



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 321866

(13) B1

(51) Int Cl.

A61K 49/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20003471	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1999.01.14 PCT/US99/00747
(22)	Inng.dag	2000.07.05	(85)	Videreføringsdag	2000.07.05
(24)	Løpedag	1999.01.14	(30)	Prioritet	1998.01.14, US, 71332
(41)	Alm.tilgj	2000.08.29			
(45)	Meddelt	2006.07.17			
(73)	Innehaver	DuPont Pharmaceuticals Co , Chestnut Run Plaza, 974 Centre Road, Wilmington, DE 19805, US			
(72)	Oppfinner	Poh K Hui, 45 Wareland Road, Wellesley, MA 02181, US John E Bishop, Groton, MA, US Eleodoro S Madrigal Jr, Acton, MA, US			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS , Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, NO			
(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for fremstilling av en fosfolipidsuspensjon.			
(56)	Anførte publikasjoner	Ingen			
(57)	Sammendrag				

Foreliggende oppfinnelse beskriver fremgangsmåter for fremstillingen av en lipidblanding og en homogen filtrerbar fosfolipidsuspensjon inneholdende lipidblandingen, hvor en slik suspensjon er nyttig som et ultralydkontrastmiddel.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for fremstilling av en homogen filtrerbar fosfolipidsuspensjon inneholdende en lipidblanding, hvorved det oppnås en suspensjon som er nyttig som et ultralydkontrastmiddel.

- 5 Fremstilling av et fosfolipidkontrastmiddel kan deles i de følgende trinnene: (1) fremstilling av lipidblanding; (2) å blande bulkløsningen, hvilket involverer hydratisering og dispersjon av lipidblandingen i et stort sett vandig medium for å fremstille en lipidsuspensjon; (3) filtrering av bulkløsningen gjennom et steriliserende filter(e) for å gjøre suspensjonen fri for mikrobielle forurensninger; (4) fordele den sterile suspensjonen i
- 10 individuelle medisinglass i et kontrollert aseptisk område; (5) å laste de tildelte medisinglassene inn i et lyofiliseringskammer for å utbytte gassen øverst i medisinglasset med perfluorpropangass (PFP); (6) å forflytte de lukkede medisinglassene etter gassutveksling til en autoklav for sluttsterilisering. Det er tre hovedhindre ved denne fremgangsmåten: (1) homogenitet av lipidblandingen; (2) hydratiseringen av lipidblandingen; (3) homogenitet og partikkelstørrelse av suspensjonen; og (4) steril filtrering av suspensjonen gjennom et steriliseringsfilter(e).

- Fosfolipidblandinger fremstilles typisk ved å oppløse eller suspendere de nødvendige lipidene i et passende vandig eller ikke-vandig løsningsmiddelsystem, og deretter å
- 20 redusere volumet enten ved lyofilisering eller destillasjon. Ideelt sett fremstiller denne fremgangsmåten blandede faste stoffer med høy homogenitet og renhet. Imidlertid, mens den fungerer bra i liten, laboratorieskala, er denne enkle tilnærmingen ofte problematisk ved oppskalering til produksjonsstørrelsesmengder. Vanskelighetene inkluderer: (1) å opprettholde homogenitet gjennom løsningsmiddelfjerningstrinnet (på grunn
- 25 av forskjellige løseligheter); (2) å opprettholde renhet (ofte et problem når vann benyttes på grunn av hydrolytiske sidereaksjoner); (3) å forbedre renhet; (4) å minimalisere løsningsmiddelvolum; og (5) utvinning av de endelige faste stoffene (for eksempel, det er ikke praktisk å skrape ut fast stoff fra en stor reaktor).

- 30 Etter fremstilling av en lipidblanding, involverer sluttblanding typisk introduksjon av blandingen i et vandig medium. Siden fosfolipider er hydrofobiske og ikke er lett løselige i vann, forårsaker tilsetning av fosfolipider eller en lipidblanding direkte til en løsning at lipidpulveret aggregerer og danner klumper som er svært vanskelig å dispergere. Således kan ikke hydratiseringsprosessen kontrolleres innenfor en rimelig driftsperiode.
- 35 Direkte hydratisering av fosfolipider eller en lipidblanding i et vandig medium gir en uklar suspensjon med partikler som strekker seg fra 0,6 μm til 100 μm . På grunn av relativt stor partikkelstørrelsesdistribusjon, kan ikke suspensjonen filtreres ved romtem-

peratur når suspensjonsløsningstemperaturen er under gel-til-væskekrystallfaseovergangstemperaturene for lipider. Lipidene ville akkumuleres i filterene hvilket ville forårsake en begrensning i strømningshastigheten, og i de fleste tilfeller ville filterene bli fullstendig blokkert kort etter. Videre reduksjon i suspensjonspartikkelstørrelsen kan
 5 ikke oppnås gjennom en konvensjonell blandingsprosess ("batching process"), selv etter forlenget blanding (for eksempel 6 timer) ved forhøyede temperaturer (for eksempel 40°C til 80°C) med en vanlig benyttet skipspropell.

Selv om filtrering ved forhøyede temperaturer, dvs. ved temperaturer over faseovergangstemperaturene for lipider, er mulig, ville en signifikant mengde av store lipidpartikler fremdeles bli ekskludert når et normalt filtreringstrykk benyttes. Videre, ville konsentrasjoner av det sterile filtratet ha variable lipidinnhold fra batch til batch avhengig av hvordan lipidene initielt er hydratisert som igjen er bestemt av de fysiske karakteristika, for eksempel morfologi, av utgangsmaterialene.

15 Fremgangsmåten med direkte å hydratisere lipidene eller lipidblandingen for å fremstille en homogen suspensjon og filtrering av suspensjonen gjennom et steriliseringsfilter(e) kan være vanskelig og kostbart å oppskalere til en rimelig kommersiell skala, for eksempel >20 l.

20 Således tar foreliggende fremgangsmåte for fremstilling av en fosfolipidsuspensjon, hvilken fremgangsmåte innbefatter trinn med fremstilling av en lipidblanding, sikte på å løse problemene som omtalt ovenfor ved å fremskaffe en praktisk fremgangsmåte som lett kan oppskaleres og tilpasses til forskjellige produksjonsanlegg uten kostbar modifisering eller individuell tilpasning av eksisterende utstyr.
 25

Følgelig er et formål ved foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe en ny fremgangsmåte for å fremstille en fosfolipidsuspensjon innbefattende et forutgående trinn med fremstilling av nevnte lipidblanding.

30 Dette og andre formål som vil bli åpenbare gjennom den følgende detaljerte beskrivelsen er oppnådd ved oppfinnernes funn av at det å oppløse en lipidblanding i et egnet ikke-vandig løsningsmiddel før introduksjonen av en vandig løsning tar hensyn til produksjon av en fosfolipidsuspensjon.

35 [1] Således tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for å fremstille en fosfolipidsuspensjon, og denne fremgangsmåten er kjennetegnet ved at den omfatter:

- (a) å kontakte minst to lipider med et første ikke-vandig løsningsmiddel for å danne en løsning;
- (b) å konsentrere løsningen til en tykk gel;
- (c) å kontakte den tykke gelen med et andre ikke-vandig løsningsmiddel for å danne en løsning;
- (d) å konsentrere denne løsningen fra trinn (c) for å danne en lipidblanding;
- (e) å kontakte lipidblandingen med et ikke-vandig løsningsmiddel, der lipidblandingen stort sett oppløses i det ikke-vandige løsningsmidlet for å danne en løsning; og
- (f) uten å fjerne det ikke-vandige løsningsmidlet, å kontakte løsningen fra trinn (e) med en vandig løsning for å danne en lipid suspensjon.

[2] Ved en foretrukket utførelsesform velges det ikke-vandige løsningsmidlet fra propylenglykol, etylenglykol og polyetylglykol 300.

[3] Ved en mer foretrukket utførelsesform er det ikke-vandige løsningsmidlet polypropylenglykol.

[4] Ved en annen utførelsesform omfatter lipidblandingen:

- (a) 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glysero-3-fosfatidylcholin;
- (b) 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glysero-3-fosfotidin, mono natriumsalt; og
- (c) N-(metoksypolyetylglykol 5000 karbamoyl)-1,2-dipalmitoyl-*sn*-glysero-3-fosfatidyletanolamin, mono natriumsalt.

[5] Ved en annen foretrukket utførelsesform, varmes det ikke-vandige løsningsmidlet i trinn (1), til en temperatur på omtrent 30 til 70°C før det blir kontaktet med lipidblandingen.

[6] Ved en annen foretrukket utførelsesform oppvarmes det ikke-vandige løsningsmidlet til en temperatur på omtrent 50 til 55°C før det blir kontaktet med lipidblandingen.

[7] Ved en annen foretrukket utførelsesform er forholdet av lipidblandingen til det ikke-vandige løsningsmidlet fra omtrent 5 mg av lipidblandingen pr. ml av ikke-vandig løsningsmiddel til omtrent 15 mg/ml.

[8] Ved en annen foretrukket utførelsesform er forholdet av lipidblanding til ikke-vandig løsningsmiddel omtrent 10 mg/ml.

- [9] Ved en annen foretrukket utførelsesform velges den vandige løsningen i trinn (2) fra vann, saltoppløsning, en saltoppløsning/glyserinblanding og en saltoppløsning/glyserin/ikke-vandig løsningsmiddelblanding.
- 5 [10] Ved en mer foretrukket utførelsesform er den vandige løsningen en saltoppløsning og glyserinblanding.
- [11] Ved en annen foretrukket utførelsesform er den vandige løsningen en saltoppløsning, glyserin, og propylenglykolblanding.
- 10 [12] Ved en annen mer foretrukket utførelsesform er 6,8 mg/ml av natriumklorid tilstede, 0,1 ml/ml av glyserin tilstede, 0,1 ml/ml av propylenglykol tilstede, og omtrent 0,75 til 1,0 mg/ml av lipidblandingen tilstede.
- 15 [13] Ved en enda mer foretrukket utførelsesform er 0,75 mg/ml av lipidblandingen tilstede.
- [14] Ved en annen mer foretrukket utførelsesform er 1,0 mg/ml av lipidblandingen tilstede.
- 20 [15] Ved en annen foretrukket utførelsesform varmes den vandige løsningen i trinn (f), til en temperatur på omtrent 45 til 60°C før den kontaktes med løsningen fra trinn (e).
- [16] Ved en annen mer foretrukket utførelsesform oppvarmes den vandige løsningen til en temperatur fra omtrent 50 til 55°C før den kontaktes med løsningen fra trinn (e).
- 25 [17] Ved en annen foretrukket utførelsesform omfatter fremgangsmåten videre:
(g) å oppvarme lipidsuspensjonen fra trinn (f) til en temperatur omtrent lik med eller høyere enn den høyeste gel-til-væskekrystallfaseovergangstemperatur av lipidene tilstede i suspensjonen.
- 30 [18] Ved en annen mer foretrukket utførelsesform oppvarmes lipidsuspensjonen i trinn (g) til en temperatur på minst omtrent 67°C.
- 35 [19] Ved en annen mer foretrukket utførelsesform omfatter fremgangsmåten videre:
(h) å filtrere lipidsuspensjonen gjennom et steriliseringsfilter.

- [20] Ved en annen enda mer foretrukket utførelsesform utføres filtreringen i trinn (h) ved å benytte to steriliseringsfilterinnsatser.
- 5 [21] Ved en videre foretrukket utførelsesform er steriliseringsfilterinnsatsene i trinn (h) ved en temperatur på fra omtrent 70 til 80°C.
- [22] Ved en annen videre foretrukket utførelsesform benyttes 0,2 µm hydrofile filtre i trinn (h).
- 10 [23] Ved en annen enda mer foretrukket utførelsesform omfatter fremgangsmåten videre:
- (i) å fordele den filtrerte løsningen fra trinn (h) i et medisinglass.
- 15 [24] Ved en annen videre foretrukket utførelsesform omfatter fremgangsmåten videre:
- (j) å utveksle gassen i den øvre delen av medisinglasset fra trinn (i) med en perfluorkarbongass.
- [25] Ved en annen enda videre foretrukket utførelsesform er perfluorkarbongassen per-
- 20 fluorpropan.
- [26] Ved en annen enda videre foretrukket utførelsesform utføres utskiftingen av den øvre gassen ved å benytte ete lyofiliseringskammer.
- 25 [27] Ved en annen enda videre foretrukket utførelsesform omfatter fremgangsmåten videre:
- (k) å sterilisere medisinglasset fra trinn (j).
- [28] Ved en ytterligere videre foretrukket utførelsesform steriliseres medisinglasset i
- 30 trinn (k) ved omtrent 126-130°C i 1 til 10 minutter.
- [29] Ved en annen foretrukket utførelsesform er det første ikke-vandige løsningsmidlet i trinn (a) en blanding av metanol og toluen.
- 35 [30] Ved en annen foretrukket utførelsesform er det andre ikke-vandige løsningsmidlet i trinn (c) metyl t-butyleter.

[31] Ved en annen foretrukket utførelsesform varmes løsningen i trinn (a) til en temperatur som er tilstrekkelig til å fullføre oppløsningen av lipidene i løsningsmidlet.

[32] Ved en annen mer foretrukket utførelsesform varmes løsningen i trinn (a) til omtrent 25 til 75°C.

[33] Ved en annen foretrukket utførelsesform vaskes de oppsamlede faste stoffene i trinn (d) med metyl t-butyleter og tørkes under vakuum.

10 Den ved foreliggende fremgangsmåte oppnådde fosfolipidsuspensjon kan hensiktsmessig omfatte:

- (a) en lipidblanding i en mengde på omtrent 0,75-1,0 mg/ml av suspensjon;
- (b) natriumklorid i en mengde på omtrent 6,8 mg/ml av suspensjon;
- (c) glyserin i en mengde på omtrent 0,1 ml/ml av suspensjon;
- 15 (d) propylenglykol i en mengde på omtrent 0,1 ml/ml av suspensjon; og
- (e) vann, og denne suspensjonen kan fremstilles ved:

- (1) å kontakte en lipidblanding med et ikke-vandig løsningsmiddel, der lipidblandingens stort sett oppløses i det ikke-vandige løsningsmidlet;
- 20 (2) å kontakte løsningen fra trinn (1) med en vandig løsning for å danne en lipidsuspensjon;
- (3) å varme opp lipidsuspensjonen fra trinn (2) til en temperatur omtrent lik med eller høyere enn den høyeste gel-til-væskekrystallfaseovergangstemperatur av lipidene tilstede i suspensjonen; og
- 25 (4) å filtrere lipidsuspensjonen gjennom et steriliseringsfilter.

Formulering

Den foreliggende oppfinnelsen er tiltenkt å bli utført på minst en multigramskala, kilogramskala, multikilogramskala eller industriell skala. Multigramskal, slik det her er benyttet, er foretrukket skalaen der minst et utgangsmateriale er tilstede i 10 g eller mer, mer foretrukket minst 50 g eller mer, enda mer foretrukket minst 100 g eller mer. Multikilogramskala, slik det her er benyttet, er ment å bety skalaen der mer enn 1 kg av minst et utgangsmateriale benyttes. Industriell skala, slik det her er benyttet, er ment å bety en skala som er noe annet en laboratorieskala og som er tilstrekkelig til å forsyne produkt som er tilstrekkelig for enten kliniske tester eller distribusjon til forbrukere.

Lipidblanding eller fosfolipidblanding slik det her er brukt, er ment å stå for to eller flere lipider som har blitt blandet. Lipidblandingen er generelt i en pulverform. Foretrukket er minst en av lipidene et fosfolipid. Foretrukket, inneholder lipidblandingen 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glysero-3-fosfatidylcholin (DPPC), 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glysero-3-fosfotidin, mono natriumsalt (DPPA), og N-(metoksypolyetylenglykol 5000 karbamoyl)-1,2-dipalmitoyl-*sn*-glysero-3-fosfatidyletanolamin, mono natriumsalt (MPEG5000-DPPE). Mengden av hvert lipid tilstede i blandingen vil avhenge av det ønskede sluttproduktet. Foretrukne forhold av hvert lipid er beskrevet i eksempeldelen. Et bredt mangfold av andre lipider, slik som de beskrevet i Unger et al., U.S. patent nr. 5,469,854, hvorved innholdet av denne er innarbeidet her som referanse, kan benyttes i foreliggende fremgangsmåte.

Fosfolipid, slik det her er benyttet, er en fettsubstans inneholdende en oljeaktig (hydrofob) hydrokarbonkjede(r) med en polar (hydrofil) fosforsyrehovedgruppe. Fosfolipider er amfifiliske. De danner spontant grenser og lukker hulrom i vandige media. Fosfolipider består av omtrent 50% av mengden av dyrecelleplasmamembran.

Fremstilling av lipidblandingen

Lipidblandingen kan fremstilles via en vandig suspensjon-lyofiliseringsfremgangsmåte eller en organisk løsningsmiddelopløsnings-utfellingsfremgangsmåte ved å benytte organiske løsningsmidler. Ved den vandige suspensjon-lyofiliseringsfremgangsmåten suspenderes de ønskede lipidene i vann ved en forhøyet temperatur og deretter konsentreres ved lyofilisering. Foretrukket benyttes en oppløsningsfremgangsmåte.

25

Trinn (a):

Den organiske løsningsmiddelopløsnings-utfellingsfremgangsmåten omfatter å kontakte de ønskede lipidene (for eksempel DPPA, DPPC, og MPEG5000 DPPE) med et første ikke-vandig løsningsmiddelsystem. Dette systemet er typisk en kombinasjon av løsningsmidler, for eksempel $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ og toluen/MeOH. Foretrukket er det første ikke-vandige løsningsmidlet en blanding av toluen og metanol. Det kan være ønskelig å varme lipidløsningen til en temperatur som er tilstrekkelig for å oppnå fullstendig oppløsning. En slik temperatur er foretrukket omtrent 25 til 75°C, mer foretrukket omtrent 35 til 65°C.

Etter oppløsning, kan det være ønskelig å fjerne ikke oppløst fremmed materiale ved varmfiltrering eller avkjøling til romtemperatur og deretter filtrering. Kjente frem-

gangsmåter for filtrering kan benyttes (for eksempel tyngdekraftsfiltrering, vakuumfiltrering eller trykkfiltrering).

Trinn (b):

- 5 Løsningen konsentreres deretter til en tykk gel/halvfast stoff. Konsentrasjonen blir foretrukket utført ved vakuumdestillasjon. Andre fremgangsmåter for å konsentrere løsningen, slik som rotasjonsfordampning, kan også benyttes. Temperaturen i dette trinnet er foretrukket omtrent 20 til 60°C, mer foretrukket 30 til 50°C.

10 Trinn (c):

- Den tykke gelen/halvfaste stoffet blir deretter dispergert i et andre ikke-vandig løsningsmiddel. Blandingen slemmes opp, foretrukket nær romtemperatur (for eksempel 15-30°C). Anvendbare andre ikke-vandige løsningsmidler er de som forårsaker at lipidene utfelles fra den filtrerte løsningen. Det andre ikke-vandige løsningsmidlet er foretrukket metyl t-butyleter (MTBE). Andre etere og alkoholer kan også benyttes.
- 15

Trinn (d):

- De faste stoffene fremstilt ved tilsetning av det andre ikke-vandige løsningsmidlet blir deretter samlet opp. De oppsamlede faste stoffene blir foretrukket vasket med en annen
- 20 porsjon av det andre ikke-vandige løsningsmidlet (for eksempel MTBE). Oppsamling kan utføres via vakuumfiltrering eller sentrifugering, foretrukket ved romtemperatur. Etter oppsamling er det foretrukket at de faste stoffene tørkes under vakuum ved en temperatur på omtrent 20 til 60°C.

- 25 På grunn av de følgende årsakene, foretrekkes den organiske løsningsmiddelopløsning-utfellingsfremgangsmåten foran den vandige suspensjon/lyofiliseringsfremgangsmåten:

- (1) Fordi lipidene er nokså løselige i toluen/metanol, reduseres løsningsmiddelvolumene betraktelig (relativ til det vandige prosedyren).
- 30

- (2) På grunn av denne økte løseligheten, blir driftstemperaturen også lavere relativt til den vandige prosedyren, og derved unngås den hydrolytiske ustabiliteten ved fettsyrestere.

(3) Når den avkjøles tilbake til romtemperatur, forblir toluen/metanolløsningen av lipider homogen, hvilket tillater at en romtemperaturfiltrering fjerner fast fremmed materiale.

5 (4) MTBE-utfellingen gir hurtig og enkel isolering av lipidblandingsfaststoff. Med den vandige fremgangsmåten benyttes en tidskrevende lyofiliseringsfremgangsmåte for å isolere materialet.

(5) MTBE-utfellingen gir også mulighet for fjerningen av eventuelle MTBE-løselige urenheter, som føres inn i filtratavfallsstrømmen. Denne muligheten for urenhetsfjerning oppnås ikke når en løsning konsentreres direkte eller lyofiliseres til et fast stoff.

(6) Den foreliggende fremgangsmåten gir homogene faste stoffer.

15 Fremstilling av lipidsuspensjonen

Trinn (e):

I trinn (e) kontaktes en lipidblanding med et ikke-vandig løsningsmiddel, hvorved lipidblanding i det alt vesentlige oppløses i det ikke-vandige løsningsmidlet. Alternativt,
 20 kan de individuelle lipidene kontaktes med det ikke-vandige løsningsmidlet sekvensielt i rekkefølgen: DPPC, DPPA og MPEG5000-DPPE; DPPC, MPEG5000-DPPE og DPPA; MPEG5000-DPPE, DPPA og DPPC; eller MPEG5000-DPPE, DPPC og DPPa. DPPA som er det minst løselige og minst overveldende av lipidene blir ikke tilsatt først. Å tilsette en av de andre lipidene før eller samtidig med å tilsette DPPA, letter oppløsning
 25 ningen av DPPA. Ved et annet alternativ kan de individuelle lipidene forenes i deres faste former og foreningen av de faste stoffene kontaktes med det ikke-vandige løsningsmidlet.

Vesentlig oppløsning indikeres generelt når blandingen av lipidblanding og ikke-vandig
 30 løsningsmiddel blir klar. Som bemerket tidligere, er fosfolipider generelt ikke vannløselige. Således forårsaker direkte tilførsel av en blanding av fosfolipidblanding i et vandig miljø at lipidblanding aggregerer til å danne klumper som er svært vanskelige å dispergere. Den foreliggende oppfinnelsen overviner denne begrensningen ved å oppløse lipidblanding i et ikke-vandig løsningsmiddel før den vandige løsningen tilføres.
 35 Dette gjør det mulig å dispergere lipidblanding jevnt i en væske. Væskedispersjonen kan deretter tilføres et ønsket vandig miljø.

Ikke-vandig er ment å bety et løsningsmiddel eller blanding av løsningsmidler der mengden av vann som er tilstede er tilstrekkelig lav til ikke å hindre oppløsning av lipidblanding. Mengden av ikke-vandig løsningsmiddel som er nødvendig, vil avhenge av løseligheten av lipidblanding og også den endelige ønskede konsentrasjonen av hver komponent. Som en fagmann på området vil forstå, vil nivået av vann tilstede i det ikke-vandige løsningsmidlet som kan tolereres, variere basert på vannløselighetene av de individuelle lipidene i lipidblanding. Jo mer vannløselig de individuelle fosfolipidene er, jo mer vann kan være tilstede i trinn (1). Foretrukket benyttes propylenglykol som det ikke-vandige løsningsmidlet. Imidlertid, kan andre medlemmer av polyolfamilien, slik som etylenglykol, og polyetylenglykol 300 benyttes.

Å blande lipidblanding og det ikke-vandige løsningsmidlet mekanisk kan være nødvendig for å oppnå fullstendig oppløsning. En fagmann på området vil forstå at et mangfold av blandemåter er tilgjengelige. Det er foretrukket at et kraftig skjærehomogeniseringsapparat benyttes.

En fagmann på området vil forstå at en økning av temperaturen av løsningsmidlet vil hjelpe ved oppløsning av lipidblanding. Temperaturen hvorved trinn (1) kan utføres kan strekke seg fra romtemperatur til kokepunktet for det valgte løsningsmiddel. Foretrukket er temperaturen fra omtrent 30 til omtrent 70°C, mer foretrukket rundt 45 til rundt 60°C, og enda mer foretrukket omtrent 50, 51, 52, 53, 54 eller 55°C. Når etylenglykol eller polyetylenglykol 300 benyttes, er det foretrukket at temperaturen er fra omtrent 50 til omtrent 60°C og mer foretrukket omtrent 55°C. Ved å holde løsningen ved en forhøyet temperatur, vil løsningsviskositet reduseres og formuleringsfremstilling forenkles.

En foretrukket fremgangsmåte for å oppløse lipidblanding er som følger: (i) Tilsette propylenglykol til en passende veiebeholder. (ii) Varme opp polypropylenglykolet til omtrent 40 til 80°C ved et varmebad. (iii) Veie lipidblanding inn i en separat beholder. (iv) Når polypropylenglykolet har nådd det ønskede temperaturområdet, overføre løsningen til beholderen som inneholder lipidblanding. (v) Plassere beholderen tilbake i varmebadet til løsningen blir klar. (vi) Blande lipidblanding/en/propylenglykolløsningen mekanisk for videre å sikre fullstendig oppløsning og homogen dispergering av lipidblanding.

Forholdet av lipidblanding til ikke-vandig løsningsmiddel vil selvfølgelig være begrenset av løseligheten til lipidblanding. Dette forholdet vil også være påvirket av den ønske-

de mengden av lipidblanding i den endelige formuleringen. Foretrukket, er forholdet fra omtrent 1 mg av lipidblanding pr. ml løsningsmiddel (mg/ml) til omtrent 100 mg/ml. Mer foretrukket er lipidblandingen tilstede i omtrent 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 eller 15 mg/ml. Enda mer foretrukket er lipidblandingen tilstede i omtrent 10 mg/ml.

5

Trinn (f):

Det andre trinnet involverer å kontakte løsningen fra trinn (e) med en vandig løsning for å danne en lipidsuspensjon. Den vandige løsningen kan være vann, saltoppløsning, en saltoppløsning/glyserinblanding eller en saltoppløsning/glyserin/ikke-vandig løsningsmiddelblanding. Ikke-vandig løsningsmiddel er som definert tidligere, foretrukket propylenglykol. Suspensjon, slik det her benyttes, er ment å indikere en dispersjon hvori uløselige partikler dispergeres i et væskemedium.

Med en gang fullstendig oppløsning av lipidblandingen er oppnådd (trinn (e)), kan den oppløsningen deretter tilføres til en vandig løsning. Den vandige løsningen kan inneholde en eller flere komponenter valgt fra natriumklorid, glyserin, og et ikke-vandig løsningsmiddel. Foretrukket inneholder den vandige løsningen glyserin og natriumklorid. Foretrukket er en tilstrekkelig mengde av propylenglykol tilstede i den vandige løsningen før tilsetning av løsningen fra trinn 1, for å oppnå den endelige ønskede konsentrasjonen av propylenglykol.

Rekkefølgen av tilsetning av ønskede komponenter er ikke forventet å innvirke alvorlig på den oppnådde lipidsuspensjonen. Imidlertid, er det foretrukket at lipidblandingsløsningen tilsettes til vann, som allerede kan inneholde de ovenfor anmerkede ytterligere komponentene. Ytterligere ønskede komponenter kan deretter tilsettes. Det er mer foretrukket at lipidblandingsløsningen tilsettes en løsning av vann og natriumklorid (dvs. saltoppløsning). Det er videre foretrukket at lipidblandingsløsningen tilsettes en løsning av vann, natriumklorid, og glyserin. Det er enda mer foretrukket at lipidblandingsløsningen tilsettes en løsning av vann, natriumklorid, glyserin og propylenglykol.

30

Det er foretrukket av 6,8 mg NaCl er tilstede pr. ml formulering. Foretrukket er 0,1 ml glyserin pr. ml formulering tilstede. En sluttkonsentrasjon på 0,1 ml propylenglykol pr. ml formulering er foretrukket. Den endelige pH for formuleringen er foretrukket omtrent 5,5-7,0. Lipidblandingen er foretrukket tilstede i en mengde på 0,75-1,0 mg/ml i forhold til formulering.

35

Temperaturen av den vandige løsningen kan strekke seg fra romtemperatur til 70°C. Foretrukket er temperaturen omtrent 45 til 60°C, med 50, 51, 52, 53, 54 eller 55 som enda mer foretrukket. For å oppnå fullstendig oppløsning, vil blandingen ha behov for bevegelse, foretrukket røring. pH av løsningen kan også ha behov for å justeres, avhengig av den ønskede sluttformuleringen. Både syre (f.eks. HCl) eller base (f.eks. NaOH) kan tilsettes for å oppnå en slik justering.

Lipidsuspensjonen vil inneholde væskepartikler med varierende størrelser. En av fordelene med den foreliggende oppfinnelsen er evnen til konsekvent å oppnå små partikler med nesten homogen størrelse. Således er det foretrukket at majoriteten av partikler oppnådd er mindre enn 100 nm i diameter, mer foretrukket mindre enn 50 nm.

En foretrukket fremgangsmåte for å oppløse lipidblanding er som følger: (i) Tilsette vann for injeksjon (WFI) i en blandingsformuleringsbeholder. (ii) Å starte blandingen og forsikre at temperaturen er fra 50 til 55°C. (iii) Tilsette natriumklorid til blandingsformuleringsbeholderen. Vente til det faste stoffet fullstendig har blitt oppløst før man fortsetter til det neste trinnet. (iv) Tilsette glyserin til blandingsformuleringsbeholderen. Gi tilstrekkelig tid for fullstendig blanding. (v) Tilsette det gjenværende propylenglykol som ikke er i lipidblanding/propylenglykolløsningen. Gi tid til grundig blanding. (vi) Redusere blandingshastigheten for å redusere turbulens i blandingsformuleringsbeholderen. (vii) Tilsette lipidblanding/propylenglykolløsningen til blandingsformuleringsbeholderen. (viii) Omstille blandingen til opprinnelig hastighet. (ix) Tilsette ytterligere WFI om nødvendig. (x) Fortsette å blande i omtrent 25 minutter og forsikre fullstendig blanding. (xi) Kontrollere og justere løsningen til bestemt pH.

Trinn (g):

Trinn (g) involverer å oppvarme lipidsuspensjonen oppnådd i trinn (f) til en temperatur omtrent lik med eller over den høyeste gel-til-væskekrystallfaseovergangstemperaturen av lipidene tilstede i løsningen.

En av formålene med dette trinnet er å tilveiebringe en filtrerbar suspensjon. En løsning/suspensjon betraktes som filtrerbar dersom det ikke er noen merkbar reduksjon i strømningshastigheten ved normal fremgangsmåte, og det ikke er noen merkbar økning i trykkfallet i filtreringssystemet.

Eksperimentelle data indikerer at lipidene i formuleringen bør være under deres gel-til-væskekrystallfaseovergang for å forenkle steril filtrering. Når lipidene er under fase-

overgangstemperaturen, er suspensjonspartiklene rigide. Imidlertid, når de er over deres respektive gel-væskekrystallfaseovergangstemperaturer, er de på en mer løselig organisert konfigurasjon og således lettere å filtrere.

- 5 DPPC og DPPA viser faseoverganger på hhv. 41°C og 67°C. MPEG5000-DPPE er løselig i vann, og derfor fremviser det ikke en gel-væskekrystallfaseovergang som er karakteristisk for de fleste hydratiserte lipidsuspensjoner. Fordi alle lipidene i den foretrukne formuleringen fremviser forskjellige gel-til-væskefaseoverganger, benyttes den høyeste faseovergangstemperaturen, 67°C, fortrinnsvis for å filtrere løsningen. Ved å opprettholde temperaturen ved eller under 67°C, er alle lipidene under deres respektive faseoverganger, hvilket forsikrer løselig konfigurasjon mens de passerer gjennom filterene.

- Oppvarming kan oppnås ved å omslutte blandingsformuleringsbeholderen med en varmevekslingsvikling. Varmt vann/damp fra en kontrollert kilde, f.eks. et varmtvannsbad, eller en vannvarmer, ville levere tilstrekkelig varme for å opprettholde blandingsformuleringsløsningen ved en gitt temperatur. Andre varmekilder som er kjent for fagmannen på området kan også benyttes.

Trinn (h):

- 20 Trinn (h) utføres ved å filtrere væskesuspensjonen gjennom et steriliseringsfilter. Hensikten bak dette trinnet er å tilveiebringe en stort sett bakteriefri suspensjon. Et filtrat betraktes som stort sett bakteriefritt når sansynligheten for at filtratet inneholder minst en kolonidannende mikroorganisme er mindre enn 10^{-6} .
- 25 Filtrering utføres foretrukket ved å benytte steriliseringsfilterinnsatser. Et middel for å tvinge løsningen gjennom filterene kan også være nødvendig (f.eks. pumping eller trykksetting). Siden løsningen som filtreres trenger å opprettholdes ved en temperatur på eller over den høyeste gel-til-væskekrystallfaseovergangstemperaturen for lipidene tilstede i løsningen, bør filtreringen utføres ved omtrent disse samme temperaturene. For
- 30 å oppnå dette, er filteret (f.eks. steriliseringsfilterinnsatsene) foretrukket innesperret i omsluttete filterhus som varmes kontinuerlig, f.eks. ved en varmtvannsstrøm fra et temperaturkontrollert varmebad, for å forsikre at suspensjonen er over lipidfaseovergangstemperaturene. Temperaturen for steriliseringsfilteret er foretrukket fra 50 til 100°C, mer foretrukket fra 60 til 90°C, og enda mer foretrukket 70, 71, 72, 73, 74, 75,
- 35 76, 77, 78, 79 eller 80°C.

En eller flere steriliseringsfiltere kan benyttes for å filtrere suspensjonen. Det nødvendige antall vil baseres på deres effektivitet for å fjerne bakterier. Det er foretrukket at to filtere benyttes. Størrelsen av filterporene vil være begrenset ved behovet for å fremstille en bakteriefri suspensjon. Foretrukket benyttes 0,2 µm hydrofile filtere.

5

En bulkløsning av den foretrukne formuleringen ble kontinuerlig filtrert gjennom to 0,2 µm hydrofile filtere i opp til 3 timer ved en hastighet på omtrent 1 l pr. minutt (1 l/min.), dvs. å føre en total på 180 l av suspensjonsløsningen gjennom filterene. De eksperimentelle resultatene viser at det er ingen synlig blokkade av filterene. Lipidundersøkelser
10 viser at det ikke er noe målbart tap i løpet av filtreringsfremgangsmåten (p.g.a. akkumulering i filtermediet).

En bulkløsning av den foretrukne formuleringen ble blandet ved 40-80°C, og suspensjonen ble avkjølt til romtemperatur før steril filtrering. Ingen synlig tilstopping av filterene ble observert, hvilket indikerer at suspensjonspartikkelstørrelsesdistribusjonen er
15 godt under 0,2 µm av filterporestørrelsen. Det er ønskelig å benytte varme gjennom filtreringen for å forsikre maksimal utvinning av lipidblandingen i det sterile filtratet (dvs. å minimalisere potensiell bibeholdelse av lipidpartikler i filtermediet).

20 En foretrukket fremgangsmåte for å filtrere lipidsuspensjone er som følger: (a) Forsikre at alle omsluttete filtere er ved 70-80°C. (b) Forsikre at alle ventiler i filtreringsenheten er lukket. (c) Forbinde filtreringsinnløpsslange med utløpet av blandingsformuleringsbeholderen. (d) Åpne ventiler for å la løsning passere gjennom filterene. (e) Spyle tre liter løsning gjennom filterene før filtratet samles opp. (f) Fortsette filtrering til den er
25 fullført.

Trinn (i):

Å overføre den filtrerte løsningen til et medisinglass fullfører trinn (i). Foretrukket utføres dette trinnet i et kontrollert antiseptisk område. En fagmann på området vil forstå at
30 medisinglasset som velges og mengden av suspensjon som fylles i medisinglasset vil avhenge av den anvendelsen som lipidsuspensjonen er tiltenkt å ha. Overføringen kan oppnås gjennom et mangfold av fremgangsmåter, inkludert pipette, håndholdt sprøytebeholder (f.eks. Filamatic®-sprøytefordelingsmaskin), eller industriell autofordelingsmaskin (f.eks. Cozzoli eller TL-autofyllingsmaskin).

35

Trinn (j):

Trinn (j) utføres ved å utveksle gassen øverst i medisinglassene fra trinn (i) med en perfluorkarbongass. En foretrukket fremgangsmåte for utveksling er å laste de tildelte medisinglassene inn i et lyofiliseringskammer og bytte ut den øvre gassen i medisinalglasset med en perfluorkarbongass. En foretrukken gass er perfluorpropan (PFP). Andre fremgangsmåter for å utveksle den øvre gassen som er kjent innenfor fagområdet kan benyttes.

Medisinglassene forsegles ved fullførelse av gassutbyttingssyklusen. Når lyofiliseringskammertrykket er bragt tilbake til atmosfærisk trykk ved ladning i kammeret med PFP. Medisinglasskorker plasseres for å forsegle medisinglassene.

Trinn (k):

Trinn (k) involverer å sluttsterilisere et medisinglass etter trinn (j). En fremgangsmåte for avsluttende sterilisering er gjennom anvendelse av en autoklav. Også de forseglede medisinglassene kan sluttsteriliseres i dampsteriliseringsenhet for ytterligere å forbedre sterilitetssikkerheten av produktet. Det må utvises forsiktighet i steriliseringsprosessen ettersom degradering av lipider kan observeres som et resultat av autoklavering. Foretrukket, steriliseres medisinglasset ved omtrent 126-130°C i 1 til 10 minutter.

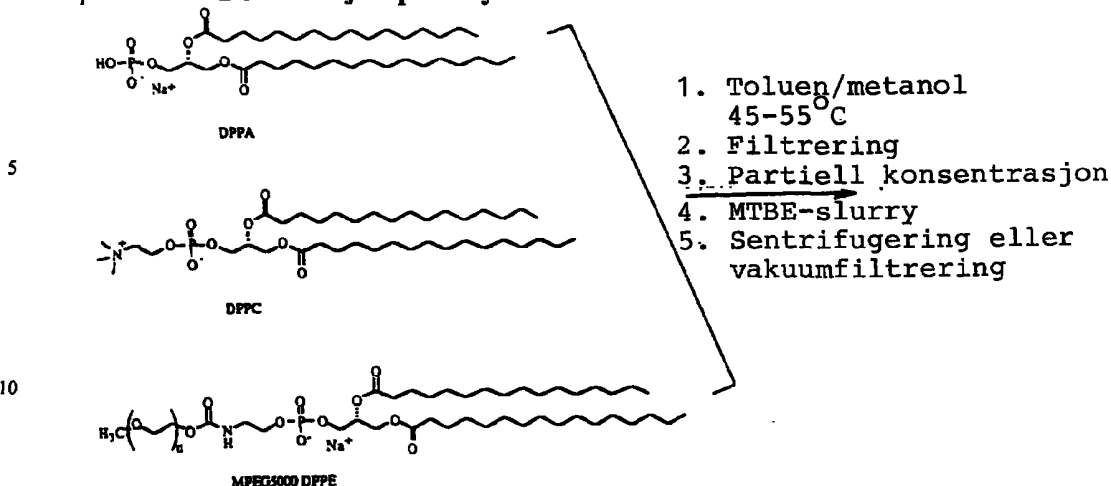
Andre trekk ifølge oppfinnelsen vil åpenbares ved den følgende beskrivelsen av utførelsesformer som skal tjene som eksempler som er gitt for å illustrere oppfinnelsen og er ikke ment å være begrensende for denne.

EKSEMPLER

Tabell 1: Utpekt lipidblandingssammensetning

Lipidnavn	Trivialnavn	vekt-%	Mol-%
DPPA	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glysero-3-fosfatidinsyre, mononatriumsalt	6,0	10
DPPC	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glysero-3-fosfatidylcholin	53,5	82
MPEG5000 DPPE	N-(metoksypolyetylenglykol 5000 karbamoyl)-1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glysero-3-fosfatidyletanolamin, mononatriumsalt	40,5	8

Lipidblandingsproduksjonsprosedyre

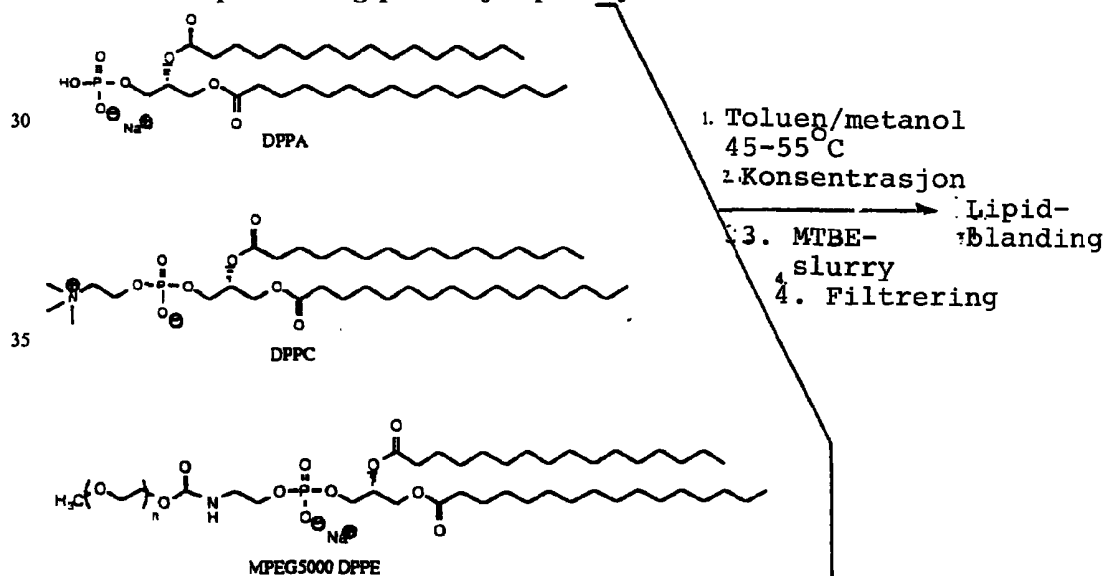


En kolbe fylles med toluen (3,3 l), metanol (1,2 l), DPPA (59,6 g), DPPC (535 g), og MPEG5000 DPPE (405 g). Etter å ha skylt faste kontaktoverflater med 0,9 l metanol, varmes slurrien til 45-55°C til oppløsning er fullstendig.

Løsningen filtreres og konsentreres deretter under vakuum ved 35-45°C til en tykk gel. Metyl t-butyleter (MTBE, 5,4 l) tilsettes og blandingen slemmes opp ved 15-30°C. Hvitt fast stoff samles opp ved sentrifugering eller vakuumfiltrering, og vaskes med MTBE (0,9 l). De faste stoffene plasseres deretter i en vakuumovn og tørkes til en konstant vekt ved 40-50°C. Den tørkede lipidblandingen overføres til en flaske og lagres ved -15 til -25°C.

Ved en annen utførelsesform av lipidblandingsproduksjonsprosedyren ifølge den foreliggende oppfinnelsen, kan også følgende prosedyre benyttes.

Alternativ lipidblandingsproduksjonsprosedyre



Fosfolipidmengder ble regulert for renhet basert på en "benyttet som"-verdi fra sertifikatene av analyse. Batchstørrelsen (forenet fosfolipidvekt) for dette eksperimentet var 2 kg.

- 5 En rotasjonsfordampningskolbe fylles sekvensielt med toluen (3,300 ml), metanol (1,200 ml), DPPA (122,9 g; korrigert for "benyttet som" renhet på 97,0%), DPPC (1098,5 g totalt; 500,8 g fra en mengde med 98,4% "benyttet som" renhet og 5597,7 g fra en mengde med 96,7% "benyttet som" renhet), og MPEG5000 DPPE (815,7 g, korrigert for "benyttet som" renhet på 99,3%). Etter å ha skylt gjenværende fast stoff i kol-
- 10 ben med metanol (900 ml), plasseres kolben på en rotasjonsfordamper (ikke vakuum) og slurryen varmes til mellom 45 og 55°C (eksternt). Etter av oppløsningen er fullstendig, senkes den eksterne temperaturen til mellom 35 og 45°C, og vakuum påføres, og løsningen konsentreres til et hvitt halvfast stoff. Kolben fjernes fra fordamperen og fast stoff løsnes med en spatel. Kolben settes igjen på fordamperen og konsentreringen fort-
- 15 setter. Etter at endepunktet er nådd (sluttvakuumtrykk ² 20 mbar; hvitt, granulært, tykt fast stoff), tilsettes MTBE (5 400 ml) gjennom rotasjonsfordamperens tilsetningsrør, vakuumet avbrytes og blandingen slemmes opp i 15 til 45 minutter ved 15 til 30°C. Fast stoff isoleres ved enten sentrifugal eller vakuumfiltrering, skylles med MTBE (3 800 ml), og tørkes til konstant vekt i en vakuumovn (40 til 50°C). Før overføringen til poly-
- 20 etylenflasker med polypropylenhetter, oppdeles fast stoff gjennom en skjerm (0,079 tommer masker), hvilket gir 1 966,7 g (98%) av lipidblanding (SG896) som et hvitt fast stoff.

Den foretrukne lipidsuspensjonen inneholder:

- 25 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glysero-3-fosfotidin, mononatriumsalt (DPPA);
1,2-dipalmitoyl-*sn*-glysero-3-fosfatidylcholin (DPPC);
N-(metoksypolyetylglykol 5000 karbamoyl)-1,2-dipalmitoyl-*sn*-glysero-3-fosfatidyletanolamin, mononatriumsalt (MPEG5000-DPPE);
Propylenglykol, USP;
- 30 Glyserin, USP;
Natriumklorid, USP; og
Vann for injeksjon, USP.

Tabell 2: Foretrukne kontrastmiddelformuleringer

Komponent	A*	B*
NaCl, USP	6,8 mg/ml	6,8 mg/ml
Glyserin, USP	0,1 ml/ml	0,1 ml/ml
Propylenglykol, USP	0,1 ml/ml	0,1 ml/ml
Lipidblanding**	1 mg/ml	0,75 mg/ml
Perfluorpropan	> 65%	> 65%
pH	6,0-7,0	6,0-7,0

* Formulering A har 1 mg/ml lipidblanding. Formulering B har en lipidblandingkon-
sentrasjon på 0,75 mg/ml.

** Lipidblandingen består av 53,5 vekt-% DPPC, 6,0 vekt-% DPPA og 40,5 vekt-%
MPEG5000-DPPE.

Tabell 3: Foretrukken beholder og lukking

Komponent	Type
Medisinglass	Wheaton 2801, B33BA, 2cc, 13 mm, type I, flintrørmedi- singlass
Propp	West V50 4416/50, 13 mm, grå butyllø, silikoniserte propper
Forsegling	West 3766, hvit 13 mm, avvippingsaluminiumsforseglinger

Det ferdige produktets fyllevolum kan være fra 1,0 til 2,0 ml/medisinglass.

Ved fremstillingen av den foretrukne formuleringen, når lipidblandingen hydratiseres
direkte med den vandige matriksløsningen omfattende vann for injeksjon, natriumklo-
rid, glyserin og propylenglykol, har filtratene mindre lipider sammenlignet med bulk-
løsningen før filtrering. Tapet av lipider varierer fra 12% til 48%. Disse resultatene viser
at den sterile filtreringsfremgangsmåten ikke kontrolleres effektivt, og derfor er slutt-
produktlipidinnholdet svært variabelt.

Derimot, ved å anvende foreliggende beskrevne fremgangsmåte, viser forsøksresultater
av lipidene fullstendig gjenvinning av lipider gjennom filtreringsfremgangsmåten. Vari-
abiliteten av forsøksresultater rundt de teoretiske målene er innenfor normal forsøksme-
todevariabilitet. Partikkelstørrelsesdistribusjon basert på antall, basert på volum og ba-
sert på reflektiv intensitet av en suspensjon fremstilt ved først å oppløse lipidblandingen

i propylenglykol indikerer at majoriteten av partiklene er mindre enn 50 nm i bulk-løsningen før filtrering ved 55°C så vel som ved 70°C. Partikkeldistribusjonsprofilen forandres ikke etter filtrering.

5 UTNYTTELSEDEL

Foreliggende fremgangsmåte er nyttig for å fremstille ultralydkontrastmidler. Slike midler bør være nyttige for et mangfold av avbildningsapplikasjoner, inkludert å forbedre kontrasten i ekkokardiografiske og radiologiske ultralydsavbildninger.

10

Mangfoldige modifikasjoner og variasjoner av den foreliggende oppfinnelsen er åpenbart mulige i lys av informasjonen over. Det skal derfor forstås at innenfor omfanget av de vedlagte patentkravene, kan oppfinnelsen utføres annerledes enn hva som spesifikt er beskrevet her.

15

P a t e n t k r a v

1.

Fremgangsmåte for å fremstille en fosfolipidsuspensjon, k a r a k t e r i -
5 s e r t v e d at den omfatter:

- (a) å kontakte minst to lipider med et første ikke-vandig løsningsmiddel for å danne en løsning;
- (b) å konsentrere løsningen til en tykk gel;
- (c) å kontakte den tykke gelen med et andre ikke-vandig løsningsmiddel for å danne
10 en løsning;
- (d) å konsentrere denne løsningen fra trinn (c) for å danne en lipidblanding;
- (e) å kontakte lipidblandingen med et ikke-vandig løsningsmiddel, der lipidblan-
dingen stort sett oppløses i det ikke-vandige løsningsmidlet for å danne en
løning; og
- 15 (f) uten å fjerne det ikke-vandige løsningsmidlet, å kontakte løsningen fra trinn (e)
med en vandig løsning for å danne en lipid suspensjon.

2.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det
20 ikke-vandige løsningsmidlet fra trinn (e) er valgt fra propylenglykol, etylenglykol, og
polyetylenglykol 300.

3.

Fremgangsmåte ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at
25 lipidblandingen omfatter:

- (a) 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glysero-3-fosfatidylcholin;
- (b) 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glysero-3-fosfotidin, mononatriumsalt; og
- (c) N-(metoksypolyetylenglykol 5000 karbamoyl)-1,2-dipalmitoyl-*sn*-glysero-3-
fosfatidyletanolamin, mononatriumsalt.

30

4.

Fremgangsmåte ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at det
ikke-vandige løsningsmidlet fra trinn (e) oppvarmes til en temperatur på omtrent 30 til
70°C før det kontaktes med lipidblandingen.

35

5.

Fremgangsmåte ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at forholdet av lipidblanding til ikke-vandig løsningsmiddel fra trinn (e) er fra omtrent 5 mg av lipidblanding pr. ml av ikke-vandig løsningsmiddel til 15 mg/ml.

5

6.

Fremgangsmåte ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at den vandige løsningen i trinn (f) er valgt fra vann, saltoppløsning, en saltoppløsning/glyserinblanding, og en saltoppløsning/glyserin/ikke-vandig løsningsmiddelblanding.

10

7.

Fremgangsmåte ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at den vandige løsningen er en saltoppløsning, glyserin, og propylenglykolblanding.

15

8.

Fremgangsmåte ifølge krav 7, k a r a k t e r i s e r t v e d at 6,8 mg/ml av natriumklorid er tilstede, 0,1 ml/ml glyserin er tilstede, 0,1 ml/ml propylen-glykol er tilstede, og 0,75 til 1,0 mg/ml av lipidblandingen er tilstede.

20

9.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at fremgangsmåten videre omfatter:

(g) å varme opp lipidsuspensjonen fra trinn (f) til en temperatur lik med eller over den høyeste gel-til-væskekrystallfaseovergangstemperatur av lipidene tilstede i suspensjonen.

25

10.

Fremgangsmåte ifølge krav 9, k a r a k t e r i s e r t v e d at lipidsuspensjonen i trinn (g) varmes opp til en temperatur på minst omtrent 67°C.

30

11.

Fremgangsmåte ifølge krav 9, k a r a k t e r i s e r t v e d at fremgangsmåten videre omfatter:

(h) å filtrere lipidsuspensjonen gjennom et steriliseringsfilter.

35

12.

Fremgangsmåte ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at fremgangsmåten videre omfatter:

(i) å fordele den filtrerte løsningen fra trinn (h) til et medisinglass.

5

13.

Fremgangsmåte ifølge krav 12, k a r a k t e r i s e r t v e d at fremgangsmåten videre omfatter:

(j) å utveksle gassen øverst i medisinglasset fra trinn (i) med en perfluorkarbongass.

10

14.

Fremgangsmåte ifølge krav 13, k a r a k t e r i s e r t v e d at perfluorkarbongassen er perfluorpropan.

15 15.

Fremgangsmåte ifølge krav 14, k a r a k t e r i s e r t v e d at utvekslingen av den øvre gassen utføres ved å benytte et lyofiliseringskammer.

16.

20 Fremgangsmåte ifølge krav 13, k a r a k t e r i s e r t v e d at fremgangsmåten videre omfatter:

(k) å sterilisere medisinglasset fra trinn (j).

17.

25 Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det første ikke-vandige løsningsmidlet i trinn (a) er en blanding av metanol og toluen.

18.

30 Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det andre ikke-vandige løsningsmidlet i trinn (c) er en metyl t-butyleter.