DEFINITY® es un agente de contraste de ultrasonido que está aprobado por la FDA para su uso en sujetos con ecocardiogramas subóptimos para opacificar la cámara del ventrículo izquierdo y mejorar la delimitación del borde endocárdico del ventrículo izquierdo. DEFINITY® se proporciona en un vial que comprende una solución monofásica que comprende DPPA, DPPC y MPEG5000-DPPE en una proporción de % molar de 10:82:8 en una solución acuosa, y un espacio de cabeza que comprende gas perfluoropropano. Antes de su administración a un sujeto, DEFINITY® se activa mediante agitación mecánica (en lo sucesivo denominado "DEFINITY® activado"). La activación da como resultado la formación de un número suficiente de microesferas de gas encapsuladas en lípidos que tienen un diámetro medio de 1,1 a 3,3 micras. Sin embargo, DEFINITY® debe refrigerarse hasta justo antes de su uso. Esto limita su utilidad particularmente en entornos que carecen de refrigeración adecuada, particularmente durante el período de almacenamiento.

[0075] En el presente documento se proporcionan, entre otras cosas, composiciones para usar en la fabricación de microesferas de gas encapsuladas en lípidos y composiciones y usos de las propias microesferas de gas encapsuladas en lípidos. La invención proporciona además métodos de fabricación de dichas microesferas.

Formulaciones de almacenamiento

[0076] Estas nuevas formulaciones comprenden una mezcla no acuosa de uno o más lípidos y propilenglicol (PG), o glicerol (G), o propilenglicol y glicerol (PG/G). Se ha encontrado, de acuerdo con la invención, que estas formulaciones pueden almacenarse a temperaturas más altas durante períodos de tiempo más prolongados de lo que era posible anteriormente utilizando formulaciones de agentes de contraste de ultrasonidos existentes, sin una degradación significativa. Por lo tanto, estas composiciones se pueden usar en una gama más amplia de configuraciones sin una preocupación particular acerca de cómo se manejó la formulación antes del uso.

[0077] La estabilidad mejorada de estas nuevas formulaciones se demuestra en los Ejemplos, donde se muestra que las formulaciones de lípidos en propilenglicol o propilenglicol y glicerol se pueden mantener durante 3 meses o más con menos degradación que la que se observa en una formulación DEFINITY® mantenido a temperatura ambiente. Los ejemplos demuestran que estas formulaciones se pueden almacenar durante aproximadamente 3 a 6 meses sin una degradación significativa.

[0078] La mezcla no acuosa de lípidos en propilenglicol, o glicerol, o propilenglicol y glicerol se refiere a una mezcla que tiene menos o igual al 5% de agua en peso (es decir, peso de agua por peso de la combinación de lípidos y propilenglicol y/o glicerol). En algunos casos, la mezcla no acuosa comprende menos del 5 % de agua (p/p), 1-4 % de agua (p/p), 1-3 % de agua (p/p), 2-3 % de agua (p/p). /p), o 1-2% de agua (p/p). En algunos casos, la mezcla no acuosa comprende menos del 1 % de agua (p/p). El contenido de agua se puede medir al final de la fabricación (y antes del almacenamiento a largo plazo) o se puede medir después del almacenamiento, incluido el almacenamiento a largo plazo, y justo antes del uso.

[0079] La mezcla no acuosa también puede estar libre de sal con la intención de que no contenga sales distintas de los contraíones de lípidos. Más específicamente, y a modo de ejemplo, los lípidos como DPPA y DPPE se proporcionan típicamente como sales de sodio. Como se usa aquí, una mezcla no acuosa sin sal puede comprender tales contraíones (por ejemplo, sodio si se usan DPPA y/o DPPE) pero no contienen otros iones. En algunos casos, la mezcla no acuosa está libre de cloruro de sodio o cloruro.

[0080] La mezcla no acuosa puede comprender un tampón. El tampón puede ser un tampón de acetato, un tampón de benzoato o un tampón de salicilato, aunque no está tan limitado. Los tampones sin fosfato se prefieren en algunos casos debido a sus perfiles de disolución en las mezclas no acuosas proporcionadas en este documento. En algunos casos, se puede usar un tampón de fosfato (p. ej., después o al mismo tiempo que se agrega un diluyente acuoso).

[0081] En algunas formas de realización, la mezcla no acuosa comprende, consiste en, o consiste esencialmente en (a) uno o más lípidos, (b) propilenglicol, o glicerol, o propilenglicol/glicerol, y (c) un compuesto tampón no de fosfato. Dichas mezclas no acuosas pueden proporcionarse junto con un gas tal como un gas de perfluorocarbono o pueden proporcionarse solas (es decir, en ausencia de un gas). Dichas mezclas no acuosas se pueden proporcionar en cantidades de un solo uso y/o en recipientes de un solo uso, con o sin gas. Dichos recipientes serán típicamente estériles.

[0082] El tampón sin fosfato puede ser, entre otros, un tampón de acetato, un tampón de benzoato, un tampón de salicilato, un tampón de dietanolamina, un tampón de trietanolamina, un tampón de borato, un tampón de carbonato, un tampón de glutamato, un tampón succinato, tampón malato, tampón tartrato, tampón glutarato, tampón acónito, tampón cítrico, tampón acético, tampón lactato, tampón glicerato, tampón gluconato y tampón tris. En algunos casos, el tampón es un tampón de fosfato. Está dentro de la habilidad del técnico ordinario determinar y optimizar la concentración de tampón para cada tipo de tampón.

[0083] La temperatura ambiente como se usa aquí significa una temperatura de 15-30 °C, incluyendo 18-25 °C y 20-25 °C, y todas las temperaturas intermedias. La temperatura ambiente puede controlarse (p. ej., mantenerse termostáticamente) para que esté a dicha temperatura, pero no está tan limitada.

Lípidos

[0084] Estas nuevas formulaciones comprenden uno y típicamente más de un lípido. Como se usa en el presente documento, "lípidos" o "lípidos totales" o "lípidos combinados" significa una mezcla de lípidos.

[0085] Los lípidos se pueden proporcionar en sus formas individuales de estado sólido (p. ej., en polvo). Alternativamente, los lípidos se pueden proporcionar como una mezcla de lípidos. Los métodos para preparar una mezcla de lípidos incluyen los descritos en la Patente de EE. UU. N° 8.084.056 y la solicitud PCT publicada WO 99/36104. Una mezcla de lípidos, tal como se usa en este documento, pretende representar dos o más lípidos que se han combinado dando como resultado una mezcla de lípidos más homogénea que la que podría obtenerse de otro modo mediante la simple mezcla de lípidos en su forma de polvo individual. La mezcla de lípidos está generalmente en forma de polvo. Una mezcla de lípidos se puede preparar a través de un proceso de liofilización de suspensión acuosa o un proceso de precipitación de disolución de disolvente orgánico utilizando disolventes orgánicos. En el proceso de liofilización en suspensión acuosa, los lípidos deseados se suspenden en agua a una temperatura elevada y luego se concentran por liofilización.

[0086] El método de disolución en disolvente orgánico implica los siguientes pasos:

(a) Poner en contacto los lípidos deseados (p. ej., DPPA, DPPC y MPEG5000 DPPE) con un primer sistema disolvente no acuoso. Este sistema es típicamente una combinación de solventes, por ejemplo CHCl₃/MeOH, CH₂Cl₂/MeOH y tolueno/MeOH. Preferiblemente, el primer disolvente no acuoso es una mezcla de tolueno y metanol. Puede ser deseable calentar la solución de lípidos a una temperatura suficiente para lograr la disolución completa. Tal temperatura es preferiblemente de aproximadamente 25 a 75 °C, más preferiblemente de aproximadamente 35 a 65 °C. Después de la disolución, la materia extraña no disuelta puede eliminarse mediante filtración en caliente o enfriamiento a temperatura ambiente y luego filtrado. Se pueden usar métodos conocidos de filtración (p. ej., filtración por gravedad, filtración al vacío o filtración a presión).

(b) La solución luego se concentra a un gel espeso/semisólido. La concentración se realiza preferentemente por destilación al vacío. También se pueden utilizar otros métodos para concentrar la solución, como la evaporación rotatoria. La temperatura de este paso es preferentemente de aproximadamente 20 a 60 °C, más preferentemente de 30 a 50 °C.

(c) A continuación, el gel espeso/semisólido se dispersa en un segundo disolvente no acuoso. La mezcla se suspende, preferiblemente cerca de la temperatura ambiente (p. ej., 15-30 °C). Los segundos disolventes no acuosos útiles son aquellos que provocan la precipitación de los lípidos de la solución filtrada. El segundo disolvente no acuoso es preferiblemente metil t-butíl éter (MTBE). Pueden usarse otros éteres y alcoholos.

(d) A continuación, se recogen los sólidos producidos tras la adición del segundo disolvente no acuoso. Preferiblemente, los sólidos recogidos se lavan con otra porción del segundo disolvente no acuoso (p. ej., MTBE). La recolección se puede realizar mediante filtración al vacío o centrifugación, preferiblemente a temperatura ambiente. Después de la recolección, se prefiere que los sólidos se sequen al vacío a una temperatura de aproximadamente 20-60 °C.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

[0087] El contenido de la patente de EE. UU. N.º 8.084.056 y la solicitud PCT publicada WO 99/36104 se refieren al método para generar una mezcla de lípidos.

[0088] El proceso de disolución-precipitación con disolvente orgánico se prefiere al proceso de suspensión/liofilización acuosa por una serie de razones, como se describe en la patente de EE. UU. 8.084.056 y solicitud PCT publicada WO 99/36104, incluyendo el sólido lipídico uniformemente distribuido que resulta usando el método de disolución orgánica.

[0089] Alternativamente, los lípidos pueden proporcionarse como polvos individuales que se disuelven juntos o individualmente directamente en propilenglicol, glicerol o propilenglicol/glicerol para formar la mezcla no acuosa.

[0090] Como se usa en el presente documento, una solución de lípidos es una solución que comprende una mezcla de lípidos. De manera similar, una formulación lipídica es una formulación que comprende uno o más lípidos. Los lípidos pueden ser lípidos catiónicos, aniónicos o neutros. Los lípidos pueden ser de origen natural, sintético o semisintético, incluidos, por ejemplo, ácidos grasos, lípidos fluorados, grasas neutras, fosfátidos, aceites, aceites fluorados, glicolípidos, agentes tensioactivos (tensioactivos y fluorotensioactivos), alcoholos alifáticos, ceras, terpenos y esteroides.

[0091] Al menos uno de los lípidos puede ser un fosfolípido y, por lo tanto, la combinación de lípidos puede denominarse combinación de fosfolípidos. Un fosfolípido, tal como se usa en el presente documento, es una sustancia grasa que contiene una(s) cadena(s) hidrocarbonada(s) oleosa(s) (hidrofóbica(s) con un grupo de cabeza fosfórico polar (hidrofílico)). Los fosfolípidos son anfíflicos. Forman espontáneamente límites y vesículas cerradas en medios acuosos.

[0092] Preferiblemente, todos los lípidos son fosfolípidos, preferiblemente 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidicolina (DPPC); ácido 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatídico (DPPA); y 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (DPPE). DPPA y DPPE se pueden proporcionar como formas de sal monosódica.

[0093] En algunos casos, los componentes lipídicos pueden modificarse para disminuir la reactividad de la microesfera con el entorno circundante, incluido el entorno *in vivo*, extendiendo así su vida media. Los lípidos que contienen polímeros, como la quitina, el ácido hialurónico, la polivinilpirrolidona o el polietilenglicol (PEG), también se pueden utilizar para este fin. Los lípidos conjugados con PEG se denominan aquí lípidos PEGilados. Preferiblemente, el lípido PEGilado es DPPEPEG o DSPE-PEG.

[0094] La conjugación del lípido con el polímero tal como PEG puede lograrse mediante una variedad de enlaces o uniones tales como enlaces amida, carbamato, amina, éster, éter, tioéster, tioamida y disulfuro (tioéster), entre otros.

[0095] Los grupos terminales en el PEG pueden ser, entre otros, hidroxi-PEG (HO-PEG) (o un derivado reactivo del mismo), carboxi-PEG (COOH-PEG), metoxi-PEG (MPEG) o otro grupo alquilo inferior, por ejemplo, como en iso-propoxi-PEG o t-butoxiPEG, amino PEG (NH₂PEG) o tiol (SH-PEG).

[0096] El peso molecular de PEG puede variar de aproximadamente 500 a aproximadamente 10000, incluyendo de aproximadamente 1000 a aproximadamente 7500, y de aproximadamente 1000 a aproximadamente 5000. En algunas formas de realización importantes, el peso molecular de PEG es de aproximadamente 5000. En consecuencia, DPPE - PEG5000 o DSPE-PEG5000 se refiere a DPPE o DSPE que tiene unido un polímero de PEG que tiene un peso molecular de aproximadamente 5000.

[0097] El porcentaje de lípidos PEGilados en relación con la cantidad total de lípidos en la solución lipídica, en base molar está en o entre aproximadamente 2% y aproximadamente 20%. En varias formas de realización, el porcentaje de lípidos PEGilados con respecto a la cantidad total de lípidos es de o entre 5 por ciento en moles y aproximadamente 15 por ciento en moles.

[0098] Preferiblemente, los lípidos son 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatídico, sal monosódica (DPPA) y N-(polietilenglicol 5000 carbamoilo)-1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina, sal monosódica (PEG5000-DPPE). El polietilenglicol 5000 carbamoilo puede ser metoxi polietilenglicol 5000 carbamoilo.

10 En algunas formas de realización importantes, los lípidos pueden ser uno, dos o los tres de DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE. PEG5000-DPPE puede ser MPEG5000-DPPE o HO-PEG5000-DPPE.

[0099] Una amplia variedad de lípidos, como los descritos en Unger et al. La Patente de Estados Unidos Nº 5.469.854 puede utilizarse en el presente proceso. Los lípidos adecuados incluyen, por ejemplo, ácidos grasos, lisolípidos, lípidos fluorados, fosfocolinas, tales como los asociados con factores de activación de plaquetas (PAF) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, Ala.), que incluyen 1-alquil-2-acetilo-sn-glicero 3-fosfocolinas y 1-alquil-2-hidroxi-sn-glicero 3-fosfocolinas; fosfatidilcolina con lípidos tanto saturados como insaturados, incluyendo dioleolifosfatidilcolina; dimiristoilfosfatidilcolina; dipentadecanoilfosfatidilcolina; dilauroilfosfatidilcolina; 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC); diestearoilfosfatidilcolina (DSPC); y diaraquidonilfosfatidilcolina (DAPC); fosfatidiletanolaminas, tales como dioleoilfosfatidiletanolamina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (DPPE) y diestearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE); fosfatidilserina; fosfatidilgliceroles, incluyendo diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG); fosfatidilinositol; esfingolípidos tales como esfingomielina; glicolípidos tales como gangliósidos GM1 y GM2; glucolípidos; sulfátidos; glicoesfingolípidos; ácidos fosfatídicos, tales como ácido 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatídico (DPPA) y ácido diestearoilfosfatídico (DSPA); ácido palmítico; ácido esteárico; ácido araquidónico; y ácido oleico.

[0100] Otros lípidos adecuados incluyen fosfatidilcolinas, tales como diolecifosfatidilcolina, dimiristoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y diestearoilfosfatidilcolina; fosfatidiletanolaminas, tales como dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE), dioleoilfosfatidiletanolamina y N-succinil-dioleoilfosfatidiletanolamina; fosfatidilserinas; fosfatidilgliceroles; esfingolípidos; glicolípidos, tales como gangliósido GM1; glucolípidos; sulfátidos; glicoesfingolípidos; ácidos fosfatídicos, tales como ácido dipalmatoilfosfatídico (DPPA); ácidos grasos palmíticos; ácidos grasos esteáricos; ácidos grasos araquidónicos; ácidos grasos láuricos; ácidos grasos mirísticos; ácidos grasos lauroleicos; ácidos grasos fisetéricos; ácidos grasos miristoleicos; ácidos grasos palmitoleicos; ácidos grasos petroselínicos; ácidos grasos oleicos; ácidos grasos isolaúricos; ácidos grasos isomirísticos; ácidos grasos isopalmiticos; ácidos grasos isoesteáricos; colesterol y derivados de colesterol, tales como hemisuccinato de colesterol, sulfato de colesterol y butanoato de colesteril-(4'-trimetilamonio); ésteres de ácidos grasos de polioxietileno; alcoholes de ácidos grasos de polioxietileno; éteres de alcoholes de ácidos grasos de polioxietileno; ésteres de ácidos grasos de sorbitán polioxietilados; oxiestearato de polietilenglicol de glicerol; ricinoleato de polietilenglicol y glicerol; esterolos de soja etoxilados; aceite de ricino etoxilado; polímeros de ácidos grasos de polioxietileno-polioxipropileno; estearatos de ácidos grasos de polioxietileno; ácido 12-(((7'-dietilaminocumarina-3-il)-carbonil)-metilamino)-octadecanoico; ácido N-[12-(((7'-dietilamino-cumarina-3-il)-carbonil)-metil-amino)octadecanoil]-2-amino-palmítico; 1,2-dioleoil-sn-glicerol; 1,2-dipalmitoil-sn-3-succinilglicerol; 1,3-dipalmitoil-2-succinil-glicerol; y 1-hexadecil-2-palmitoil-glicerofosfoetanolamina y palmitoilhomocisteína; bromuro de lauriltrimetilamonio (lauril= dodecilo-); bromuro de cetiltrimetilamonio (cetyl=hexadecil-); bromuro de miristiltrimetilamonio (miristil=tetradecilo-); cloruros de alquildimetilbencilmamonio, tales como en los que alquilo es un C.sub. 12, C.sub. 14 o C.sub. 16 alquilo; bromuro de bencildimetildodecilmamonio; cloruro de bencildimetildodecilmamonio, bromuro de bencildimetilhexadecilmamonio; cloruro de bencildimetilhexadecilmamonio; bromuro de bencildimetiltetradeccilmamonio; cloruro de bencildimetiltetradeccilmamonio; bromuro de cetildimetiletilamonio; cloruro de cetildimetiletilamonio; cloruro de cetildimeticetilamonio; bromuro de cetilpiridinio; cloruro de cetilpiridinio; cloruro de N-[1-2,3-dioleoiloxy]-propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA); 1,2-dioleoloxi-3-(trimetilamonio)propano (DOTAP); y 1,2-dioleoil-e-(4'-trimetilamonio)-butanoil-sn-glicerol (DOTB).

[0101] En algunas formas de realización donde se utilizan DPPA, DPPC y DPPE, sus porcentajes molares pueden ser aproximadamente 77-90 % en moles de DPPC, aproximadamente 5-15 % en moles de DPPA y aproximadamente 5-15 % en moles de DPPE, incluido DPPE-PEG5000. Las relaciones preferidas de cada lípido incluyen las descritas en la sección de Ejemplos, como una relación de % en peso de 6,0 a 53,5 a 40,5 (DPPA: DPPC: MPEG5000-DPPE) o una relación de % en moles de 10 a 82 a 8 (10: 82: 8) (DPPA: DPPC: MPEG5000-DPPE).

[0102] La concentración de lípidos en las mezclas no acuosas previstas para almacenamiento a temperatura ambiente a largo plazo puede variar dependiendo de la realización. En algunos casos, la concentración de lípidos puede oscilar entre 0,1 mg y 20 mg por mL de mezcla no acuosa, incluidos entre 0,9 mg y 10 mg por mL de mezcla no acuosa y entre 0,9 mg y 7,5 mg por mL de mezcla no acuosa. En algunas formas de realización, la concentración de lípidos puede oscilar entre aproximadamente 0,94 mg y aproximadamente 7,5 mg de lípido por mL de mezcla no acuosa, incluidos aproximadamente 1,875 mg y aproximadamente 7,5 mg de lípido por mL de mezcla no acuosa, o aproximadamente 3,75 mg a aproximadamente 7,5 mg de lípidos por mL de mezcla no acuosa. En algunos casos, la concentración de lípidos es de aproximadamente 0,94 mg a aproximadamente 1,875 mg por mL de mezcla no acuosa, de aproximadamente 1,875 mg a aproximadamente 3,75 mg por mL de mezcla no acuosa, o de aproximadamente 3,75 mg a aproximadamente 7,5 mg de lípido total por mL de mezcla no acuosa.

5 [0103] Como ejemplo, la concentración de lípidos puede oscilar entre aproximadamente 0,1 mg y aproximadamente 10 mg de lípidos por mL de propilenglicol/glicerol (combinados), incluidos aproximadamente 1 mg y aproximadamente 5 mg de lípidos por mL de propilenglicol/glicerol (combinados). En algunos casos, la concentración de lípidos es de aproximadamente 0,94 mg a aproximadamente 3,75 mg de lípidos por mL de propilenglicol/glicerol (combinado).

10 [0104] Como otro ejemplo, la concentración de lípidos puede oscilar entre aproximadamente 0,1 mg y aproximadamente 20 mg de lípidos por mL de propilenglicol, incluidos aproximadamente 1 mg y aproximadamente 10 mg de lípidos por mL de propilenglicol, o aproximadamente 2 mg a aproximadamente 7,5 mg. Lípido por mL de propilenglicol, o de aproximadamente 3,75 mg a aproximadamente 7,5 mg de lípido por mL de propilenglicol. En algunas formas de realización, la concentración de lípidos es de aproximadamente 1,875 mg a aproximadamente 7,5 mg de lípido por mL de propilenglicol, incluidos aproximadamente de 3,75 mg a aproximadamente 7,5 mg de lípido por mL de propilenglicol.

15 [0105] Como otro ejemplo más, la concentración de lípidos puede oscilar entre aproximadamente 0,1 mg y aproximadamente 20 mg de lípidos por mL de glicerol, incluidos aproximadamente 1 mg y aproximadamente 10 mg de lípidos por mL de glicerol, o aproximadamente 2 mg y aproximadamente 7,5 mg de lípidos por mL de glicerol, o de aproximadamente 3,75 mg a aproximadamente 7,5 mg de lípido por mL de glicerol. En algunos casos, la concentración de lípidos es de aproximadamente 1,875 mg a aproximadamente 7,5 mg de lípidos por mL de glicerol, incluidos aproximadamente de 3,75 mg a aproximadamente 7,5 mg de lípidos por ml de glicerol.

20 [0106] La capacidad de generar composiciones de microesferas de gas encapsuladas en lípidos que todavía son útiles como agentes de contraste de ultrasonido usando cantidades más bajas de lípido, en comparación con las formulaciones lipídicas de agentes de contraste de ultrasonido comercializadas, es beneficiosa ya que reduce la cantidad máxima de lípidos (y otros constituyentes) que podría administrarse a un sujeto de un solo vial, reduciendo así la posibilidad de una sobredosis accidental de un sujeto.

25 [0107] El propilenglicol es un líquido a temperatura ambiente que tiene una densidad de 1,035 g/ml a 20 °C. El glicerol es un líquido a temperatura ambiente que tiene una densidad de 1,26 g/ml a 20 °C.

30 [0108] El volumen total de las mezclas no acuosas capaces de almacenamiento a temperatura ambiente a largo plazo puede variar dependiendo del uso final previsto. Como ejemplo, los volúmenes pueden oscilar entre 0,05 y 10 mL, o entre 0,1 y 10 mL, o entre 0,1 y 5 mL, o entre 0,25 y 5 mL, o entre 0,5 y 1 mL, o entre 0,1 a aproximadamente 1,0 mL.

35 [0109] Se debe entender que estas mezclas no acuosas normalmente se diluirán, por ejemplo, con una solución acuosa antes de la activación, como se describe a continuación, y/o antes de la administración a un sujeto. La dilución total puede ser de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 veces, incluyendo aproximadamente 5 a aproximadamente 30 veces, incluyendo aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 20 veces y aproximadamente 50 veces.

40 [0110] En algunas formas de realización, las formulaciones lipídicas que comprenden lípido, propilenglicol y glicerol se pueden diluir aproximadamente 5 veces antes de la activación. En algunas formas de realización, las formulaciones de lípidos que comprenden lípidos y propilenglicol se pueden diluir aproximadamente 10 veces antes de la activación. En algunas formas de realización, las formulaciones de lípidos que comprenden lípidos y glicerol se pueden diluir aproximadamente 10 veces antes de la activación. Posteriormente, la composición diluida se puede diluir adicionalmente de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 veces, que incluye aproximadamente de 10 a aproximadamente 50 veces, que incluye aproximadamente 10 veces.

45 [0111] En consecuencia, las concentraciones de lípidos, propilenglicol y glicerol mencionadas anteriormente cambiarán con la dilución. Por ejemplo, en los casos en los que la dilución es de aproximadamente 10 veces, las concentraciones de lípidos de la formulación final se reducen aproximadamente 10 veces con respecto a las indicadas anteriormente. Se producirán reducciones similares en las concentraciones de propilenglicol y/o glicerol.

Gas

50 [0112] Las mezclas no acuosas pueden estar provistas de un gas. Por ejemplo, las mezclas no acuosas se pueden proporcionar en contacto con un gas, o se pueden proporcionar en el mismo recipiente o carcasa que un gas pero sin estar en contacto con el gas (es decir, la mezcla no acuosa y el gas pueden estar separados físicamente aproximadamente de otros).

55 [0113] Hasta ahora no se sabía ni se esperaba que estas mezclas no acuosas pudieran almacenarse de forma estable a largo plazo, a temperatura ambiente en contacto con un gas tal como un gas de perfluorocarbono. Tampoco se sabía ni se esperaba que estas mezclas no acuosas pudieran activarse para formar microesferas de gas encapsuladas en lípidos. Se encontró además de acuerdo con la invención que algunas de estas mezclas no acuosas pueden usarse para formar microesferas en número suficiente y de tamaño suficiente (expresado por ejemplo como diámetro) para ser clínicamente útiles.

5 [0114] Preferiblemente, el gas es sustancialmente insoluble en las formulaciones lipídicas proporcionadas en este documento, como la mezcla no acuosa. El gas puede ser un gas fluorado no soluble tal como hexafluoruro de azufre o un gas perfluorocarbonado. Los ejemplos de gases de perfluorocarbono incluyen perfluoropropano, perfluorometano, perfluoroetano, perfluorobutano, perfluoropentano, perfluorohexano. En la Patente de EE. UU. Nº 5.656.211 se describen ejemplos de gases que pueden utilizarse en las microesferas de la invención. En una forma de realización importante, el gas es perfluoropropano.

10 [0115] Los ejemplos de gases incluyen, entre otros, hexafluoroacetona, isopropilacetileno, aleno, tetrafluoroaleno, hexafluoro-1,3-butadieno, 1,2-butadieno, 1,3-butadieno, 1,2,3-triclorobutadieno, 2-fluoro-1,3-butadieno, 2-metil-1,3 butadieno, 15 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-hexafluoro-butino, 3-metil-1-butino, perfluoro-2-butino, 2-bromo-butiraldehído, sulfuro de carbonilo, crotononitrilo, ciclobutano, metilciclobutano, octafluorociclobutano (perfluorociclobutano), perfluoroisobutano, 3-20 clorociclopenteno, ciclopropano, 1,2-dimetilciclopropano, 1,1-dimetilciclopropano, etilciclopropano, metilciclopropano, diacetileno, 3-etil-3-metildiaziridina, 1,1,1-trifluorodiazooctano, dimetilamina, hexafluorodimetilamina, dimetiletilamina, bis-(dimetilfosfina)amina, 2,3-dimetil-2-norbornano, perfluorodimetilamina, cloruro de dimetiloxonio, 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, 1,1-25 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, dchlorotrifluoroetano, fluoroetano, nitropentafluoroetano, nitrosopentafluoroetano, perfluoroetano, perfluoroetilamina, etilviniléter, 1,1-dicloroetileno, 1,1-dicloro-1,2-difluoro-etileno, 1,2-difluoroetileno, metano, metano-sulfonil-cloruro-detrifluoro, metano-sulfonil-fluoruro-trifluoro, metano-(pentafluorotio)trifluoro, metano-bromo-difluoro-nitroso, metano-bromo-fluoro, metano-bromo-cloro-fluoro, metano-bromo-trifluoro, metano-cloro-difluoro-nitro, metano-cloro-dinitro, 30 metano-cloro-fluoro, metano-cloro-trifluoro, metano-cloro-difluoro, metano-dibromo-difluoro, metanodicloro-difluoro, metano-dicloro-fluoro, metano-difluoro, metano-difluoro-yodo, metano-disilano, metano-fluoro, metano-yodometano-yodo-trifluoro, metano-nitro-trifluoro, metano-nitroso-trifluoro, metano-tetrafluoro, metanotricloro-fluoro, metano-trifluoro, metanosulfenilcloruro-trifluoro, 2-metilbutano, éter metílico, éter isopropílico de metilo, lactato de metilo, nitrito de metilo, sulfuro de metilo, éter vinílico de metilo, neopentano, nitrógeno (N._{sub.2}), óxido nitroso, 1,2,3-nonadecano ácido tricarboxílico-2-hidroxicrimetiléster, 1-noneno-3-ino, oxígeno (O._{sub.2}), oxígeno 17 (.sup.17 O._{sub.2}), 1,4-pentadieno, n-pentano, dodecafluoropentano (perfluoropentano), tetradecafluorohexano (perfluorohexano), perfluoroisopentano, perfluoroneopentano, 2-pantanona-4-amino-4-metil, 1-penteno, 2-penteno {cis}, 2-penteno {trans}, 1-penteno-3-bromo, 1-penteno-perfluoro, ácido ftálico-tetracloro, piperidina-2,3,6-trimetil, propano, propano-1,1,1,2,2,3-hexafluoro, propano-1,2-epoxi, propano-2,2 difluoro, propano-2-amino, propano- 2-cloro, propano-heptafluoro-1-nitro, propano-heptafluoro-1-nitroso, perfluoropropano, propeno, propil-1,1,1,2,3,3-hexafluoro-2,3 dicloro, propileno-1-cloro, propileno-cloro-{trans}, propileno-2-cloro, propileno-3-flúor, propileno-perfluoro, propino, propino-3,3,3-trifluoro, estreno-3-fluoro, hexafluoruro de azufre, (di)-decafluoro(S._{sub.2} F._{sub.10}) de azufre, tolueno-2, 4-diamino, trifluoroacetonitrilo, peróxido de trifluorometilo, sulfuro de trifluorometilo, hexafluoruro de tungsteno, vinilacetileno, éter vinílico, neón, helio, criptón, xenón (especialmente gas xenón hiperpolarizado enriquecido con rubidio), dióxido de carbono, helio y aire.

40 45 [0116] Se prefieren gases fluorados (es decir, un gas que contiene una o más moléculas de flúor, como hexafluoruro de azufre), gases fluorocarbonados (es decir, un gas fluorado que es un carbón o gas fluorado) y gases perfluorocarbonados (es decir, gases fluorocarbonados que están totalmente fluorados, como el perfluoropropano y el perfluorobutano).

50 [0117] El gas, como el gas de perfluorocarbono, normalmente está presente por debajo de su concentración normal a temperatura ambiente debido a la incorporación de aire durante la producción. Se espera que la concentración de perfluoropropano cuando está presente en un vial que comprende una mezcla no acuosa y un espacio de cabeza de gas sea de aproximadamente 6,52 mg/mL, a aproximadamente una atmósfera de presión. Las concentraciones de otros gases, como se conoce en la técnica, se diluirían de manera similar debido a la incorporación de aire durante la producción.

55 [0118] La invención contempla que las mezclas no acuosas proporcionadas en este documento, ya sea en contacto con un gas como un gas de perfluorocarbono o separadas físicamente de él, pueden almacenarse a una temperatura en el rango de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 40 °C., aproximadamente 4 °C a aproximadamente 30 °C, aproximadamente 4 °C a aproximadamente 25 °C, aproximadamente 10 °C a aproximadamente 40 °C, aproximadamente 15 °C a aproximadamente 40 °C, o aproximadamente 15 °C a aproximadamente 30 °C.

60 65 [0119] La invención contempla además que las mezclas no acuosas proporcionadas en el presente documento, ya sea en contacto con un gas como un gas de perfluorocarbono o separadas físicamente de él, pueden almacenarse durante aproximadamente 1 mes a aproximadamente 6 meses, aproximadamente 1 mes a aproximadamente 1 año, o aproximadamente 1 mes a aproximadamente 2 años. Por lo tanto, las mezclas no acuosas proporcionadas en este documento, ya sea en contacto con un gas como un gas de perfluorocarbono o separadas físicamente de él, pueden almacenarse durante aproximadamente 1 mes a aproximadamente 2 años a un rango de temperatura de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 30 °C, como ejemplo no limitativo.

Recipientes y configuraciones de cámara

[0120] Las mezclas no acuosas se pueden proporcionar en un recipiente (o carcasa). El recipiente puede ser un recipiente de una sola cámara o de varias cámaras, tal como, entre otros, un recipiente de dos cámaras.

5 [0121] En algunas formas de realización, el recipiente es un vial. El vial puede estar hecho de cualquier material, incluidos, entre otros, vidrio o plástico. El vidrio puede ser vidrio de calidad farmacéutica. El recipiente puede cerrarse herméticamente con un tapón tal como un tapón de goma. En algunas formas de realización, el recipiente es un recipiente de 0,5 a 10 ml. El recipiente puede ser un recipiente de 1-5 ml o un recipiente de 1 o 2 ml. Dichos volúmenes se refieren al volumen de líquido que normalmente se coloca en el recipiente (denominado volumen de llenado de líquido). Esto contrasta con todo el volumen interno del recipiente, que será mayor que el volumen de llenado de líquido. Ejemplos de llenado de líquido y volúmenes internos son los siguientes: Vial Schott de 2 ml (volumen de llenado de líquido) que tiene un volumen interno de 2,9 ml; vial Schott de 3 ml (volumen de llenado de líquido) con un volumen interno de 4,5 ml; y Wheaton 1 ml (volumen de llenado de líquido) vial v que tiene un volumen interno de 1,2 ml.

10 15 [0122] Como se entenderá en el contexto de esta descripción, el volumen interno de un recipiente puede estar ocupado con una mezcla no acuosa y gas. Un ejemplo de un recipiente adecuado es el vial de vidrio Wheaton de 2 ml (disponible comercialmente de, por ejemplo, Nipro, Cat. Nº 2702, B33BA, 2cc, 13 mm, Tipo I, vial de tubo de pedernal), que tiene un volumen interno real de aproximadamente 3,75 ml. Un ejemplo de un tapón adecuado es un tapón siliconado de butil lio gris West (Cat. Nº V50, 4416/50, 13 mm). Un ejemplo de un sello adecuado es un sello de aluminio abatible West (Cat. Nº 3766, blanco, 13 mm). Los recipientes son preferiblemente estériles y/o se esterilizan después de la introducción de la solución de lípidos y/o el gas como se describe en la solicitud PCT publicada WO99/36104.

20 25 [0123] En algunas formas de realización, el recipiente es un recipiente de fondo plano tal como un vial de fondo plano. Los viales adecuados incluyen viales de borosilicato de fondo plano, incluidos los viales de Wheaton. En algunas formas de realización, el recipiente es un recipiente o vial de fondo no plano. En algunas formas de realización, el recipiente es un recipiente con fondo en V tal como un vial con fondo en V. En algunas formas de realización, el recipiente es un recipiente de fondo redondo tal como un vial de fondo redondo. En algunas formas de realización, el recipiente tiene paredes convergentes de manera que su área de superficie inferior (o diámetro de superficie inferior) es más pequeña que su área de superficie superior (abertura) (o diámetro) o más pequeña que cualquier diámetro entre ellas (por ejemplo, un diámetro de cuerpo). Para mayor claridad, un recipiente o vial con fondo en V tiene paredes convergentes, y su área de superficie inferior es significativamente más pequeña que cualquiera de sus áreas de superficie superior o corporal.

30 35 [0124] En algunas formas de realización, el recipiente es una jeringa. La mezcla no acuosa se puede proporcionar en una jeringa precargada, opcionalmente en contacto físico con el gas.

40 [0125] En algunas formas de realización, el recipiente es un recipiente de una sola cámara, como un vial. En tal cámara única, la mezcla no acuosa y el gas, si está presente, pueden estar en contacto físico entre sí.

45 [0126] En algunas formas de realización, los recipientes comprenden dos o más cámaras. Los contenidos de las dos cámaras están físicamente separados entre sí, por ejemplo, durante el almacenamiento. Sin embargo, cuando se usan, los contenidos de las dos cámaras se combinan y entremezclan. Por lo tanto, el recipiente comprende además una barrera que separa físicamente el contenido de la primera y la segunda cámara pero que se puede "quitar" para combinar finalmente ese contenido. La descripción contempla cualquier medio posible para eliminar dicha barrera, incluida la presión, la perforación mecánica o el troquelado, o la disolución.

50 [0127] Los dispositivos de doble cámara tales como jeringas de doble cámara o tubos de doble cámara son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente. Los ejemplos no limitantes incluyen jeringas de doble cámara Vetter y tubos de doble cámara NeoPak.

55 [0128] En algunas formas de realización, una mezcla no acuosa que consiste o que consiste esencialmente en uno o más lípidos, propilenglicol o glicerol, o propilenglicol/glicerol, y un tampón no fosfato se proporciona en un recipiente tal como un solo recipiente de cámara. Tal mezcla se puede proporcionar con o sin un gas tal como un gas de perfluorocarbono. Si se proporciona con el gas, el gas puede estar en la misma cámara que la mezcla no acuosa o en una cámara separada de un recipiente de múltiples cámaras, como se indica a continuación.

60 [0129] El recipiente puede tener dos cámaras, donde una primera cámara comprende la mezcla no acuosa que comprende los lípidos tales como DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE en propilenglicol y glicerol o propilenglicol o glicerol, y una segunda cámara comprende un gas tal como un gas de perfluorocarbono. La mezcla no acuosa puede comprender un tampón tal como un tampón sin fosfato.

[0130] En otra forma de realización, el recipiente puede tener dos cámaras, donde una primera cámara comprende

(i) la mezcla no acuosa que comprende

65 (a) los lípidos tales como DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE y
(b) propilenglicol y glicerol o propilenglicol o glicerol, y

(ii) un gas tal como un gas de perfluorocarbono, y una segunda cámara comprende un diluyente acuoso.

5 [0131] La mezcla no acuosa puede comprender un tampón tal como un tampón sin fosfato. Alternativamente, la solución acuosa puede comprender un tampón tal como un tampón de fosfato.

[0132] En otra forma de realización, el recipiente puede tener dos cámaras, donde una primera cámara comprende

10 (i) la mezcla no acuosa que comprende

(a) los lípidos tales como DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE y
 (b) propilenglicol y glicerol o propilenglicol o glicerol, y una segunda cámara comprende

15 (i) un diluyente acuoso y

(ii) un gas tal como un gas de perfluorocarbono.

20 [0133] En otra forma de realización, el recipiente puede tener al menos tres cámaras, donde una primera cámara comprende una mezcla no acuosa que comprende DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE en propilenglicol o glicerol o propilenglicol y glicerol, una segunda cámara comprende un gas tal como un gas de perfluorocarbono, y una tercera cámara comprende una solución acuosa.

25 [0134] En otra forma de realización, el recipiente puede comprender una primera cámara que comprende la mezcla no acuosa que comprende lípidos y propilenglicol y una segunda cámara que comprende glicerol. En otra forma de realización, el recipiente puede comprender una primera cámara que comprende la mezcla no acuosa que comprende lípidos y glicerol y una segunda cámara que comprende propilenglicol.

30 [0135] El diluyente acuoso puede comprender sales tales como, entre otras, cloruro de sodio y, por lo tanto, puede considerarse una solución salina. El diluyente acuoso puede comprender un tampón tal como un tampón de fosfato y, por lo tanto, puede considerarse como un diluyente acuoso tamponado. El diluyente acuoso puede ser una solución salina tamponada. La mezcla no acuosa puede comprender un tampón tal como un tampón sin fosfato, cuyos ejemplos se proporcionan en el presente documento. La mezcla no acuosa y el diluyente acuoso pueden comprender ambos un tampón. En formas de realización típicas, la mezcla no acuosa o el diluyente acuoso comprende un tampón, pero no ambos. La concentración de tampón variará dependiendo del tipo de tampón usado, como se entenderá y dentro de la experiencia del experto en la materia para determinar. La concentración de tampón en la formulación lipídica no acuosa puede oscilar entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 100 mM. En algunos casos, la concentración de tampón puede ser de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 20 mM, o de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM, o aproximadamente 1 mM a aproximadamente 5 mM, incluyendo aproximadamente 5 mM.

40 [0136] La formulación final que se va a administrar típicamente por vía intravenosa a un sujeto que incluye un sujeto humano puede tener un pH en el rango de 4-8 o en un rango de 4,5-7,5. En algunos casos, el pH puede estar en un rango de aproximadamente 6 a aproximadamente 7,5, o en un rango de aproximadamente 6,2 a aproximadamente 6,8. En otros casos más, el pH puede ser de aproximadamente 6,5 (p. ej., 6,5 +/- 0,5 o +/- 0,3). En algunos casos, el pH puede estar en un rango de 5 a 6,5 o en un rango de 5,2 a 6,3 o en un rango de 5,5 a 6,1 o en un rango de 5,6 a 6 o en un rango de 5,65 a 5,95. En otro caso más, el pH puede estar en un rango de aproximadamente 5,7 a aproximadamente 5,9 (p. ej., +/- 0,1 o +/- 0,2 o +/- 0,3 en cualquiera o ambos extremos del rango). En otro caso, el pH puede ser de aproximadamente 5,8 (p. ej., 5,8 +/- 0,15 o 5,8 +/- 0,1).

50 [0137] En algunas formas de realización, el diluyente acuoso comprende glicerol, un tampón tal como tampón fosfato, sal(es) y agua. Tal diluyente acuoso se puede usar con una mezcla no acuosa que carece de glicerol. En algunas formas de realización, la solución de lípidos comprende además solución salina (sal(es) y agua combinadas) y glicerol en una proporción en peso de 8:1.

55 [0138] En algunas formas de realización, el diluyente acuoso comprende propilenglicol, un tampón tal como tampón fosfato, sal(es) y agua. Tal diluyente acuoso se puede usar con una mezcla no acuosa que carece de propilenglicol.

[0139] En algunas formas de realización, el diluyente acuoso comprende un tampón tal como tampón de fosfato, sal(es) y agua. Tal diluyente acuoso se puede usar con una mezcla no acuosa que comprende tanto propilenglicol como glicerol.

60 [0140] En el presente documento se proporciona un método que comprende colocar una mezcla no acuosa de lípidos y propilenglicol y un gas en un recipiente, un método que comprende colocar una mezcla no acuosa de lípidos y glicerol y un gas en un recipiente, y un método que comprende colocar una mezcla no acuosa de lípidos y propilenglicol y glicerol, y un gas en un recipiente. En cualquiera de estos métodos, el gas puede colocarse en el recipiente mediante el intercambio del gas del espacio de cabeza. Los intercambiadores de gas adecuados para este fin son conocidos en la técnica. Un ejemplo de un dispositivo de intercambio de gases es una cámara de liofilización. Dichos recipientes se pueden almacenar a una temperatura de 10 a 50 °C, o de 15 a 40 °C, o de 20 a 30 °C durante un máximo de 2 años, o de 1 a 12 meses, o

de 1 a 30 días. En otro aspecto, el recipiente puede estar provisto de instrucciones para el almacenamiento a las temperaturas anteriores, opcionalmente para los períodos de tiempo anteriores, o alternativamente sin instrucciones para el almacenamiento a 4 °C o bajo refrigeración.

- 5 [0141] En el presente documento se proporciona un método que comprende combinar una primera composición que comprende una solución no acuosa de lípidos en propilenglicol y gas perfluorocarbonado con una segunda composición que comprende un diluyente acuoso, un método que comprende combinar una primera composición que comprende una solución no acuosa de lípidos en glicerol y gas perfluorocarbonado con una segunda composición que comprende un diluyente acuoso, y un método que comprende combinar una primera composición que comprende una solución no acuosa de lípidos en propilenglicol y glicerol y gas perfluorocarbonado con una segunda composición que comprende un diluyente acuoso.

10 [0142] La primera y la segunda composición se pueden proporcionar en la primera y la segunda cámara de un recipiente, respectivamente, y la combinación puede comprender romper un sello entre la primera y la segunda cámara. La primera composición se puede proporcionar en un vial y la segunda composición se puede proporcionar en una jeringa, añadiéndose el contenido de la jeringa al contenido del vial. Alternativamente, la segunda composición se puede proporcionar en un vial y la primera composición se puede proporcionar en una jeringa, añadiéndose el contenido de la jeringa al contenido del vial.

15 [0143] Cualquiera de las formas de realización de recipientes anteriores puede proporcionarse, con o sin una carcasa adicional, con instrucciones para el almacenamiento a una temperatura superior a 4 °C (o sin refrigeración) o con instrucciones que no dicen nada sobre la temperatura de almacenamiento. Debe entenderse que las formulaciones proporcionadas en el presente documento pueden almacenarse a 4 °C pero no existe ningún requisito de que se almacenen a esta temperatura. Las instrucciones pueden indicar además el almacenamiento a largo plazo, como el almacenamiento durante días, meses o incluso años, y pueden indicar además que el almacenamiento a largo plazo tiene lugar a temperatura ambiente o aproximadamente (p. ej., 18-25 °C).

20 [0144] En algunas formas de realización, la composición está en un recipiente, como un vial, y dicho recipiente está etiquetado. El recipiente puede tener una etiqueta adherida a una o más de sus superficies exteriores. Dicha etiqueta puede ser una etiqueta de papel u otra etiqueta similar que sea visible a simple vista y pueda ser leída y comprendida por un usuario final sin ayuda o dispositivo adicional. Alternativamente, la etiqueta puede ser una que sea legible por máquina o dispositivo. Los ejemplos de etiquetas legibles por máquina o dispositivo incluyen bandas magnéticas, chips, códigos de barras que incluyen códigos de barras lineales, matriciales y 2D, y etiquetas de identificación por radiofrecuencia (RFID). Los códigos de barras, como los códigos de barras lineales, pueden ser aquellos que cumplen con los estándares del Uniform Code Council o los estándares del Health Industry Business Communications Council. Dichas etiquetas a su vez pueden leerse, por ejemplo, desde un dispositivo como un lector de banda magnética, un lector de chip, un escáner o lector de código de barras, o un lector de etiquetas RFID. Prácticamente cualquier tecnología de etiquetado que se haya utilizado con fines de autenticación y/o "seguimiento y localización" se puede utilizar junto con los recipientes proporcionados en este documento.

25 [0145] La etiqueta puede proporcionar al usuario final o a un manipulador intermedio del recipiente una variedad de información que incluye, entre otros, la fuente y/o el productor de la composición contenida en el mismo, incluido, por ejemplo, el nombre de la empresa o subsidiaria de la empresa que hizo la composición y/o que produjo los componentes de la composición, la fecha en que se elaboró la composición, la ubicación física donde se elaboró la composición, la fecha de envío del recipiente, el tratamiento del recipiente, incluido, por ejemplo, si se almacenó en una ubicación remota y las condiciones y la duración de dicho almacenamiento, la fecha en que se entregó el recipiente, el medio de entrega, el Código Nacional de Medicamentos (NDC) según lo prescrito por la FDA, el contenido del recipiente, la dosis y el método de uso incluyendo la ruta de administración, etc.

30 [0146] La etiqueta puede servir para uno o más propósitos que incluyen, por ejemplo, la autenticación del recipiente y la composición contenida en el mismo. Autenticación significa la capacidad de identificar o marcar el recipiente como originario y realizado por una parte autorizada, y permite que un usuario final u otra parte identifique el recipiente y las composiciones que se originan en otra parte no autorizada. La etiqueta también se puede usar para rastrear un recipiente. Esta característica se puede usar para seguir un recipiente y la composición contenida en él después de la producción y hasta el punto de administración a un sujeto. En este sentido, el movimiento del recipiente durante ese período de tiempo puede almacenarse en una base de datos y, opcionalmente, dicha base de datos puede ser accesible para un usuario final para garantizar la integridad de la composición.

35 [0147] La etiqueta también puede ser una etiqueta combinada, entendiendo que puede contener información que se lee usando dos modos diferentes. Por ejemplo, la etiqueta puede contener información que es evidente y comprensible para el ojo visible (por ejemplo, puede recitar el nombre del productor en palabras) y otra información que es legible por máquina, como información incrustada en RFID o código de barras.

40 [0148] La etiqueta también puede ser una etiqueta de doble uso, con la intención de que pueda servir para dos o más propósitos. Por ejemplo, la etiqueta puede contener información que identifique la composición e información adicional que identifique al fabricante y/o la fecha de fabricación. Esta información puede transmitirse en el mismo formato o

utilizando un formato diferente (por ejemplo, uno puede proporcionarse en una etiqueta RFID y el otro puede proporcionarse en una etiqueta de código de barras).

5 [0149] La etiqueta puede proporcionar contenido que sea visible y comprensible para un ser humano, como por ejemplo, el nombre del fabricante. Como alternativa o adicionalmente, la etiqueta puede contener información que, si bien es fácilmente visible para el ojo humano, no proporciona información significativa en ausencia de una tabla de búsqueda u otra forma de base de datos a la que se deba hacer referencia. Dicha información, por ejemplo, puede proporcionarse como un código alfanumérico.

10 Activación

15 [0150] Cualquiera de las composiciones anteriores se puede usar para formar microesferas de gas encapsuladas en lípidos que a su vez se pueden usar como un agente de contraste de ultrasonidos. Como se usa en este documento, las microesferas de gas encapsuladas en lípidos son esferas que tienen un volumen interno que es predominantemente gas y que está encapsulado por una cubierta lipídica. La cubierta lipídica puede estar dispuesta como una capa única o bicapa, incluidas las bicapas unilamelares o multilamelares. Estas microesferas son útiles como agentes de contraste para ultrasonidos.

20 [0151] Las microesferas se generan a partir de mezclas no acuosas a través de un proceso de activación. La activación, como se describe con mayor detalle en este documento, se refiere a una agitación vigorosa de una solución de lípidos (tal como una solución no acuosa) con el fin de producir microesferas de gas encapsuladas en lípidos. La activación normalmente produce al menos 1×10^7 microesferas por ml de solución, 5×10^7 microesferas por ml de solución, o al menos $7,5 \times 10^7$ microesferas por ml de solución, o al menos 1×10^8 microesferas por ml de solución, o aproximadamente 1×10^9 microesferas por ml de solución.

25 [0152] La divulgación contempla que ciertas mezclas no acuosas proporcionadas en el presente documento pueden usarse para formar microesferas de gas encapsuladas en lípidos en presencia de un gas. Fue inesperado que estas mezclas no acuosas pudieran activarse.

30 [0153] La activación se puede realizar mediante agitación vigorosa que incluye agitación durante un período de tiempo definido. Como se describió anteriormente, la activación puede ocurrir en presencia o ausencia de un diluyente acuoso. La activación, como se usa aquí, se define como un movimiento que agita una solución de lípidos de manera que se introduce un gas desde el espacio de cabeza en la solución de lípidos. Cualquier tipo de movimiento que agite la solución de lípidos y resulte en la introducción de gas puede usarse para la agitación. La agitación debe tener la fuerza suficiente para permitir la formación de espuma después de un período de tiempo. Preferiblemente, la agitación tiene la fuerza suficiente para que se forme espuma en un corto período de tiempo, como 30 minutos, y preferiblemente en 20 minutos, y más preferiblemente en 10 minutos. En algunas formas de realización, la activación puede ocurrir en menos de 5 minutos, menos de 4 minutos, menos de 3 minutos, menos de 2 minutos, en aproximadamente 75 segundos, menos de un minuto o en aproximadamente 45 segundos. La agitación puede ser por microemulsión, por microfluidificación, por ejemplo, turbulencia (tal como por vórtice), de lado a lado o de arriba hacia abajo. Se pueden combinar diferentes tipos de movimiento. La agitación se puede producir agitando el recipiente que contiene la solución de lípidos o agitando la solución de lípidos dentro del recipiente sin agitar el propio recipiente. Además, la sacudida puede ocurrir manualmente o con una máquina. Los agitadores mecánicos que pueden usarse incluyen, por ejemplo, una mesa agitadora, como una mesa agitadora VWR Scientific (Cerritos, California), un microfluidizador, Wig-L-Bug™ (Crescent Dental Manufacturing, Inc., Lyons, Ill.), y un mezclador mecánico de pintura, VIALMIX®, o cualquiera de los dispositivos descritos en el Ejemplo 12. La agitación vigorosa se define como al menos aproximadamente 60 movimientos de agitación por minuto. Esto se prefiere en algunos casos. Un vórtex de al menos 1000 revoluciones por minuto es un ejemplo de agitación vigorosa y es más preferido en algunos casos. En algunos casos, se prefiere aún más el vórtex a 1800 revoluciones por minuto.

50 [0154] VIALMIX® se describe en la Patente de EE. UU. N° 6,039,557. Los recipientes, como los viales, pueden agitarse lo suficiente con VIALMIX® durante los intervalos de tiempo indicados anteriormente, incluidos, por ejemplo, 45 segundos. La activación usando VIALMIX® puede ocurrir por menos de 1 minuto o más, incluso por 30 segundos, 45 segundos, 60 segundos, 75 segundos, 90 segundos, 105 segundos, 120 segundos o más.

55 [0155] En el Ejemplo 12 se proporcionan ejemplos adicionales de métodos de activación.

[0156] Las mezclas no acuosas que comprenden lípidos y propilenglicol y glicerol pueden activarse en presencia de un gas sin adición de otras soluciones. Alternativamente, esta mezcla puede combinarse primero con un diluyente acuoso y luego activarse en presencia de un gas.

60 [0157] Las mezclas no acuosas que comprenden lípidos y propilenglicol pueden combinarse primero con glicerol y, opcionalmente, con un diluyente acuoso, y luego activarse en presencia de un gas.

65 [0158] Las mezclas no acuosas que comprenden lípidos y glicerol pueden combinarse primero con propilenglicol y, opcionalmente, un diluyente acuoso, y luego activarse en presencia de un gas.

5

[0159] En otros casos, los lípidos en forma sólida, ya sea como una mezcla de lípidos o no, pueden disolverse en propilenglicol solo o glicerol solo o en propilenglicol y glicerol o en propilenglicol, glicerol y un diluyente acuoso que puede a su vez comprender sal(es) y tampón. Cualquiera de estas mezclas puede activarse y, en algunos casos, puede diluirse adicionalmente con un diluyente acuoso antes de su uso.

10

[0160] Por lo tanto, en el presente documento se proporciona una composición que comprende microesferas de gas encapsuladas en lípidos que comprenden DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE en una mezcla no acuosa que comprende propilenglicol y glicerol y un gas perfluorocarbonado, una composición que comprende microesferas de gas encapsuladas en lípidos que comprenden DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE en una mezcla no acuosa que comprende propilenglicol y un gas de perfluorocarbono, y una composición que comprende microesferas de gas encapsuladas en lípidos que comprenden DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE en una mezcla no acuosa que comprende glicerol y un gas de perfluorocarbono.

15

[0161] La divulgación también contempla la formación de las microesferas en presencia de un diluyente acuoso tal como, pero sin limitación, una solución salina tamponada acuosa. El diluyente acuoso puede comprender sal(es), tampón(es), propilenglicol, glicerol y agua.

20

[0162] En algunas formas de realización, una composición activada que comprende microesferas de gas encapsuladas en lípidos puede comprender solución salina, glicerol y propilenglicol en una proporción de % en peso de 8:1:1.

25

[0163] Una vez formadas, las microesferas pueden diluirse en un diluyente acuoso y luego administrarse a un sujeto. La solución salina acuosa normalmente será farmacéuticamente aceptable y puede carecer de conservantes (denominándose en el presente documento sin conservantes). El diluyente acuoso puede ser una solución salina (es decir, puede contener sal como, pero sin limitarse a cloruro de sodio) y/o puede contener un tampón, como, pero sin limitarse a un tampón de fosfato. Las microesferas de gas encapsuladas en lípidos se pueden diluir de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 veces, o de aproximadamente 35 a aproximadamente 45 veces. Las microesferas de gas diluidas encapsuladas en lípidos pueden administrarse mediante bolo o infusión continua en un sujeto que necesite formación de imágenes de contraste por ultrasonido.

30

[0164] Las microesferas tienen un diámetro promedio en el rango de micras. En algunas formas de realización, las microesferas tienen un diámetro medio que oscila entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 2,0 micrómetros, o entre aproximadamente 1,2 micrómetros y aproximadamente 1,8 micrómetros. En algunas formas de realización, las microesferas tienen un diámetro medio de aproximadamente 1,6 micras.

35

[0165] En algunas formas de realización, la mayoría de las microesferas pueden tener un diámetro en el rango de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 3,0 micras, o aproximadamente 1,0 a aproximadamente 2,0 micras, o aproximadamente 1,2 a aproximadamente 2,0 micras, preferiblemente en el rango de aproximadamente 1,2 hasta aproximadamente 1,8 micras. La mayoría de las microesferas significa al menos el 50 %, preferiblemente al menos el 75 %, más preferiblemente al menos el 80 % e incluso más preferiblemente al menos el 90 % de las microesferas de gas encapsuladas en lípido medidas en la composición. En algunas formas de realización, al menos el 50 %, o al menos el 60 %, o al menos el 70 %, o al menos el 80 %, al menos el 90 %, o al menos el 95 % de las microesferas de gas encapsuladas en lípido detectadas en la composición tienen un diámetro en cualquiera de los rangos anteriores.

45

[0166] Un diámetro promedio representa el diámetro promedio de todas las microesferas detectadas en una composición. El diámetro de las microesferas se mide normalmente utilizando instrumentación conocida y disponible en la técnica que incluye, entre otros, un medidor de partículas Malvern FPIA-3000 Sysmex. Como se entenderá en la técnica, dicha instrumentación normalmente tiene tamaños de corte para los límites inferior y superior. Esto significa que las microesferas por debajo o por encima de estos límites, respectivamente, no se cuentan (y no se incluyen en el cálculo de la concentración de microesferas) y su diámetro no se mide (y no se tiene en cuenta para determinar el diámetro promedio de las microesferas). La instrumentación utilizada en los Ejemplos tenía un límite de corte inferior de 1,0 micrómetros y un límite de corte superior de 40,0 micrómetros. La mayoría de las microesferas contadas o detectadas, utilizando un límite inferior de 1,0 micrómetros y un límite superior de 40,0 micrómetros, tienen un diámetro en el intervalo de 1,0 a 20,0 micrómetros. Debe entenderse que esta descripción utiliza los términos tamaño de microesfera y diámetro de microesfera de forma intercambiable. Por lo tanto, a menos que se especifique lo contrario, el tamaño de las microesferas se refiere al diámetro de las microesferas.

60

[0167] La composición proporcionada en el presente documento que incluye las composiciones activadas puede comprender además otros constituyentes tales como materiales o agentes estabilizadores, modificadores de la viscosidad, agentes de tonicidad, agentes de recubrimiento y agentes de suspensión. Los ejemplos de cada clase de agentes son conocidos en la técnica y se proporcionan, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. N.º 5.656.211, en la solicitud PCT publicada WO99/36104 y en la solicitud estadounidense publicada US 2013/0022550.

65

[0168] La composición proporcionada en el presente documento que incluye las composiciones activadas puede comprender uno o más tampones que incluyen, entre otros, tampón acetato, tampón benzoato, tampón salicilato y/o tampón fosfato.

5 [0169] El pH de la composición puede ser de aproximadamente 6,2 a aproximadamente 6,8. En algunos casos, el pH puede estar en un rango de 5 a 6,5 o en un rango de 5,2 a 6,3 o en un rango de 5,5 a 6,1 o en un rango de 5,6 a 6 o en un rango de 5,65 a 5,95. En otro caso más, el pH puede estar en un rango de aproximadamente 5,7 a aproximadamente 5,9 (p. ej., +/- 0,1 o +/- 0,2 o +/- 0,3 en uno o ambos extremos del rango). En otro caso, el pH puede ser de aproximadamente 5,8 (p. ej., 5,8 +/- 0,15 o 5,8 +/- 0,1). Dichos rangos se pueden lograr, por ejemplo, utilizando una formulación tamponada con acetato diluida en agua.

10 [0170] En algunas formas de realización, cada ml de la composición final (después de la dilución de la solución no acuosa con un diluyente acuoso) comprende 0,75 mg de lípidos (que consta de 0,045 mg de DPPA, 0,401 mg de DPPC y 0,304 mg de DPPE-PEG5000), 103,5 mg de propilenglicol, 126,2 mg de glicerol, 2,34 mg de fosfato de sodio monobásico monohidratado, 2,16 mg de fosfato de sodio dibásico heptahidratado y 4,87 mg de cloruro de sodio en agua.

15 [0171] En algunas formas de realización, cada ml de la composición final comprende aproximadamente 0,43 mg de lípidos (que consta de 0,0225 mg de DPPA, 0,2 mg de DPPC y 0,152 mg de DPPE-PEG5000), 103,5 mg de propilenglicol, 126,2 mg de glicerol, 2,34 mg de fosfato de sodio monohidratado monobásico, 2,16 mg de fosfato de sodio dibásico heptahidratado y 4,87 mg de cloruro de sodio en agua.

20 [0172] En algunas formas de realización, cada ml de la composición final (después de la dilución de la solución no acuosa con solución salina) comprende 0,75 mg de lípidos (que consta de 0,045 mg de DPPA, 0,401 mg de DPPC y 0,304 mg de DPPE-PEG5000), 103,5 mg de propilenglicol, 126,2 mg de glicerol, 0,074 mg de acetato de sodio, 0,006 mg de ácido acético y 7,20 mg de cloruro de sodio en agua.

Impurezas y estabilidad

25 [0173] La descripción proporciona además un método para evaluar el contenido de impurezas en una solución lipídica tal como una solución no acuosa. Dicho método comprende analizar una solución de lípidos para detectar la presencia de impurezas utilizando cualquiera de varios métodos analíticos tales como, entre otros, detección de aerosol cargado (CAD) acoplado opcionalmente con una o más técnicas de separación tales como HPLC. La solución lipídica puede ser una solución no acuosa que comprenda lípidos y propilenglicol o glicerol o propilenglicol y glicerol. La solución de lípidos puede comprender además un tampón tal como un tampón sin fosfato. La solución de lípidos puede comprender además sal(es) y/o agua. La presencia de una impureza por encima de un nivel de umbral puede significar que la solución de lípidos no se almacenó correctamente, que su estabilidad se ha visto comprometida y, por lo tanto, la solución de lípidos debe desecharse y no administrarse a un sujeto. Dicho método podría utilizarse con fines de control de calidad.

35 [0174] El ejemplo 2 proporciona un método para medir el contenido de impurezas en una solución no acuosa. El contenido de impurezas se proporciona como un % de impurezas en relación con la cantidad de lípidos de entrada (o teórica o nominal), lo que significa que la impureza se expresa como un porcentaje de la cantidad total de lípidos presentes, suponiendo que no haya pérdida de lípidos.

40 [0175] Las formulaciones de lípidos modificadas pueden comprender menos del 10 %, menos del 5 % o menos del 2 % de impurezas cuando se almacenan a temperatura ambiente durante un período de tiempo, que incluye, por ejemplo, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 6 meses, o más incluyendo aproximadamente 1 año, o aproximadamente 2 años.

45 [0176] Significativamente, las formulaciones de lípidos modificadas pueden comprender menos impurezas que DEFINITY® cuando ambas formulaciones se almacenan a temperatura ambiente (es decir, cuando la composición y DEFINITY® se almacenan a temperatura ambiente). Esta reducción en el nivel de impurezas puede ser una diferencia de alrededor del 1%, alrededor del 2%, alrededor del 3%, alrededor del 4% o alrededor del 5% o más.

Usos y aplicaciones

50 [0177] La divulgación proporciona métodos de uso de las microesferas y composiciones de microesferas. Las microesferas están destinadas a ser agentes de contraste de ultrasonidos y pueden usarse *in vivo* en sujetos humanos o no humanos o *in vitro*. Las composiciones de la invención se pueden usar para fines diagnósticos o terapéuticos o para fines combinados de diagnóstico y terapéuticos.

55 [0178] Cuando se usan como agentes de contraste de ultrasonido para sujetos humanos, las composiciones se activan como se describe en el presente documento para formar un número suficiente de microesferas, opcionalmente se diluyen en un volumen mayor y se administran en una o más inyecciones en bolo o mediante una infusión continua. La administración es típicamente una inyección intravenosa. La formación de imágenes se realiza poco después. La aplicación de formación de imágenes se puede dirigir al corazón o puede implicar otra región del cuerpo que sea susceptible a la formación de imágenes por ultrasonido. Las imágenes pueden ser imágenes de uno o más órganos o regiones del cuerpo, incluidos, entre otros, el corazón, los vasos sanguíneos, la vasculatura cardiovascular y el hígado.

60 [0179] Los sujetos de la divulgación incluyen, pero no se limitan a seres humanos y animales. Los seres humanos son los preferidos en algunos casos. Las composiciones lipídicas se administran en cantidades eficaces. Una cantidad eficaz

será aquella cantidad que facilite o provoque la respuesta y/o aplicación *in vivo* deseada. En el contexto de una aplicación de formación de imágenes, tal como una aplicación de ultrasonidos, la cantidad eficaz puede ser una cantidad de microesferas lipídicas que permitan la formación de imágenes de un sujeto o una región de un sujeto.

5 EJEMPLOS

Ejemplo 1. Preparación de muestras

[0181] Se usó el agente de contraste de ultrasonido comercial, aprobado por la FDA, DEFINITY® (Lantheus Medical Imaging) para comparación. Cada vial contiene lo siguiente: 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC; 0,401 mg/mL), ácido 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatídico (DPPA; 0,045 mg/mL) y N-(metoxipolietenglicol 5000 carbamoil)-1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (MPEG5000 DPPE; 0,304 mg/ml) en una matriz de 103,5 mg/ml de propilenglicol, 126,2 mg/ml de glicerol, y 2,34 mg/ml de fosfato de sodio monobásico monohidratado, 2,16 mg/ml de fosfato de sodio dibásico heptahidratado y 4,87 mg/ml de cloruro de sodio en agua para inyección. El pH es 6,2-6,8. El volumen de llenado nominal de la solución de lípidos es de aproximadamente 1,76 ml en un vial de vidrio Wheaton de 2 cc con un volumen aproximado de 3,80 ml y, por lo tanto, un espacio libre de aproximadamente 2,04 ml que contiene gas perfluoropropano (PFP, 6,52 mg/ml).

[0182] Se prepararon nuevas formulaciones como sigue:

[0183] Se preparó una mezcla de lípidos (LB) que contenía DPPC, DPPA, MPEG500 DPPE como se describe en la patente US8084056. Las formulaciones de LB se prepararon mezclando polvo de LB en propilenglicol (PG), o propilenglicol/glicerol (PG/G) 1:1 v/v, o vehículo de glicerol a 55 °C. En algunos estudios, se disolvieron en el vehículo tampones de acetato, benzoato o salicilato 0,005 M preparados en proporciones de sal a ácido de 90/10, 75/25, 50/50, 25/79 y 10/90. En algunos casos, se incluyó tampón de fosfato en una solución acuosa o salina.

Ejemplo 2. Estabilidad de lípidos

[0184] Se colocaron muestras de mezcla de lípidos de nueva formulación del Ejemplo 1 en propilenglicol en viales de vidrio Wheaton de 2 cc, se reemplazó el espacio de cabeza con gas PFP, se insertó un tapón de lyo de butilo gris West y el vial se engarzó con un sello de aluminio. Los viales se almacenaron en una cámara ambiental a 25 °C para representar el almacenamiento a temperatura ambiente o se calentaron a 130 °C en un horno de secado para representar la esterilización terminal. En los puntos de tiempo apropiados, los viales de muestra se retiraron del almacenamiento, se desprendieron, se añadió solución salina al vial y se mezcló para asegurar una solución homogénea. La muestra se transfirió a un vial de HPLC y se analizó mediante separación de HPLC de fase inversa y detección de aerosol con carga de corona (CAD; HPLC con detección de aerosol con carga para la medición de diferentes clases de lípidos, IN Acworth, PH Gamache, R. McCarthy y D. Asa, ESA Biosciences Inc., Chelmsford, MA, EE. UU., J. Waraska e IN Acworth, American Biotechnology Laboratory, enero de 2008) para detectar impurezas.

[0185] Los resultados de los viales DEFINITY® almacenados durante 3 meses a 25 °C se proporcionan para comparación. El análisis usó HPLC de fase inversa de gradiente con detección de dispersión de luz evaporativa (ELSD) usando una columna C18 y una fase móvil que contenía: agua, metanol, acetato de amonio y trietilamina. Las tablas 1 y 2 proporcionan la impureza total como porcentaje del contenido total de lípidos en el vial a 25 °C y 130 °C.

45 **Tabla 1. Datos de impurezas para la mezcla de lípidos (LB) en la formulación de propilenglicol (PG) almacenada a 25 °C.**

	7,50 mg de mezcla de lípidos/mL PG *	DEFINITY® (0,75 mg de mezcla de lípidos/mL)
Número de días a 25 °C	96 días (aproximadamente 3 meses)	3 meses
PORCENTAJE DE IMPUREZA TOTAL	2,1	11,86
* 177 mg de PG que contiene LB (0,72 % en peso de LB; proporción de 1:138 para LB:PG).		

55 **Tabla 2. Datos de impurezas para la mezcla de lípidos (LB) en la formulación de propilenglicol (PG) y DEFINITY® procesado a 130 °C durante 30 minutos**

	7,50 mg de mezcla de lípidos/mL PG *	3,75 mg de mezcla de lípidos/mL PG **	DEFINITY® (0,75 mg de mezcla de lípidos/mL)
PORCENTAJE DE IMPUREZA TOTAL	0,334	0,818	4,230
* 89 mg de PG que contiene LB (0,72 % en peso de LB; proporción de 1:138 para LB:PG).			
** 177 mg de PG que contiene LB (0,36% en peso de LB; proporción de 1:276 para LB:PG).			

[0186] La FIG. 1 ilustra los niveles de impurezas totales en función del tiempo para DEFINITY® a 2-8 °C y 25 °C y para PG de 7,5 mg LB/mL a 25 °C. El nivel total de impurezas en DEFINITY® almacenado a 2-8 °C fue similar al de la Formulación PG de 7,5 mg LB/mL almacenada a 25 °C. Sin embargo, cuando DEFINITY® se almacenó a 25 °C, el nivel de impurezas totales aumentó drásticamente.

5

[0187] Estos datos demuestran que la formulación de PG de 7,5 mg de LB/mL es mucho más robusta que la formulación DEFINITY® a temperaturas más altas. Esta observación fue inesperada.

Ejemplo 3. Estabilidad de la formulación de mezcla de lípidos/propilenglicol/glicerol (LB/PG/G)

10

[0188] La muestra de mezcla de lípidos de nueva formulación del ejemplo 1 en propilenglicol/glicerol 1:1 (v:v) se introdujo en un vial de vidrio Wheaton de 2 cc, se reemplazó el espacio de cabeza con gas PFP, se insertó un tapón de lyo de butilo gris West y se engarzó el vial con un sello de aluminio. Los viales se almacenaron en una cámara ambiental a 25 °C para representar el almacenamiento a temperatura ambiente o se calentaron a 130 °C en un horno para representar la esterilización terminal. Los viales almacenados a 25 °C se prepararon y analizaron como se describe en el Ejemplo 2. Los viales calentados a 130 °C se prepararon como se describe en el Ejemplo 2, pero se analizaron usando el sistema HPLC como se describe para DEFINITY® en el Ejemplo 2. Las Tablas 3 y 4 representan la impureza total como porcentaje del contenido total de lípidos en el vial a 25 °C y 130 °C. Los resultados de DEFINITY® analizados como se describe en el Ejemplo 2 se proporcionan para comparación.

20

Tabla 3. Datos de impurezas para 3,75 mg de mezcla de lípidos (LB) por mL en formulación PG/G almacenada a 25 °C

	3,75 mg de mezcla de lípidos/mL PG/G *	DEFINITY® (0,75 mg de mezcla de lípidos/mL)
Número de días a 25 °C	87 días (aproximadamente 3 meses)	3 meses
PORCENTAJE DE IMPUREZA TOTAL	1,747	11,86

* 391 mg de PG/G que contiene LB (0,33 % en peso de LB:44,9 % en peso de PG:54,8 % en peso de G; proporción de 1:138:168 para LB:PG:G).

30

Tabla 4. Datos de impurezas para la mezcla de lípidos (LB) en formulaciones PG/G y DEFINITY® procesado a 130 °C durante 30 minutos

	3,75 mg de mezcla de lípidos/mL PG/G *	DEFINITY® (0,75 mg de mezcla de lípidos/mL)
PORCENTAJE DE IMPUREZA TOTAL	2,558	4,150

* 391 mg de PG/G que contiene LB (0,33 % en peso de LB:44,9 % en peso de PG:54,8 % en peso de G; proporción de 1:138:168 para LB:PG:G).

40

[0189] La FIG. 2 ilustra los niveles totales de impurezas en función del tiempo para DEFINITY® almacenado a 2-8 °C y 25 °C y para la formulación de 3,75 mg LB/mL PG/G almacenada a 25 °C. El nivel total de impurezas en DEFINITY® almacenado a 2-8 °C fue similar al de la formulación de 3,75 mg LB/mL PG/G almacenada a 25 °C. Sin embargo, cuando DEFINITY® se almacenó a 25 °C, el nivel de impurezas totales aumentó drásticamente.

45

[0190] Estos datos demuestran que la formulación de PG/G de 3,75 mg de LB/mL es mucho más robusta que la formulación DEFINITY® a temperaturas más altas. Esta observación fue inesperada.

50

Ejemplo 4. Estabilidad de la mezcla de lípidos tamponados/formulación de propilenglicol/glicerol

[0191] Muestra de mezcla de lípidos de nueva formulación del Ejemplo 1, en propilenglicol/glicerol 1:1 (v:v) que contiene acetato 0,005 M (75/25 acetato de sodio/ácido acético), benzoato (75/25 benzoato de sodio/ácido benzoico) o salicilato (90/10 salicilato de sodio/ácido salícílico) se llenó de tampón en un vial de vidrio de Wheaton de 2 cc, el espacio de cabeza se reemplazó con gas PFP, un tapón de lyo de butilo gris West, insertado y el vial engarzado con un sello de aluminio. Los viales se almacenaron a 25 °C, se prepararon y analizaron como se describe en el Ejemplo 2. Los resultados de DEFINITY® analizados como se describe en el Ejemplo 2 se proporcionan para comparación. La Tabla 5 proporciona la impureza total como porcentaje del contenido total de lípidos en el vial a 25 °C.

60

[0192] La FIG. 3 ilustra los niveles totales de impurezas en función del tiempo. Sin embargo, cuando DEFINITY® se almacenó a 25 °C, el nivel de impurezas totales aumentó drásticamente. Estos datos demuestran que la formulación de 3,75 mg de LB/mL de PG/G tamponada es mucho más robusta que la formulación DEFINITY® a temperaturas más altas. Esta observación fue inesperada.

65

Tabla 5. Datos de impurezas para 3,75 mg de mezcla de lípidos/ml de formulación de PG/G tamponada almacenada a 25 °C

	3,75 mg de mezcla de lípidos/ml Formulación tamponada * PG/G			
	75/25 Acetato	75/25 benzoato	90/10 Salicilato	DEFINITY® (0,75 mg de mezcla de lípidos/mL)
Número de días a 25 °C	50	50	50	2 meses
Impureza total	0,562	0,658	1,475	8,94
* Tampón 5 mM en 391 mg de PG/G que contiene LB (0,33 % en peso de LB; 44,9 % en peso de PG; 54,8 % en peso de G; proporción de 1:138:168 para LB: PG:G). Las proporciones representan acetato de sodio a ácido acético, benzoato de sodio a ácido benzoico, salicilato de sodio a ácido salicílico.				

Ejemplo 5. Estabilidad de la formulación de glicerol de mezcla de lípidos

[0193] La muestra de mezcla de lípidos de nueva formulación del Ejemplo 1 en glicerol se llenó en un vial de vidrio de HPLC de 2 cc, el espacio de cabeza se reemplazó con gas PFP y el vial se selló con una tapa de tornillo que contiene un tabique. Los viales se almacenaron a 25 °C y se prepararon y analizaron como se describe en el Ejemplo 2.

[0194] Los resultados de DEFINITY® analizados como se describe en el Ejemplo 2 se proporcionan para comparación. La Tabla 6 proporciona los resultados de impurezas totales para este experimento. Estos datos demuestran que la formulación de LB/mL G tamponada de 7,5 mg es mucho más robusta que la formulación DEFINITY® a temperaturas más altas. Esta observación fue inesperada.

Tabla 6. Datos de impurezas para 7,50 mg de mezcla de lípidos/mL de formulación de glicerol (G)* almacenada a 25 °C.

	7,5 mg de mezcla de lípidos/mL G	DEFINITY® (Lote 4519M) (0,75 mg de mezcla de lípidos/mL)
Número de días a 25 °C	149 días (aproximadamente 5 meses)	6 meses
PORCENTAJE DE IMPUREZA TOTAL	2,478	23,17
* 215 mg de G que contiene LB, 0,59 % en peso de LB (proporción de 1:168 para LB:G).		

Ejemplo 6. Estabilidad del polvo de mezcla de lípidos

[0195] El polvo de LB se almacenó en una botella de color ámbar con una tapa revestida de PTFE a 25 °C. Las muestras se prepararon en una solución de metanol (50 %), propilenglicol (10 %), glicerina (10 %), acetato de amonio (30 %, 5 mM). La solución se transfirió a un vial de HPLC y se analizó usando una HPLC de fase inversa en gradiente con detección por dispersión de luz evaporativa (ELSD) usando una columna C18 y una fase móvil que contenía: agua, metanol, acetato de amonio y trietilamina.

[0196] La Tabla 7 proporciona datos de estabilidad para el polvo de mezcla de lípidos en comparación con DEFINITY® almacenado a 25 °C.

[0197] Estos datos demuestran que el polvo de mezcla de lípidos es mucho más robusto que la formulación DEFINITY® a temperaturas más altas.

Tabla 7. Datos de impurezas para el polvo de mezcla de lípidos

	LB en polvo	DEFINITY® (0,75 mg de mezcla de lípidos/mL)
	25 °C	25 °C
Número de días a 25 °C	87 días (aproximadamente 3 meses)	3 meses
PORCENTAJE DE IMPUREZA TOTAL	1,747	11,86

Ejemplo 7. Activación de DEFINITY®

[0198] El agente de contraste ultrasónico comercialmente disponible, aprobado por la FDA, DEFINITY® (Lantheus Medical Imaging, Inc.) se pone en una forma activa ("activado") mediante agitación mecánica (descrita en la patente de EE. UU. 6.039.557) de la solución de PFP/lípidos utilizando un VIALMIX®. Esto da como resultado la incorporación de gas en las microesferas lipídicas y representa el producto activo (consulte la información de prescripción de DEFINITY®). La activación óptima de VIALMIX® de DEFINITY® produce microesferas llenas de gas que se pueden analizar en cuanto a la distribución de tamaño y número usando un medidor de tamaño de partículas (Malvern FPIA-3000 Sysmex) cuando se

diluyen en una solución de cubierta adecuada (consulte la Tabla 8) que tiene puntos de corte inferiores y superiores de 1 y 40 micras.

Tabla 8. Número y tamaño de burbujas DEFINITY® analizados usando un Malvern FPIA-3000 Sysmex.

Muestra DEFINITY®	Diámetro medio de la microesfera (micras) ^a	Microesferas por mL (x 10 ⁹) ^b
Muestra 1	1,7	2,67
Muestra 2	1,6	3,20
Muestra 3	1,7	3,20
Muestra 4	1,7	1,75
Muestra 5	1,6	2,77
Muestra 6	1,6	2,97
Promedio	1,7	2,76

^a Diámetro medio de microesferas para microesferas que oscilan entre 1 y 40 micras.
^b Concentración media de microesferas para microesferas que van de 1 a 40 micras.

[0199] Se midió la atenuación acústica para muestras seleccionadas usando un sistema de formación de imágenes por ultrasonido clínico Philips Sonos 5500. Las muestras se diluyeron 1:7,7 (1,3 ml más 8,7 ml de solución salina) en una jeringa de 10 ml. Se pipetaron muestras de 200 microlitros de esta jeringa en un vaso de precipitados que contenía 200 ml de solución salina al 0,9% a temperatura ambiente. Una barra agitadora de 2 cm mantuvo la uniformidad de la solución y el transductor s3 del sistema de ultrasonido se colocó en la parte superior del vaso de precipitados, justo dentro de la solución y 8,9 cm por encima del margen superior de la barra agitadora. A continuación, se adquirieron digitalmente 5 segundos de imágenes de 120 Hz y se escribieron en el disco. El sistema US se utilizó en modo IBS, el TGC se fijó en el valor mínimo para todas las profundidades y el LGC se deshabilitó. El índice mecánico (IM) fue de 0,2 con un ajuste de potencia de 18 dB por debajo del máximo. La ganancia de recepción se fijó en 90 y la compresión en 0. Para cada muestra analizada, la adquisición de datos US se adquirió antes (en blanco) y después de la inyección de la muestra. Se tomaron medidas a los 20, 60 y 120 segundos después de la introducción de la muestra en el vaso de precipitados.

[0200] El análisis de imágenes se realizó utilizando Philips QLab, que leyó archivos producidos por el sistema US y calculó valores en dB para el modo IBS. Las regiones de interés se dibujaron en la barra de agitación y los valores de dB se promediaron durante la adquisición completa de 5 segundos (aproximadamente 360 fotogramas de video). Las mediciones de atenuación se obtuvieron restando el valor de ROI de la muestra del valor de ROI en blanco (ambos en dB). Esto se dividió por el doble de la distancia entre el transductor de EE. UU. y el margen superior de la barra de agitación para obtener la atenuación en dB/cm. Los valores finales se obtuvieron aplicando una regresión lineal de las muestras tomadas con respecto al tiempo después de la introducción en el vaso de precipitados. Los valores utilizados se derivaron de la intersección de la línea de regresión con el eje y.

Tabla 9. Medición^a de atenuación acústica DEFINITY®

	Vial 1	Vial 2	Vial 3	Media	SD
DEFINITY®	2,06	1,97	2,30	2,11	0,17

^a La atenuación acústica de DEFINITY® se determinó con un Philips Sonos 5500.

Ejemplo 8. Activación de formulaciones no acuosas

[0201] Se pesaron nuevas formulaciones de mezcla de lípidos descritas en el Ejemplo 1 en viales de vidrio Wheaton de 2 cc, se añadió diluyente si era necesario, se reemplazó el espacio de cabeza con gas PFP, se insertó un tapón de lyo de butilo de color gris West y el vial engarzado con un sello de aluminio. Se inyectó diluyente a través del tapón si era necesario, y el vial se agitó mecánicamente usando VIALMIX® durante un tiempo para producir una activación óptima del producto. Se determinó el número y distribución de microesferas y se examinó la atenuación de ultrasonidos de algunas formulaciones activadas mediante los métodos descritos en el Ejemplo 7.

55

60

65

Tabla 10. Características de microesferas para 7,5 mg de mezcla de lípidos/ml de formulación de PG con diluyente de formulación a añadido justo antes de la activación.

Muestra	Diámetro medio de microesferas (micras)	Microesfera por mL (x 10 ⁹)
Formulación LB/PG (añadir diluyente y luego tapar)^b	1,82	1,76
Formulación LB/PG (tapado, luego inyectar diluyentes a través del tapón)^c	1,82	1,92

^a El diluyente de la formulación contenía glicerol, tampón de fosfato y solución salina para igualar la composición del vial DEFINITY® tras la dilución de la formulación.
^b Formulación de 177 mg de propilenglicol (0,72 % en peso de LB; proporción de 1:138 para LB:PG), 1,59 ml de diluyente a agregado, el espacio de cabeza reemplazado con PFP, el vial de 2 ml sellado con un tapón de butilo gris West, engarzado con un sello de aluminio, el vial se activó durante 45 segundos con un VIALMIX® y se probó el número de microesferas y el tamaño promedio como se describe en el Ejemplo 7.
^c 177 mg de formulación de propilenglicol (0,72% en peso de LB; proporción de 1:138 para LB:PG) en un vial de 2 ml, el espacio de cabeza se reemplazó con PFP y el vial se tapó y engarzó. Se inyectó diluyente^a, 1,59 ml, a través del tapón en el vial con una jeringa desechable, el vial se activó inmediatamente durante 45 segundos con un VIALMIX® y luego se analizó como se describe en el Ejemplo 7.

Tabla 11. Características de las microesferas y atenuación acústica para una formulación de PG de 7,5 mg de mezcla de lípidos/ml con solución salina añadida justo antes de la activación.

Muestra	Diámetro medio de microesferas (micras)	Microesfera por mL (x 10 ⁹)	Atenuación acústica media (DE) ^b (dB/cm)
Formulación LB/PG (agregue solución salina y luego tape)^a	1,84	1,88	2,13 (0,34)

^a Formulación de propilenglicol de 177 mg (0,72 % en peso de LB; proporción de 1:138 para LB:PG), se agregaron 1,59 ml de solución salina al 0,9 %, se reemplazó el espacio de cabeza con PFP, el vial de 2 ml se selló con un tapón de butilo gris West, engarzado con un sello de aluminio, el vial activado y probado para el número de microesferas y tamaño promedio como se describe en el Ejemplo 7.
^b Atenuación acústica determinada como se describe en el Ejemplo 7.

Tabla 12. Característica de la microesfera y atenuación acústica para formulaciones de 7,5 mg de mezcla de lípidos/ml de PG/G

Muestra	Diámetro medio de microesferas (micras)	Microesfera por mL (x 10 ⁹)	Atenuación acústica media (SD) ^c (dB/cm)
Formulación LB/PG/G con solución salina añadida seguida de activación^a	1,68	2,65 x 10 ⁹	No determinado
Formulación LB/PG/G, activada y luego diluida con solución salina^b	1,82	2,23 x 10 ⁹	2,12 (0,27)

^a formulación de propilenglicol y glicerol de 391 mg (LB al 0,33 %; PG al 44,9 %; G al 54,8 %; proporción de 1:138:168 para LB:PG:G), se agregaron 1,38 ml de solución salina al 0,9 %, se reemplazó el espacio de cabeza con PFP, el vial de 2 ml sellado con un tapón de butilo gris West, engarzado con un sello de aluminio, el vial activado y probado para el número de microesferas y el tamaño promedio como se describe en el Ejemplo 7.
^b Formulación de 391 mg de propilenglicol y glicerol (0,33 % LB; 44,9 % PG; 54,8 % G; proporción de 1:138:168 para LB:PG:G), el espacio de cabeza se reemplazó con PFP y el vial se tapó y engarzó como se describe en la nota a pie de página anterior. Se inyectó solución salina, 1,38 ml, en el vial con una jeringa desechable, el vial se activó inmediatamente y luego se probó como se describe en el Ejemplo 7.
^c Atenuación acústica determinada como se describe en el Ejemplo 7.

Tabla 13. Características de las microesferas para formulaciones de PG/G tamponadas (5 mM) de 7,5 mg de mezcla de lípidos/ml con diluyente salino añadido después de la activación.

Proporción de acetato de sodio a ácido acético (acetato total 5 mM)	Diámetro medio de microesferas (micras)	Microesfera por mL (x 10 ⁹)
90:10	1,72	3,37 x 10 ⁹
80:20	1,70	4,69 x 10 ⁹
70:30	1,74	3,83 x 10 ⁹
50:50	1,71	3,67 x 10 ⁹
10:90	1,82	3,01 x 10 ⁹

^a Formulación de propilenglicol y glicerol tamponado de 391 mg, (0,33 % LB; 44,9 % PG: 54,8 % G; proporción de 1:138:168 para LB:PG:G), el vial de 2 ml sellado con un tapón de butilo gris oeste, ondulado con un sello de aluminio, el vial se activó, se agregaron 1,38 ml de solución salina al 0,9 %, se mezcló el vial y se analizó el número de microesferas y el tamaño promedio como se describe en el Ejemplo 7.

15

[0202] Estos estudios demuestran que la mezcla de lípidos formulada en a) PG b) PG/G c) PG/G tamponada puede activarse para formar microesferas que tienen características y atenuación acústica equivalentes a DEFINITY® activado (como mostrado en el Ejemplo 7) simplemente agregando diluyente y agitando en un VIALMIX®. Esto demuestra que no se requiere una formulación previa con diluyente acuoso y que la simple adición es suficiente. Además, el diluyente se puede añadir a la formulación lipídica inyectándolo a través del tapón del vial. Además, la combinación de lípidos en PG/G se puede activar para formar microesferas que tienen características y atenuación acústica equivalentes a DEFINITY® activado (como se muestra en el Ejemplo 7) al agitar antes de agregar el diluyente. Estos hallazgos son sorprendentes.

25 Ejemplo 9. Activación de lípidos individuales o mezcla de lípidos

[0203] Se preparó una formulación (formulación de lípidos individuales) mezclando los fosfolípidos individuales (DPPA, DPPC y MPEG5000 DPPE) en propilenglicol a 0,045:0,401:0,304 (p:p:p) relación (la misma que la relación para la mezcla de lípidos). La formulación de propilenglicol de lípido individual de 7,5 mg/ml resultante se añadió al diluyente (que contenía glicerol, tampón de fosfato y solución salina para igualar la composición del vial DEFINITY®) y se mezcló para formar una concentración de lípido total final de 0,75 mg/ml. Se añadió una parte alícuota de 1,7 ml a un vial de vidrio Wheaton de 2 cc, se reemplazó el espacio de cabeza con gas PFP, se insertó un tapón de lyo de butilo gris West y se engarzó el vial con un sello de aluminio. El vial se activó con un VIALMIX® y se analizó con el Sysmex FPIA 3000 para el número de microesferas y el tamaño medio de las microesferas.

35

Tabla 14. Características de las microesferas para una formulación de PG de 7,5 mg de lípido individual/mL

	Diámetro medio de microesferas (micras)	Microesfera por mL (x 10 ⁹)
Formulación individual de lípidos	1,7	2,46

[0204] Este estudio demuestra que mezclar lípidos individuales en PG, sin preparar una mezcla de lípidos, puede producir una formulación que permite mezclar con un diluyente para formar una solución que puede activarse para producir microesferas con características equivalentes a DEFINITY® activado (en comparación con el Ejemplo 7).

[0205] En otro experimento, se pesó la mezcla de lípidos en un vial de vidrio Wheaton de 2 cc, se añadió matriz (PG/G/solución salina) al vial, se reemplazó el espacio de cabeza con gas PFP, se insertó un tapón de lyo de butilo gris West, se vial engarzado con un sello de aluminio y luego activado a 25 °C con un VIALMIX® y analizado usando el Sysmex FPIA 3000 para número de microesferas y tamaño medio de microesferas. Los resultados se presentan en la Tabla 15.

Tabla 15. Características de las microesferas para Lipid Blend Powder (1,275 mg) en un vial con espacio de cabeza PFP

55

	Diámetro medio de microesferas (micras)	Microesfera por mL (x 10 ⁹)
Formulación de mezcla de lípidos	1,63	4,10

60

[0206] Este estudio demuestra que la mezcla de lípidos en polvo podría pesarse en un vial, agregarse diluyente, reemplazarse el espacio de cabeza con PFP y activarse el vial para producir microesferas con características equivalentes a DEFINITY® activado (en comparación con el Ejemplo 7). Esto demuestra que no era necesario formular previamente los lípidos para permitir la activación.

65

Ejemplo 10. Activación de diferentes concentraciones de lípidos

[0207] La mezcla de lípidos, como se describe en el Ejemplo 1, se usó para hacer formulaciones a concentraciones variables de mezcla de lípidos totales mezclando diferentes cantidades de polvo de LB en propilenglicol (PG) o 1:1 v/v propilenglicol/glicerol (PG/G). Cada formulación de lípidos se pesó en viales de vidrio Wheaton de 2 cc, se añadió diluyente si era necesario, se reemplazó el espacio de cabeza con gas PFP, se insertó un tapón de liofilito gris West y el vial se engarzó con un sello de aluminio. Los viales se agitaron mecánicamente utilizando VIALMIX® para activar el producto y se añadió diluyente, si era necesario, a través del tapón utilizando una jeringa equipada con una aguja. El número de microesferas y la distribución se determinaron como se describe en el Ejemplo 7.

10 **Tabla 16. Características de las microesferas con diferentes formulaciones de PG de lípidos mg/mL^a**

Concentración de la mezcla de lípidos en la formulación	Tiempo de dilución	Concentración de mezcla de lípidos después de la dilución	Microesfera por mL (x 10 ⁹)	Diámetro (μm)
DEFINITY® 0,75 mg de mezcla de lípidos por mL al día	n/A	n/A	3,05	1,66
7,5 mg de mezcla de lípidos/mL PG	Antes de la activación ^b	0,75 mg/ml	4,55	1,63
7,5 mg de mezcla de lípidos/mL PG	Antes de la activación ^c	0,75 mg/ml	4,65	1,72
DEFINITY® diluido a 0,375 mg de mezcla de lípidos por mL^d	Antes de la activación	0,375 mg/ml	1,38	1,66
3,75 mg de mezcla de lípidos/mL PG	Antes de la activación ^b	0,375 mg/ml	2,24	1,7
3,75 mg de mezcla de lípidos/mL PG	Antes de la activación ^c	0,375 mg/ml	2,69	1,72
DEFINITY® diluido a 0,1875 mg de mezcla de lípidos por mL^d	Antes de la activación	0,1875 mg/ml	0,54	1,75
1,875 mg de mezcla de lípidos/mL PG	Antes de la activación ^b	0,1875 mg/ml	0,892	1,72
1,875 mg de mezcla de lípidos/mL PG	Antes de la activación ^c	0,1875 mg/ml	1,25	1,74

^aViales (viales Wheaton de 2 cc) se prepararon pesando 177 mg de propilenglicol que contenían 1,875, 3,75 o 7,5 mg de mezcla de lípidos/mL (proporciones de 1:552; 1:276 y 1:138 para LB:PG, respectivamente).

^bLos viales se diluyeron con solución salina 8:1 (v:v) y glicerol hasta un volumen final de 1,7 ml justo antes de la activación. Luego, el espacio de cabeza de aire se intercambió con PFP, se selló con un tapón de butilo gris West, el vial se engarzó con un sello de aluminio, se activó y se analizó el número de microesferas y el tamaño promedio como se describe en el Ejemplo 7.

^cLos viales se diluyeron con solución salina hasta un volumen final de 1,7 ml justo antes de la activación. A continuación, el espacio de cabeza de aire se intercambió con PFP, se selló con un tapón de butilo gris West, el vial se engarzó con un sello de aluminio, se activó y se analizó el número de microesferas y el tamaño medio como se describe en el Ejemplo 7.

^dSe prepararon viales (viales de Wheaton de 2 cc), diluyendo DEFINITY® con la matriz de formulación 1 a 4 o 1 a 2 (también se analizó DEFINIT® sin diluir), el gas del espacio de cabeza se intercambió con PFP, los viales se taparon y engarzaron con un sello de aluminio, se activaron y se analizaron para determinar el número de microesferas y el tamaño promedio como descrito en el ejemplo 7.

50 **Tabla 17. Características de las microesferas con diferentes formulaciones de lípidos mg/mL PG/G^a**

Concentración de la mezcla de lípidos en la formulación	Tiempo de dilución	Concentración de mezcla de lípidos después de la dilución	Microesfera por mL (x 10 ⁹)	Diámetro (μm)
DEFINITY® 0,75 mg de mezcla de lípidos por mL^d	n/A	n/A	3,05	1,66
3,75 mg de mezcla de lípidos/mL PG/G	Antes de la activación ^b	0,75 mg/ml	4,71	1,66
3,75 mg de mezcla de lípidos/mL PG/G	Después de la activación ^c	0,75 mg/ml	3,12	1,60

(Continuación)

	Concentración de la mezcla de lípidos en la formulación	Tiempo de dilución	Concentración de mezcla de lípidos después de la dilución	Microesfera por mL (x 10 ⁹)	Diámetro (μm)
5	DEFINITY® diluido a 0,375 mg de mezcla de lípidos por mL^d	Antes de la activación	0,375 mg/ml	1,38	1,66
10	1,875 mg de mezcla de lípidos/mL PG/G	Antes de la activación ^b	0,375 mg/ml	2,45	1,74
15	1,875 mg de mezcla de lípidos/mL PG/G	Después de la activación ^c	0,375 mg/ml	1,73	1,66
20	DEFINITY® diluido a 0,1875 mg de mezcla de lípidos por mL^d	Antes de la activación	0,1875 mg/ml	0,54	1,75
25	0,9375 mg de mezcla de lípidos/mL PG/G	Antes de la activación ^b	0,1875 mg/ml	1,00	1,72
30	0,9375 mg de mezcla de lípidos/mL PG/G	Después de la activación ^c	0,1875 mg/ml	0,41	1,89

^aViales (viales de Wheaton de 2 cc) se prepararon pesando 391 mg de propilenglicol y glicerol 1:1 (v/v) que contenían 0,9375, 1,875 o 3,75 mg de mezcla de lípidos/mL (proporciones de 1:552:672; 1:276:336 y 1:138:168 para LB:PG:G, respectivamente).

^bViales se diluyeron con solución salina hasta un volumen final de 1,7 ml justo antes de la activación. Luego, el espacio de cabeza de aire se intercambió con PFP, se selló con un tapón de butilo gris West, el vial se engarzó con un sello de aluminio, se activó y se analizó el número de microesferas y el tamaño promedio como se describe en el Ejemplo 7.

^cEl espacio de cabeza de aire se intercambió con PFP, el vial sellado con un tapón de butilo gris West, engastado con un sello de aluminio y activado. Se añadió solución salina a un volumen final de 1,7 ml y se analizó el número de microesferas y el tamaño promedio del vial como se describe en el Ejemplo 7.

^dViales (viales Wheaton de 2 cc) se prepararon diluyendo DEFINITY® con matriz de formulación de 1 a 4 o de 1 a 2 (DEFINIT® sin diluir también fue probado), el gas del espacio de cabeza se intercambió con PFP, los viales se taparon y engarzaron con un sello de aluminio, se activaron y se probó el número de microesferas y el tamaño promedio como se describe en el Ejemplo 7.

40 [0208] Estos estudios demostraron que las formulaciones de mezclas de lípidos que tienen diferentes concentraciones de lípidos, cuando se activan, producen números proporcionales de microesferas (por volumen dado, 1 ml). El tamaño de las microesferas fue equivalente al DEFINITY® activado y el número de microesferas fue similar o superior al del DEFINITY® activado o una forma diluida equivalente. No se esperaba la capacidad de formar microesferas con características equivalentes a DEFINITY® activado con una variedad de diferentes concentraciones de mezcla de lípidos en PG o PG/G. La capacidad de lograr esto mediante la activación de la mezcla de lípidos en PG/G antes de la adición de diluyentes fue aún más sorprendente.

Ejemplo 11. Recipientes

50 [0209] Se llenaron nuevas formulaciones de lípidos o DEFINITY® en varios recipientes, incluidos: viales, jeringas y tubos de plástico flexibles, que luego se activaron. En todos los estudios, se colocó una cantidad adecuada de formulación de lípidos en el recipiente, se reemplazó el espacio superior con PFP, se selló el recipiente y se activó la formulación.

55 **Tabla 18. Características de las microesferas para la mezcla de lípidos en formulaciones de PG o PG/G activadas en un vial Schott de 2 mL^a**

	Peso de relleno	Tiempo de dilución	Volumen de dilución salina (mL)	Diámetro medio de microesferas (micras)	Microesfera por mL (x 10 ⁹)
60	55 mg de 7,5 mg LB/mL de PG	Antes de la activación	0,50	1,52	6,23
	89 mg de 7,5 mg LB/mL de PG	Antes de la activación	0,80	1,52	4,83
65	134 mg de 7,5 mg LB/mL de PG	Antes de la activación	1,20	1,61	5,29

(Continuación)

	Peso de relleno	Tiempo de dilución	Volumen de dilución salina (mL)	Diámetro medio de microesferas (micras)	Microesfera por mL (x 10⁹)
5	177 mg de 7,5 mg LB/mL de PG	Antes de la activación	1,59	1,63	5,00
	122 mg de 3,75 mg LB/mL de PG/G	Antes de la activación	0,43	1,57	5,43
10	196 mg de 3,75 mg LB/mL de PG/G	Antes de la activación	0,69	1,55	5,31
	295 mg de 3,75 mg LB/mL de PG/G	Antes de la activación	1,04	1,61	4,48
15	392 mg de 3,75 mg LB/mL de PG/G	Antes de la activación	1,38	1,60	4,96
	196 mg de 3,75 mg LB/mL de PG/G	Después de la activación	0,69	1,88	1,77
20	295 mg de 3,75 mg LB/mL de PG/G	Después de la activación	1,04	1,69	2,68
	392 mg de 3,75 mg LB/mL de PG/G	Después de la activación	1,38	1,56	4,06
25	a Se pesó la cantidad adecuada de 7,5 mg de LB/mL de PG o 3,75 mg de LB por ml de formulación de PG/G en un vial Schott de 2 ml, se añadió una cantidad adecuada de solución salina para las muestras "antes de la activación", se reemplazó el espacio de cabeza de aire con PFP, el vial se selló con tapones de butilo gris West, se engarzó con un sello de aluminio, se activó, se agregó una cantidad apropiada de solución salina para "muestras posteriores a la activación" y se analizó el número de microesferas y el tamaño promedio como se describe en el Ejemplo 7. Los viales se activaron usando un VIALMIX®.				
30					

Tabla 19. Características de las microesferas para la mezcla de lípidos en formulaciones de PG o PG/G activadas en un vial V de Wheaton^a de 1 mL

	Peso de relleno	Tiempo de dilución	Volumen de dilución salina (mL)	Diámetro medio de microesferas (micras)	Microesfera por mL (x 10⁹)
40	55 mg de 7,5 mg LB/mL de PG	Antes de la activación	0,50	1,64	6,33
	88 mg de 7,5 mg LB/mL de PG	Antes de la activación	0,80	1,73	4,04
45	177 mg de 7,5 mg LB/mL de PG	Antes de la activación	1,59	1,63	5,00
	122 mg de 3,75 mg LB/mL de PG/G	Antes de la activación	0,43	1,57	5,28
50	392 mg de 3,75 mg LB/mL de PG/G	Antes de la activación	1,38	1,60	4,96
	122 mg de 3,75 mg LB/mL de PG/G	Después de la activación	0,43	1,78	1,06
55	392 mg de 3,75 mg LB/mL de PG/G	Después de la activación	1,38	1,68	3,07
	a Se pesó la cantidad apropiada de 7,5 mg de LB/mL de PG o 3,75 mg de LB/mL de PG/G en un vial V de Wheaton de 1 mL, se reemplazó el espacio libre de aire con PFP, se agregó una cantidad adecuada de solución salina para muestras "antes de la activación", el vial se selló con tapones de butilo gris West, se engarzó con un sello de aluminio, se activó, se agregó una cantidad apropiada de solución salina para las muestras "después de la activación" y se analizó el número de microesferas y el tamaño promedio como se describe en el Ejemplo 7. Los viales se activaron usando un VIALMIX®.				
60					

Tabla 20. Concentración de microesferas para DEFINITY® activado en jeringas^a

Tamaño de la jeringa	Volumen (ml) de DEFINITY®	Diámetro medio de microesferas (micras)	Microesfera por mL (x 10 ⁹)
3mL	1,5	1,63	2,45
5mL	1,6	1,78	0,961
5mL	1,9	1,92	1,00
5mL	2,25	1,76	2,25
5mL	2,7	1,78	0,513

^aDEFINITY® lleno (de 1,5 a 2,7 ml) en jeringas NORM-JECT@ de 3 y 5 ml ((Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, Alemania)), el espacio de cabeza de aire se reemplazó con PFP, la jeringa se activó con un Wig- L-Bug™, probado para el número de microesferas y el tamaño promedio como se describe en el Ejemplo 7.

Tabla 21. Características de las microesferas para la mezcla de lípidos en formulaciones PG o PG/G activadas en jeringa NORMJECT® de 3 mL

Peso de relleno	Tiempo de dilución	Volumen de dilución salina (mL)	Diámetro medio de microesferas (micras)	Microesfera por mL (x 10 ⁹)
101 mg de 7,5 mg LB/mL de PG	Antes de la activación	0,90	1,79	4,02
177 mg de 7,5 mg LB/mL de PG	Antes de la activación	1,59	1,66	4,15
222 mg de 7,5 mg LB/mL de PG	Antes de la activación	0,78	1,72	3,63
222 mg de 3,75 mg LB/mL de PG/G	Después de la activación	0,78	1,57	4,83

^a Se pesó la cantidad apropiada de 7,5 mg de LB/mL de PG o 3,75 mg de formulación de LB/mL de PG/G en una jeringa NORM-JECT@ de 3 ml ((Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, Alemania), una cantidad adecuada de solución salina se agregó para las muestras "antes de la activación", se reemplazó el espacio de cabeza de aire con PFP y se activó la jeringa, se agregó una cantidad apropiada de solución salina para las muestras "después de la activación", y se analizó el número de microesferas y el tamaño promedio de las preparaciones como se describe en el Ejemplo 7. Jeringas se activaron con un VIALMIX®.

Tabla 22. Características de microesferas para mezcla de lípidos en formulaciones PG activadas en jeringa modificada para tener dos compartimentos formados con una cápsula de amalgama dental^a

Peso de llenado ^b	Tiempo de dilución	Volumen de dilución salina (mL)	Diámetro medio de microesferas (micras)	Microesfera por mL (x 10 ⁹)
177 mg de 7,5 mg LB/mL de PG	Antes de la activación	1,59	1,66	4,15
391 mg de 3,75 mg LB/mL de PG/G	Antes de la activación	1,38	1,64	4,14
391 mg de 3,75 mg LB/mL de PG/G	Después de la activación	1,38	1,59	3,92

^a Una jeringa NORM-JECT® de 5 ml (Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, Alemania) se redujo a 3 mL. Se abrió una cápsula de amalgama dental (obtenida de un dentista local), se retiró el polvo que contenía el fondo y se retiró el émbolo del compartimento superior junto con el contenido del compartimento superior. El compartimento superior se encajó en el cilindro de la jeringa cortada.

^b Se pesó la cantidad apropiada de 7,5 mg de LB/mL de PG o 3,75 mg de LB/mL de PG/G en el cuerpo de una jeringa NORM-JECT@ de 5 mL reducida a aproximadamente 2,5 mL ((Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, Alemania), se insertó el émbolo de amalgama dental en la cápsula, se agregó una cantidad adecuada de solución salina para las muestras "antes de la activación", se reemplazó el espacio de cabeza de aire con PFP, se selló la jeringa con una tapa luer lock, se activó, se activó una cantidad adecuada de solución salina añadida para las muestras "después de la activación" y analizadas para determinar el número de microesferas y el tamaño medio como se describe en el Ejemplo 7. Los viales se activaron utilizando un VIALMIX®.

Tabla 23. Características de las microesferas para la mezcla de lípidos en formulaciones de PG o PG/G activadas en jeringa modificada para tener dos compartimentos a

	Peso de llenado ^b	Tiempo de dilución	Volumen de dilución salina (mL)	Diámetro medio de microesferas (micras)	Microesfera por mL (x 10 ⁹)
5	60 mg de 7,5 mg LB/mL de PG	Antes de la activación	0,54	1,83	4,74
	133 mg de 3,75 mg LB/mL de PG/G	Antes de la activación	0,47	1,72	4,42
	133 mg de 3,75 mg LB/mL de PG/G	Después de la activación	0,47	1,89	1,40

^aSe modificó una jeringa NORM-JECT® de 3 ml (Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, Alemania) para que tuviera un abultamiento de aproximadamente 3 mm por 10 mm x 1 mm como un canal de derivación típico de las jeringas comerciales de dos compartimentos. El canal se hizo calentando una pinza de un fórceps y presionándola contra el interior del cilindro de la jeringa a aproximadamente la marca de volumen de 2 mL. El extremo del émbolo de una jeringa se cortó a una longitud de aproximadamente 1 cm y se utilizó como tapón de derivación. También se cortó un segundo émbolo de jeringa.

^b Se pesó la cantidad adecuada de formulación de 7,5 mg LB/mL PG o 3,75 mg LB/mL PG/G en el cuerpo de la jeringa NORM-JECT® modificada de 3 mL debajo del canal de derivación, se insertó el tapón de derivación hasta un punto justo por encima del canal de derivación, se añadió una cantidad apropiada de solución salina a la cámara superior formada después de la inserción del tapón de derivación, se insertó el émbolo de la jeringa de corte completando el llenado de la cámara superior. El espacio libre de aire en la cámara inferior se reemplazó con PFP, la jeringa sellada con una tapa luer lock. La jeringa se activó con un VIALMIX®, el émbolo de la jeringa se empujó para mover el tapón de derivación al canal de derivación, lo que permitió que la solución salina ingresara a la cámara inferior que contenía el producto activado para las muestras "después de la activación". Para las muestras "antes de la activación", se empujó el émbolo de la jeringa para mover el tapón de derivación al canal de derivación, lo que permitió que la solución salina ingresara a la cámara inferior que activó la jeringa usando un VIALMIX®. Se analizó el número de microesferas y el tamaño promedio de las muestras como se describe en el Ejemplo 7.

Tabla 24. Características de las microesferas para formulaciones de mezcla de lípidos PG o PG/G activadas en tubo de plástico de dos compartimentos

	Peso de relleno ^a	Tiempo de dilución	Volumen dilución de salina (mL)	Diámetro medio de microesferas (micras)	Microesfera por mL (x 10 ⁹)
35	177 mg de 7,5 mg LB/mL de PG	Antes de la activación	1,59	1,64	3,11
	392 mg de 3,75 mg LB/mL de PG/G	Antes de la activación	1,38	1,80	2,62
	392 mg de 3,75 mg LB/mL de PG/G	Después de la activación	1,38	1,63	3,72

^a Se pesó la cantidad adecuada de 7,5 mg LB/mL de PG o 3,75 mg LB/mL de PG 7 G en la cámara inferior de un tubo de dos compartimentos (NEOPAC Fleximed Tube, 13,5 3 80 mm, Hoffmann Neopac AG, Oberdiessbach, Suiza), se añadió una cantidad apropiada de solución salina a la cámara superior, se reemplazó el espacio libre de aire en la cámara inferior con PFP, se selló el tubo con una tapa luer lock. El tubo se activó con un VIALMIX®, la solución salina del compartimento superior se transfirió al compartimento inferior y se mezcló para las muestras "después de la activación". Para las muestras "antes de la activación", la solución salina se transfirió al compartimento inferior antes de la activación del tubo usando un VIALMIX®. Se analizó el número de microesferas y el tamaño promedio de las muestras como se describe en el Ejemplo 7.

- 55 [0210] Estos estudios demostraron que el proceso de agitación de formulaciones de mezclas de lípidos PG y PG/G con un agitador mecánico podría lograrse en una variedad de recipientes que incluyen viales, jeringas y un tubo de plástico y producir microesferas con características equivalentes a DEFINITY® activado. Sorprendentemente, la agitación mecánica superó las diferencias en las dimensiones del recipiente y el material del que estaba hecho el recipiente y permitió la formación de microesferas con tamaño y número equivalentes. La activación de las formulaciones de LB en PG y PG/G en jeringas tanto antes como después de la adición de diluyentes es un hallazgo emocionante. Además, ser capaz de separar los diluyentes de la formulación y luego permitir que los dos componentes se unan antes o después de la activación mediante agitación mecánica demuestra nuevas oportunidades para proporcionar preparaciones que pueden lograr una formulación estable a temperatura ambiente con una fácil producción del producto.

Ejemplo 12. Métodos de activación

[0211] Se realizaron estudios para demostrar la capacidad de activar DEFINITY® con varios métodos distintos al uso de VIALMIX®. Estos métodos se describen a continuación con los resultados informados en la Tabla 25. 2,5 pulgadas corresponden a 6,35 cm, 1,5 pulgadas corresponden a 3,81 cm y 3/16 de pulgada corresponden a 0,4762 cm.

- 5 A. Se introdujo DEFINITY® (1,5 ml) en una jeringa de plástico de 3 ml y se conectó a una llave de paso de 3 vías. Se llenó una jeringa separada del mismo tamaño con gas PFP y se conectó a otro puerto en la llave de paso. El DEFINITY® y el gas PFP se mezclaron presionando alternativamente el émbolo de cada jeringa entre 50 y 400 veces. Las mediciones del recuento de microburbujas y del diámetro de las burbujas indican la activación de DEFINITY®.
- 10 B. Se introdujo DEFINITY® (3,0 ml) en una jeringa de plástico de 10 ml y se conectó a una llave de paso de 3 vías. Se llenó una jeringa separada del mismo tamaño con gas PFP y se conectó a otro puerto en la llave de paso. El DEFINITY® y el gas PFP se mezclaron presionando alternativamente el émbolo de cada jeringa hacia adelante y hacia atrás 200 veces. Las mediciones del recuento de microburbujas y del diámetro de las burbujas indican la activación de DEFINITY®.
- 15 C. Una formulación lipídica (1,5 ml de 0,045 mg/ml de DPPA, 0,75 mg/ml de DPPC, 0 mg/ml de MPEG5000DPPE, 4,87 mg de NaCl/ml, 103,5 mg/ml de propilenglicol, 126,2 mg/ml de glicerol, 2,34 mg/ml NaH₂PO₄H₂O, 2,16 mg/mL de NaHPO₄7H₂O) se introdujo en una jeringa de plástico de 3 ml y se conectó a una llave de paso de 3 vías. Se llenó una jeringa separada del mismo tamaño con gas PFP y se conectó a otro puerto en la llave de paso. La formulación y el gas PFP se mezclaron presionando alternativamente el émbolo de cada jeringa hacia adelante y hacia atrás 100 veces. Las mediciones del recuento de microburbujas y del diámetro de las burbujas indican la activación de esta formulación lipídica.
- 20 D. Una formulación lipídica modificada (1,5 ml de 0,045 mg/ml de DPPA, 0,75 mg/ml de DPPC, 0 mg/ml de MPEG5000DPPE, 4,87 mg/ml de NaCl, 103,5 mg/ml de propilenglicol, 126,2 mg/ml de glicerol, 2,34 mg/ml de mL NaH₂PO₄H₂O, 2,16 mg/mL NaHPO₄7H₂O) se introdujo en una jeringa de plástico de 3 ml y se conectó a una llave de paso de 3 vías. Se llenó una jeringa separada del mismo tamaño con gas PFP y se conectó a otro puerto en la llave de paso. Entre la jeringa llena de formulación de lípidos y la llave de paso había un tubo de plástico lleno con siete mezcladores estáticos de rejilla X de alto rendimiento (StaMixCo, GXP-9, 4-PA66, negro). La formulación y el gas PFP se mezclaron presionando alternativamente el émbolo de cada jeringa hacia adelante y hacia atrás 50 veces. Las mediciones del recuento de microburbujas y del diámetro de las burbujas indican la activación de esta formulación lipídica.
- 25 E. Una formulación lipídica modificada (1,5 ml de 0,045 mg/ml de DPPA, 0,75 mg/ml de DPPC, 0 mg/ml de MPEG5000DPPE, 4,87 mg/ml de NaCl, 103,5 mg/ml de propilenglicol, 126,2 mg/ml de glicerol, 2,34 mg/ml de Se extrajeron ml de NaH₂PO₄H₂O, 2,16 mg/ml de NaHPO₄7H₂O) en una jeringa de plástico de 3 ml y se conectó a dos llaves de paso de 3 vías en serie. Se llenó una jeringa separada del mismo tamaño con gas PFP y se conectó a otro puerto en la llave de paso. La formulación y el gas PFP se mezclaron presionando alternativamente el émbolo de cada jeringa hacia adelante y hacia atrás 100 veces. Las mediciones del recuento de microburbujas y del diámetro de las burbujas indican la activación de esta formulación lipídica.
- 30 F. Una formulación lipídica modificada (1,5 ml de 0,045 mg/ml de DPPA, 0,75 mg/ml de DPPC, 0 mg/ml de MPEG5000DPPE, 4,87 mg/ml de NaCl, 103,5 mg/ml de propilenglicol, 126,2 mg/ml de glicerol, 2,34 mg/ml de Se extrajeron ml de NaH₂PO₄H₂O, 2,16 mg/ml de NaHPO₄7H₂O) en una jeringa de plástico de 3 ml y se conectó a una llave de paso de 3 vías. Se llenó una jeringa separada del mismo tamaño con gas PFP y se conectó a otro puerto en la llave de paso. Entre la jeringa llena de formulación de lípidos y la llave de paso había un tubo de plástico lleno con ocho mezcladores estáticos de rejilla X de alto rendimiento (StaMixCo, GXF-10-2-ME, naranja). La formulación y el gas PFP se mezclaron presionando alternativamente el émbolo de cada jeringa hacia adelante y hacia atrás 100 veces. Las mediciones del recuento de microburbujas y del diámetro de las burbujas indican la activación de esta formulación lipídica.
- 35 G. Una formulación lipídica modificada (1,5 ml de 0,045 mg/ml de DPPA, 0,401 mg/ml de DPPC, 0,304 mg/ml de MPEG5000DPPE, 4,87 mg/ml de NaCl, 155,25 mg/ml de propilenglicol, 31,55 mg/ml de glicerol, 2,34 mg/ml de Se extrajeron ml de NaH₂PO₄H₂O, 2,16 mg/ml de NaHPO₄7H₂O) en una jeringa de plástico de 3 ml y se conectó a una llave de paso de 3 vías. Se llenó una jeringa separada del mismo tamaño con gas PFP y se conectó a otro puerto en la llave de paso. La formulación y el gas PFP se mezclaron presionando alternativamente el émbolo de cada jeringa hacia adelante y hacia atrás 100 veces. Las mediciones del recuento de microburbujas y del diámetro de las burbujas indican la activación de esta formulación lipídica.
- 40 H. DEFINITY® (1,5 ml) más 3,5 ml de solución salina se extrajeron en una jeringa de plástico de 5 ml y se conectaron a una llave de paso de 3 vías. Se llenó una jeringa separada del mismo tamaño con gas PFP y se conectó a otro puerto en la llave de paso. El DEFINITY®, la solución salina y el gas PFP se mezclaron presionando alternativamente el émbolo de cada jeringa hacia adelante y hacia atrás 100 veces. Las mediciones del recuento de microburbujas y del diámetro de las burbujas indican la activación de DEFINITY®.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

- I. Se introdujo DEFINITY® (1,5 ml) en una jeringa de plástico de 3 ml y se conectó a una llave de paso de 3 vías. Se llenó una jeringa separada del mismo tamaño con gas PFP y se conectó a otro puerto en la llave de paso. Entre la jeringa llena de DEFINITY® y la llave de paso había un tubo de plástico con un mezclador helicoidal de plástico (StaMixCo, 2,5" x 3/16", 15 vueltas helicoidales en 2,5 pulgadas). El DEFINITY® y el gas PFP se mezclaron presionando alternativamente el émbolo de cada jeringa hacia adelante y hacia atrás 50 veces. Las mediciones del recuento de microburbujas y del diámetro de las burbujas indican la activación de DEFINITY®.
- J. DEFINITY® (3,0 ml) se introdujo en una jeringa de plástico de 10 ml y se conectó a una llave de paso de 3 vías. Se llenó una jeringa separada del mismo tamaño con gas PFP y se conectó a otro puerto en la llave de paso. Entre la jeringa llena de DEFINITY® y la llave de paso había un tubo de plástico con un mezclador helicoidal de plástico (StaMixCo, 2,5" x 3/16", 15 vueltas helicoidales en 2,5 pulgadas). El DEFINITY® y el gas PFP se mezclaron presionando alternativamente el émbolo de cada jeringa hacia adelante y hacia atrás 50 veces. Las mediciones del recuento de microburbujas y del diámetro de las burbujas indican la activación de DEFINITY®.
- K. Se extrajo DEFINITY® (1,5 ml) en una jeringa de plástico de 3 ml y se conectó directamente a un tubo de plástico con un mezclador helicoidal de plástico (StaMixCo, 2,5" x 3/16", 15 vueltas helicoidales en 2,5 pulgadas). Se llenó una jeringa separada del mismo tamaño con gas PFP y se conectó al otro extremo del tubo de plástico. El DEFINITY® y el gas PFP se mezclaron presionando alternativamente el émbolo de cada jeringa hacia adelante y hacia atrás 25 veces. Las mediciones del recuento de microburbujas y del diámetro de las burbujas indican la activación de DEFINITY®.
- L. DEFINITY® (1,5 ml) se introdujo en una jeringa de plástico de 3 ml y se conectó directamente a un filtro QMA de 20 u (Waters). Se llenó una jeringa separada del mismo tamaño con gas PFP y se conectó al otro extremo del filtro. El DEFINITY® y el gas PFP se mezclaron presionando alternativamente el émbolo de cada jeringa hacia adelante y hacia atrás 50 veces. Las mediciones del recuento de microburbujas y del diámetro de las burbujas indican la activación de DEFINITY®.
- M. DEFINITY® (1,5 ml) se introdujo en una jeringa de plástico de 3 ml y se conectó directamente a un filtro QMA de 20 u (Waters) y un tubo de plástico con un mezclador helicoidal de plástico (StaMixCo, 2,5" x 3/16", 15 vueltas helicoidales en 2,5 pulgadas). Se llenó una jeringa separada del mismo tamaño con gas PFP y se conectó al otro extremo del mezclador. El DEFINITY® y el gas PFP se mezclaron presionando alternativamente el émbolo de cada jeringa hacia adelante y hacia atrás 50 veces. Las mediciones del recuento de microburbujas y del diámetro de las burbujas indican la activación de DEFINITY®.
- N. DEFINITY® (0,6 ml) se introdujo en una jeringa de vidrio de 1 ml y se conectó a un soporte metálico de 1,5 pulgadas que contenía un filtro de 5 u. Se llenó una jeringa de vidrio separada del mismo tamaño con gas PFP y se conectó al otro extremo del soporte metálico. Este dispositivo de extrusión está disponible comercialmente (LiposoFast-Basic, Avestin, Inc.). El DEFINITY® y el gas PFP se mezclaron presionando alternativamente el émbolo de cada jeringa hacia adelante y hacia atrás 25 veces. Las mediciones del recuento de microburbujas y del diámetro de las burbujas indican la activación de DEFINITY®.
- O. Se extrajo DEFINITY® (0,6 ml) en una jeringa de vidrio de 1 ml y se conectó a un soporte metálico de 1,5 pulgadas que contenía un filtro de 5 u. Se llenó una jeringa de vidrio separada del mismo tamaño con gas PFP y se conectó al otro extremo del soporte metálico. Este dispositivo de extrusión está disponible comercialmente (LiposoFast-Basic, Avestin, Inc.). El DEFINITY® y el gas PFP se mezclaron presionando alternativamente el émbolo de cada jeringa hacia adelante y hacia atrás 100 veces. Las mediciones del recuento de microburbujas y del diámetro de las burbujas indican la activación de DEFINITY®.
- P. DEFINITY® (0,6 ml) se introdujo en una jeringa de vidrio de 1 ml y se conectó a un soporte de metal de 1,5 pulgadas que contenía un filtro de 0,4 o 1,0 micras. Se llenó una jeringa de vidrio separada del mismo tamaño con gas PFP y se conectó al otro extremo del soporte metálico. Este dispositivo de extrusión está disponible comercialmente (LiposoFast-Basic, Avestin, Inc.). El DEFINITY® y el gas PFP se mezclaron presionando alternativamente el émbolo de cada jeringa hacia adelante y hacia atrás 25 veces. Las mediciones del recuento de microburbujas y del diámetro de las burbujas indican la activación de DEFINITY®.
- Q. Se agitó un vial de DEFINITY® (1,5 ml) en el ajuste más alto durante 5 minutos. Las mediciones del recuento de microburbujas y del diámetro de las burbujas indican la activación de DEFINITY®.
- R. Se sonicó un vial de DEFINITY® (1,5 ml) durante 2 minutos. La solución era de color blanco lechoso; sin embargo, no se analizó el recuento de microburbujas ni las mediciones del diámetro de las burbujas.
- S. Se trató un vial de DEFINITY® (1,5 ml) durante 5 minutos con un homogeneizador de paletas de alta velocidad. La solución era de color blanco lechoso; sin embargo, no se analizó el recuento de microburbujas ni las mediciones del diámetro de las burbujas.
- T. Se aseguró un vial de DEFINITY® (1,5 ml) en el extremo de un palo de madera de 0,75" x 2,25" x 23", se movió

entre dos postes de madera con una separación de 15" entre 300 y 1500 veces a una velocidad de 100 resultados/27 segundos, y se ensayó para medir el recuento de microburbujas o el diámetro de la burbuja. Las mediciones del recuento de microburbujas y del diámetro de las burbujas indican la activación de DEFINITY®.

5 **Tabla 25. Resultados de recuentos de microburbujas y diámetro utilizando un analizador de microburbujas Sysmex.**

Ejemplo	Nº de depresiones del cilindro de la jeringa de un lado a otro (Ejemplo "T" es nº resultados)	Nº Microburbujas ($\times 10^9$) por ml	Diámetro de microburbujas (micras)
A	50	0,80, 1,49	1,8 - 2,0
	75	1,19	1,7
	100	0,57, 1,25, 1,40	1,8, 1,9
	200	1,28	1,7
	400	1,02	1,6
B	200	0,55	1,7
C	100	1,28	1,7
D	50	0,50	1,9
E	100	0,99	1,7
F	100	0,69	2,0
G	100	1,08	2,0
H	100	0,08	2,3
I	50	0,23	1,9
J	50	0,16	1,9
K	25	0,14	2,0
L	50	0,07	2,1
M	50	0,11	2,1
N	25	0,10	1,7
O	100	0,57	1,3
P	0,4u y 1,0u filtro 25	0,01 y 0,12	3,6 y 1,9
Q	Vórtice 5 min	0,13	2,1
R	Sonicar 2 min	No probado basado en ligeramente lechosa visual	No probado basado en ligeramente lechosa visual
S	Politrón 5 min	No probado basado en ligeramente lechosa visual	No probado basado en ligeramente lechosa visual
T	Entre 300 y 1500 veces a razón de 100 aciertos/27 segundos		
	300x	0,056	1,86
	500x	0,096	1,93
	1000x	0,205	1,90
	1500x	0,194	1,74

50 [0212] Estos estudios demuestran que la activación de DEFINITY® o versiones modificadas del mismo se puede lograr usando una variedad de dispositivos de activación.

REIVINDICACIONES

1. Una mezcla no acuosa que comprende DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE en
- (a) propilenglicol y glicerol;
 (b) propilenglicol; o
 (c) glicerol;
- proporcionado en contacto con un gas perfluorocarbonado,
 donde una mezcla no acuosa es una mezcla que tiene menos o igual al 5% de agua en peso, calculado como el peso de agua al peso de la combinación de lípidos y propilenglicol y/o glicerol.
2. La mezcla no acuosa proporcionada en contacto con un gas perfluorocarbonado como se reivindica en la reivindicación 1, donde la mezcla no acuosa comprende
- (a) menos del 5% en peso de agua, calculado como el peso de agua al peso de la combinación de lípidos y propilenglicol y/o glicerol;
 (b) 1-4% de agua en peso, calculado como el peso de agua por el peso de la combinación de lípidos y propilenglicol y/o glicerol; o
 (c) menos del 1% de agua en peso, calculado como el peso de agua sobre el peso de la combinación de lípidos y propilenglicol y/o glicerol.
3. La mezcla no acuosa proporcionada en contacto con un gas perfluorocarbonado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la mezcla no acuosa proporcionada en contacto con un gas perfluorocarbonado
- (a) comprende iones que son contraíones lipídicos;
 (b) está libre de cloruro de sodio;
 (c) está libre de iones de cloruro;
 (d) además comprende un tampón;
 (e) además comprende un tampón sin fosfato; y/o
 (f) contiene menos del 5 % de impurezas cuando se almacena a temperatura ambiente durante 3 meses.
4. La mezcla no acuosa proporcionada en contacto con un gas perfluorocarbonado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que
- (a) el gas perfluorocarbonado es gas perfluoropropano;
 (b) PEG5000-DPPE es MPEG5000-DPPE;
 (c) DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE están presentes en una proporción de % en moles de 10 a 82 a 8 (10:82:8); y/o
 (d) DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE combinados están presentes en una concentración de (i) 0,9 a 7,5 mg por ml de mezcla no acuosa, o (ii) 0,9 mg a 4 mg por ml de mezcla no acuosa mezcla.
5. La mezcla no acuosa proporcionada en contacto con un gas perfluorocarbonado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la mezcla no acuosa proporcionada en contacto con un gas perfluorocarbonado se proporciona en:
- (i) un vial, opcionalmente
- (a) un vial con un volumen real inferior o igual a 3,8 ml;
 (b) un vial con fondo en V;
 (c) un vial con un fondo plano; o
 (d) un vial con un fondo redondeado;
 opcionalmente en el que dicho vial es un vial de vidrio;
- (ii) un vial de Wheaton de 2 ml, en el que la mezcla no acuosa tiene una concentración de lípidos de 3,75 mg de lípidos por ml de propilenglicol y glicerol;
 (iii) un recipiente de una sola cámara; o
 (iv) un recipiente de múltiples cámaras, opcionalmente en el que el recipiente de múltiples cámaras comprende una primera y una segunda cámara, en el que la mezcla no acuosa proporcionada en contacto con un gas perfluorocarbonado está en la primera cámara y un diluyente acuoso está en la segunda cámara, donde opcionalmente el diluyente acuoso es:
- una solución salina acuosa o
 una solución salina tamponada acuosa.
6. La mezcla no acuosa proporcionada en contacto con un gas perfluorocarbonado según la reivindicación 1, en la que:

la mezcla no acuosa comprende DPPA, DPPC y MPEG5000-DPPE en propilenglicol y glicerol proporcionada en contacto con gas perfluoropropano, en la que DPPA, DPPC y MPEG5000-DPPE están presentes en una proporción de % en moles de 10 a 82 a 8 (10:82:8), y donde la mezcla no acuosa es una mezcla que tiene menos o igual al 5% de agua en peso, calculado como el peso de agua al peso de la combinación de lípidos y propilenglicol y glicerol.

5

7. La mezcla no acuosa proporcionada en contacto con un gas perfluorocarbonado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la mezcla no acuosa proporcionada en contacto con un gas perfluorocarbonado es una composición activada que comprende microesferas de gas encapsuladas en lípidos, opcionalmente en la que

10

(A) las microesferas de gas encapsuladas en lípidos tienen un diámetro promedio que oscila entre

15

- (i) 1,0 mm (micras) a 2,0 µm (micras);
- (ii) 1,2 mm (micras) a 2,0 µm (micras); o
- (iii) 1,4 a 1,8 µm (micras); y/o

20

(B) las microesferas de gas encapsuladas en lípidos están presentes en la composición activada a una concentración superior a 10⁸/mL.

25

8. Un kit que comprende una mezcla no acuosa proporcionada en contacto con un gas perfluorocarbonado como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o 6 en un recipiente, en el que opcionalmente

25

(A) el recipiente es un recipiente de una sola cámara o un recipiente de múltiples cámaras; y/o

25

(B) el kit comprende además:

(a) un segundo recipiente, en el que opcionalmente el segundo recipiente

30

- (i) comprende un diluyente acuoso;
- (ii) es una jeringa precargada;
- (iii) comprende propilenglicol; o
- (iv) comprende glicerol; y opcionalmente

35

(b) un tercer recipiente que comprende un diluyente acuoso.

35

9. El kit según la reivindicación 8, en el que

40

(a) el recipiente es un recipiente multicámara que comprende

40

- (i) una primera cámara que comprende la mezcla no acuosa proporcionada en contacto con un gas perfluorocarbonado según cualquiera de las reivindicaciones 1- 4, comprendiendo la mezcla no acuosa DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE en propilenglicol, y proporcionada en contacto con un gas perfluorocarbonado, y
- (ii) una segunda cámara que comprende glicerol y/o un diluyente acuoso;

45

(b) el recipiente es un recipiente de múltiples cámaras que comprende

50

- (i) una primera cámara que comprende la mezcla no acuosa proporcionada en contacto con un gas perfluorocarbonado como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o 6, comprendiendo la mezcla no acuosa DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE en propilenglicol y glicerol, y provistos en contacto con un gas perfluorocarbonado, y
- (ii) una segunda cámara que comprende un diluyente acuoso; o

55

(c) el recipiente es un recipiente de múltiples cámaras que comprende

55

- (i) una primera cámara que comprende la mezcla no acuosa proporcionada en contacto con un gas perfluorocarbonado como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-4, comprendiendo la mezcla no acuosa DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE en glicerol, y en contacto con un gas perfluorocarbonado, y
- (ii) una segunda cámara que comprende propilenglicol y/o un diluyente acuoso.

60

10. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 8-9, que comprende además un dispositivo de activación.

65

11. Un método para formar microesferas de gas encapsuladas en lípidos que comprende

- (1) agregar glicerol y/o un diluyente acuoso a la mezcla no acuosa proporcionada en contacto con un gas

perfluorocarbonado según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, la mezcla no acuosa que comprende DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE en propilenglicol, y se proporciona en contacto con un gas perfluorocarbonado, y luego se activa la composición resultante para formar microesferas de gas encapsuladas en lípidos;

5 (2) activar la mezcla no acuosa proporcionada en contacto con un gas perfluorocarbonado según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para formar microesferas de gas encapsuladas en lípidos, comprendiendo la mezcla no acuosa DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE en propilenglicol y/o glicerol, y se proporciona en contacto con un gas de perfluorocarbono, donde opcionalmente se agrega un diluyente acuoso a dicha mezcla no acuosa proporcionada en contacto con un gas de perfluorocarbono antes de que se active; o

10 (3) añadir propilenglicol y/o un diluyente acuoso a la mezcla no acuosa proporcionada en contacto con un gas perfluorocarbonado según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, comprendiendo la mezcla no acuosa DPPA, DPPC y PEG5000-DPPE en glicerol, y se ponen en contacto con un gas de perfluorocarbono, y luego se activa la composición resultante para formar microesferas de gas encapsuladas en lípidos;

15 en donde una mezcla no acuosa es una mezcla que tiene menos o igual al 5% en peso de agua, calculado como el peso de agua al peso de la combinación de lípidos y propilenglicol y/o glicerol; opcionalmente donde

20 (i) la mezcla no acuosa proporcionada en contacto con el gas de perfluorocarbono, o la composición resultante, se activa durante 20-45 segundos; o

(ii) la mezcla no acuosa proporcionada en contacto con el gas perfluorocarbonado, o la composición resultante, se activa durante 60-120 segundos.

25 12. El método para formar microesferas de gas encapsuladas en lípidos según la reivindicación 11, en el que dicho método comprende agregar un diluyente acuoso a una mezcla no acuosa que comprende DPPA, DPPC y MPEG5000-DPPE en una proporción de % en moles de 10 a 82 a 8 (10:82:8) en propilenglicol y glicerol y se pone en contacto con un gas perfluoropropano, y luego se activa la composición resultante para formar microesferas de gas encapsuladas en lípidos, y donde la mezcla no acuosa es una mezcla que tiene menos o igual al 5% de agua en peso, calculado como el peso de agua al peso de la combinación de lípidos y propilenglicol y glicerol, opcionalmente en el que

30 (i) la composición resultante se activa durante 20-45 segundos; o
(ii) la composición resultante se activa durante 60-120 segundos.

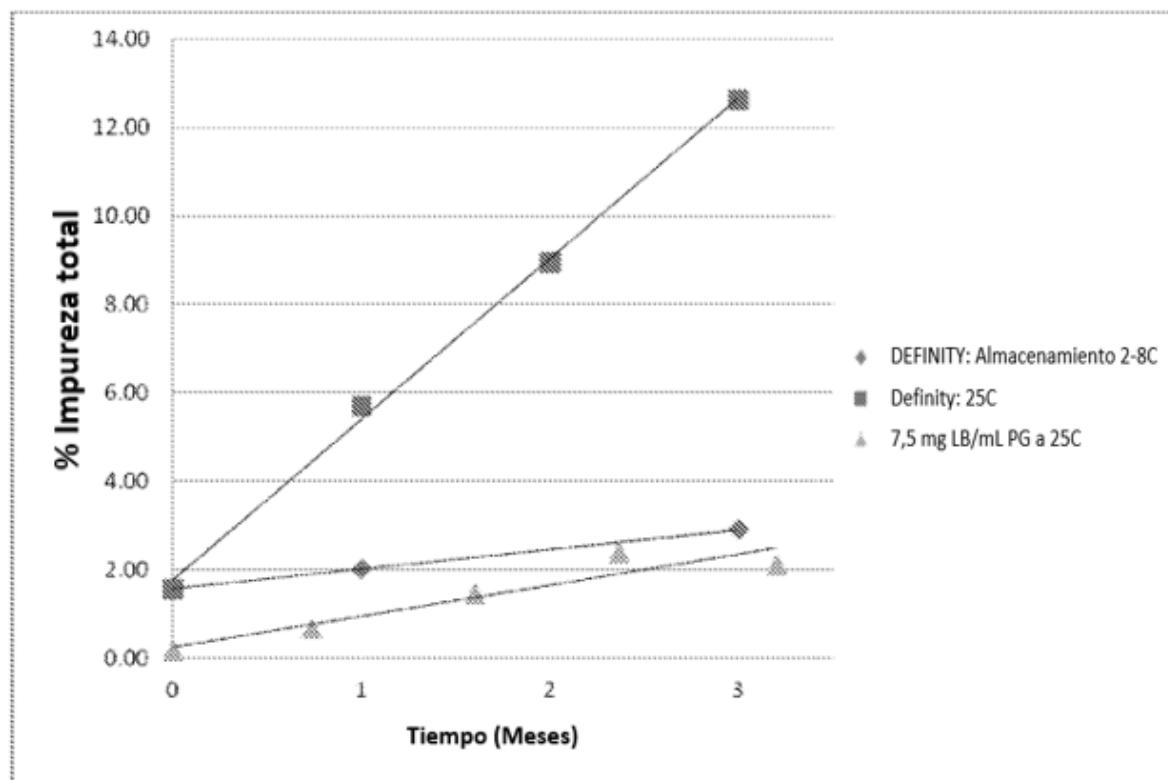
35 13. El método para formar microesferas de gas encapsuladas en lípidos según la reivindicación 11, en el que dicho método comprende activar una mezcla no acuosa que comprende DPPA, DPPC y MPEG5000-DPPE en una proporción de % en moles de 10 a 82 a 8 (10:82:8) en propilenglicol y glicerol y en contacto con un gas perfluoropropano, y en el que la mezcla no acuosa es una mezcla que tiene menos o igual al 5 % en peso de agua, calculado como el peso del agua por el peso del combinación de lípidos y propilenglicol y glicerol, en el que opcionalmente

40 (i) la mezcla no acuosa proporcionada en contacto con el gas perfluoropropano se activa durante 20-45 segundos.

45 14. El método de la reivindicación 11, 12 o 13, en el que las microesferas de gas encapsuladas en lípidos son un agente de contraste de ultrasonidos.

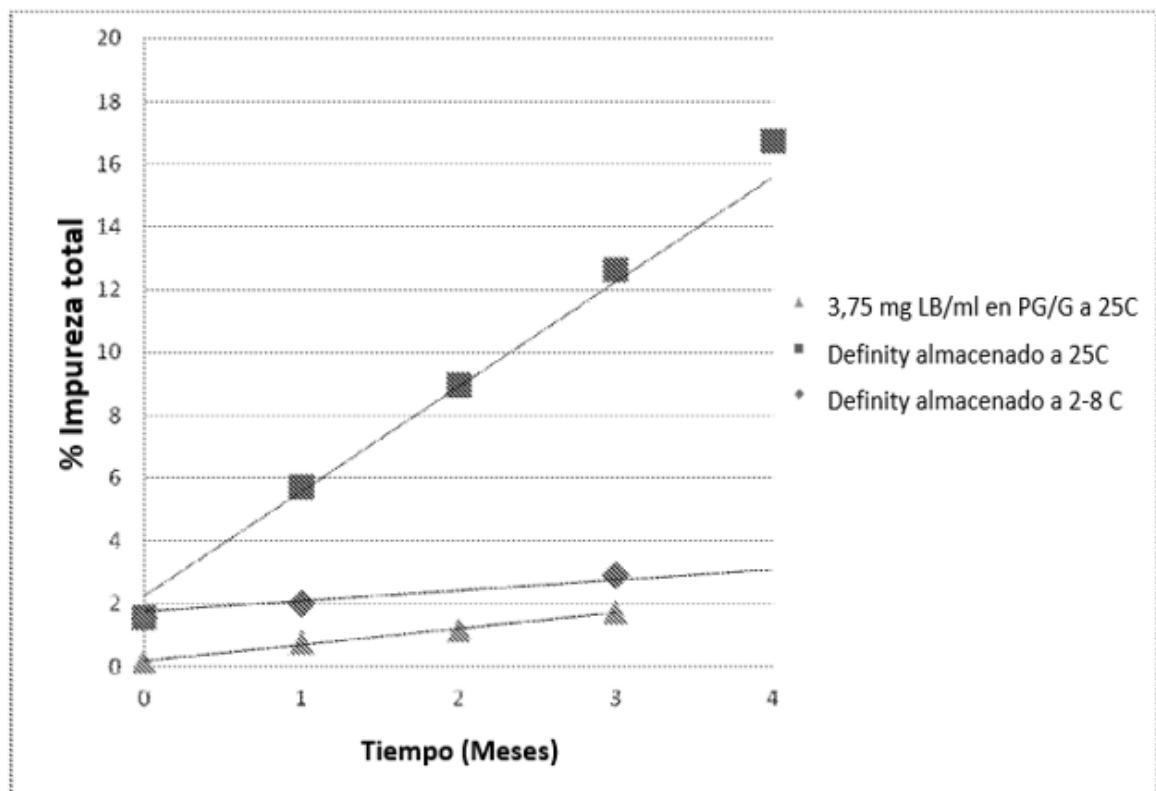
15. El método de la reivindicación 11, 12, 13 o 14, que comprende además diluir las microesferas de gas encapsuladas en lípidos en diluyente acuoso adicional.

FIG. 1. Estabilidad de la formulación LB/PG* versus DEFINITY®



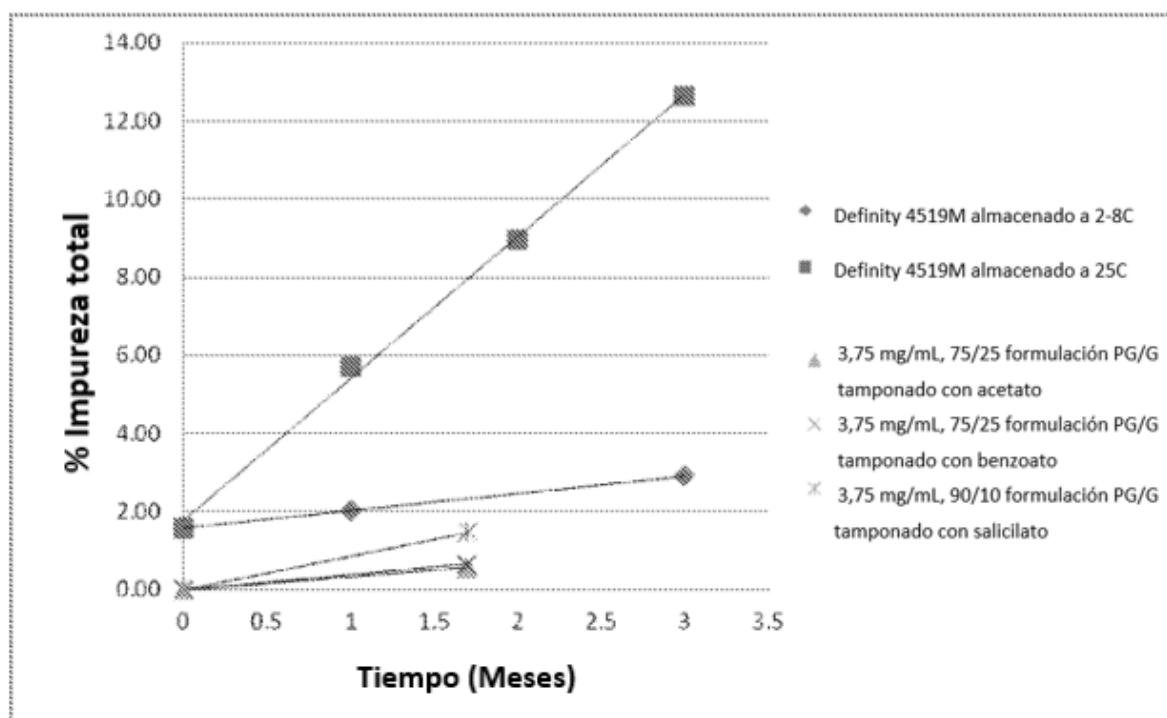
* 177 mg de PG que contiene LB /0,72 % en peso LB; relación de 1:138 para LB:PG)

FIG. 2. Estabilidad de la formulación PG/G* LB/ml de 3,75 mg versus DEFINITY®



* 391 mg de PG/G que contiene LB (0,33 % en peso LB:44,9 % en peso PG:54,8 % en peso G; relación de 1:138:168 para LB:PG:G).

FIG. 3. Estabilidad de la formulación PG/G* tampón de mezcla lipídica/mL de 3,75 mg versus DEFINITY®:



* 5mM tampón en 391 mg de PG/G que contiene LB, (0,33 % en peso LB; 44,9 % en peso PG; 54,8 % en peso G; relación de 1:138:168 para LB:PG:G). Las relaciones representan acetato de sodio a ácido acético, benzoato de sodio a ácido benzoico, salicilato de sodio a ácido salicílico.