



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107206111 B

(45) 授权公告日 2021.04.27

(21) 申请号 201580071822.1

大卫·C·昂夏克 绒·雪·阮

(22) 申请日 2015.12.28

(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限公司 11287

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 107206111 A

代理人 王田

(43) 申请公布日 2017.09.26

(51) Int.Cl.

(30) 优先权数据

A61K 49/22 (2006.01)

62/098,453 2014.12.31 US

(56) 对比文件

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2017.06.29

US 2008009561 A1, 2008.01.10

US 2008009561 A1, 2008.01.10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/067615 2015.12.28

CN 1216925 A, 1999.05.19

CN 101229382 A, 2008.07.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02016/109400 EN 2016.07.07

CN 1216925 A, 1999.05.19

US 2003044354 A1, 2003.03.06

US 2007071685 A1, 2007.03.29

(73) 专利权人 蓝瑟斯医学影像公司

地址 美国马萨诸塞州

US 2013123781 A1, 2013.05.16

US 6572840 B1, 2003.06.03

US 2012027688 A1, 2012.02.02

(72) 发明人 西蒙·P·鲁滨逊

罗伯特·W·西格勒

审查员 张景雅

权利要求书4页 说明书38页 附图3页

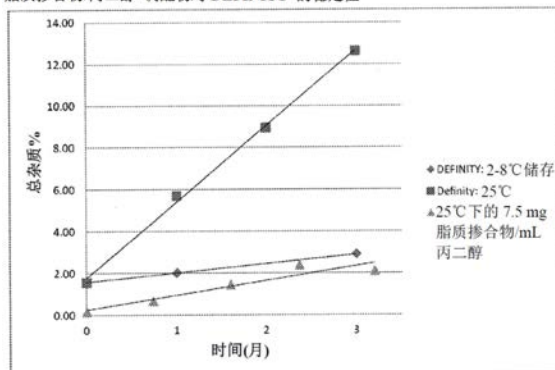
(54) 发明名称

脂质封装的气体微球组合物及相关方法

(57) 摘要

本发明尤其提供用于生成脂质封装的气体微球的经改进脂质调配物及其使用方法。

脂质掺合物/丙二醇\*调配物对 DEFINITY® 的稳定性



\*177 mg 含有脂质掺合物的丙二醇(0.72 wt%脂质掺合物; 脂质掺合物:丙二醇的比率为 1:138)。

1. 一种组合物,其包含  
非水性混合物,其包含丙二醇中的DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE,所述非水性混合物与全氟碳气体接触,  
其中所述非水性混合物具有等于或小于5%重量/重量(w/w)水。
2. 根据权利要求1所述的组合物,其中组合的DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE对丙二醇的比率在1:100到1:600的范围内。
3. 一种组合物,其包含  
非水性混合物,其包含丙二醇和甘油中的DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE,所述非水性混合物与全氟碳气体接触,  
其中所述非水性混合物具有等于或小于5%重量/重量(w/w)水。
4. 根据权利要求3所述的组合物,其中DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE对丙二醇对甘油的比率在1:100:100到1:600:700的范围内。
5. 一种组合物,其包含  
非水性混合物,其包含甘油中的DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE,所述非水性混合物与全氟碳气体接触,  
其中所述非水性混合物具有等于或小于5%重量/重量(w/w)水。
6. 根据权利要求5所述的组合物,其中组合的DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE对甘油的比率为1:100到1:700。
7. 根据权利要求1到6中任一权利要求所述的组合物,其中所述非水性混合物包含少于5%w/w(重量/重量)水。
8. 根据权利要求1到6中任一权利要求所述的组合物,其中所述非水性混合物包含1-4%w/w水。
9. 根据权利要求1到6中任一权利要求所述的组合物,其中所述非水性混合物包含少于1%w/w水。
10. 根据权利要求1到6中任一权利要求所述的组合物,其中所述组合物包含为脂质反荷离子的离子。
11. 根据权利要求1到6中任一权利要求所述的组合物,其中所述组合物不含氯化钠。
12. 根据权利要求1到6中任一权利要求所述的组合物,其中所述组合物不含氯离子。
13. 根据权利要求1到6中任一权利要求所述的组合物,其中所述组合物进一步包含缓冲剂。
14. 根据权利要求1到6中任一权利要求所述的组合物,其中所述组合物进一步包含非磷酸盐缓冲剂。
15. 根据权利要求1到6中任一权利要求所述的组合物,其中组合的DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE是以0.9mg/ml到7.5mg/ml非水性混合物的浓度存在。
16. 根据权利要求1到6中任一权利要求所述的组合物,其中DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE是以10摩尔%:82摩尔%:8摩尔%的比率存在。
17. 根据权利要求1到6中任一权利要求所述的组合物,其中所述组合物当在室温下存储3个月时包含少于5%杂质。
18. 根据权利要求1到6中任一权利要求所述的组合物,其中当所述组合物与

DEFINITY<sup>®</sup>二者存储于室温下时,所述组合物包含的杂质少于DEFINITY<sup>®</sup>。

19. 根据权利要求1到6中任一权利要求所述的组合物,其中所述全氟碳气体是全氟丙烷气体。

20. 根据权利要求1到6中任一权利要求所述的组合物,其中PEG5000-DPPE是MPEG5000-DPPE。

21. 根据权利要求1到6中任一权利要求所述的组合物,其中DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE是以10:82:8的摩尔%比率存在。

22. 根据权利要求1到6中任一权利要求所述的组合物,其中所述组合物是在小瓶中提供。

23. 根据权利要求22所述的组合物,其中所述组合物是在实际体积小于或等于3.8ml的小瓶中提供。

24. 根据权利要求22所述的组合物,其中所述组合物是在具有V形底的小瓶中提供。

25. 根据权利要求22所述的组合物,其中所述组合物是在具有平底的小瓶中提供。

26. 根据权利要求22所述的组合物,其中所述组合物是在具有圆底的小瓶中提供。

27. 根据权利要求22所述的组合物,其中所述小瓶是玻璃小瓶。

28. 根据权利要求1到6中任一权利要求所述的组合物,其中所述组合物是在单一室容器中提供。

29. 根据权利要求1到6中任一权利要求所述的组合物,其中所述组合物是在多室容器中提供。

30. 根据权利要求1到6中任一权利要求所述的组合物,其中所述组合物在容器的第一室中,且丙二醇、甘油或丙二醇和甘油在所述容器的第二室中。

31. 根据权利要求1到6中任一权利要求所述的组合物,其中所述组合物在容器的第一室中,且水性稀释剂在所述容器的第二室中。

32. 根据权利要求31所述的组合物,其中水性稀释剂是水性盐水溶液。

33. 根据权利要求31所述的组合物,其中水性稀释剂是水性缓冲盐水溶液。

34. 根据权利要求1到6中任一权利要求所述的组合物,其是在2mL惠顿小瓶中。

35. 根据权利要求34所述的组合物,其中所述非水性混合物具有3.75mg脂质/mL丙二醇和甘油的脂质浓度。

36. 根据权利要求1到6中任一权利要求所述的组合物,其中所述组合物用于形成用于采用超声的诊断成像和/或治疗的试剂。

37. 一种组合物,其包含

包含DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE和全氟碳气体的脂质封装的气体微球,其是在包含丙二醇和甘油的非水性溶液中,

其中所述非水性溶液具有等于或少于5%重量/重量(w/w)水。

38. 根据权利要求37所述的组合物,其中所述脂质封装的气体微球具有在1.0微米到2.0微米范围内的平均直径。

39. 根据权利要求37所述的组合物,其中所述脂质封装的气体微球具有在1.2微米到2.0微米范围内的平均直径。

40. 根据权利要求37所述的组合物,其中所述脂质封装的气体微球具有1.4微米到1.8

微米的平均直径。

41. 根据权利要求37到40中任一权利要求所述的组合物,其中所述脂质封装的气体微球以大于 $10^8$ /mL的浓度存在于所述组合物中。

42. 根据权利要求37到40中任一权利要求所述的组合物,其中所述组合物包含少于5% w/w水。

43. 根据权利要求37到40中任一权利要求所述的组合物,其中所述组合物包含1-4% w/w水。

44. 根据权利要求37到40中任一权利要求所述的组合物,其中所述组合物包含少于1% w/w水。

45. 根据权利要求37到40中任一权利要求所述的组合物,其中所述组合物包含为脂质反荷离子的离子。

46. 根据权利要求37到40中任一权利要求所述的组合物,其中所述组合物不含氯化钠。

47. 根据权利要求37到40中任一权利要求所述的组合物,其中所述组合物不含氯离子。

48. 根据权利要求37到40中任一权利要求所述的组合物,其中所述组合物进一步包含缓冲剂。

49. 根据权利要求37到40中任一权利要求所述的组合物,其中所述组合物进一步包含乙酸盐缓冲剂、苯甲酸盐缓冲剂或水杨酸盐缓冲剂。

50. 根据权利要求37到40中任一权利要求所述的组合物,其中组合的DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE是以0.9mg到4mg脂质/ml非水性溶液的浓度存在。

51. 根据权利要求37到40中任一权利要求所述的组合物,其中DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE是以10摩尔%:82摩尔%:8摩尔%的比率存在。

52. 根据权利要求37到40中任一权利要求所述的组合物,其中所述脂质封装的气体微球包含全氟碳气体。

53. 根据权利要求37到40中任一权利要求所述的组合物,其中所述脂质封装的气体微球包含全氟丙烷气体。

54. 根据权利要求37到40中任一权利要求所述的组合物,其中PEG5000-DPPE是MPEG5000-DPPE。

55. 根据权利要求37到40中任一权利要求所述的组合物,其是在小瓶中。

56. 根据权利要求37到40中任一权利要求所述的组合物,其是在实际体积小于或等于3.8ml的小瓶中。

57. 根据权利要求37到40中任一权利要求所述的组合物,其是在具有V形底的小瓶中。

58. 根据权利要求37到40中任一权利要求所述的组合物,其是在具有平底的小瓶中。

59. 根据权利要求37到40中任一权利要求所述的组合物,其是在具有圆底的小瓶中。

60. 根据权利要求55所述的组合物,其中所述小瓶是玻璃小瓶。

61. 根据权利要求37到40中任一权利要求所述的组合物,其是在单一室容器中。

62. 根据权利要求37到40中任一权利要求所述的组合物,其是在多室容器中。

63. 一种试剂盒,其包含

于容器中的根据权利要求1到6中任一权利要求所述的组合物。

64. 根据权利要求63所述的试剂盒,其中所述容器是单一室容器或多室容器。

65. 根据权利要求63或64所述的试剂盒,其进一步包含第二容器。
66. 根据权利要求65所述的试剂盒,其中所述第二容器包含水性稀释剂。
67. 根据权利要求65所述的试剂盒,其中所述第二容器是预填充注射器。
68. 根据权利要求65所述的试剂盒,其中所述第二容器包含丙二醇。
69. 根据权利要求65所述的试剂盒,其中所述第二容器包含甘油。
70. 根据权利要求65所述的试剂盒,其进一步包含含有水性稀释剂的第三容器。
71. 根据权利要求64所述的试剂盒,其中所述多室容器包含含有根据权利要求1所述的组合物的第一室,及含有甘油和/或水性稀释剂的第二室。
72. 根据权利要求64所述的试剂盒,其中所述多室容器包含含有根据权利要求3所述的组合物的第一室,及含有水性稀释剂的第二室。
73. 根据权利要求64所述的试剂盒,其中所述多室容器包含含有根据权利要求5所述的组合物的第一室,及含有丙二醇和/或水性稀释剂的第二室。
74. 根据权利要求63所述的试剂盒,其进一步包含活化装置。
75. 一种形成用于采用超声的诊断成像和/或治疗的试剂的方法,其包含将甘油和/或水性稀释剂添加至根据权利要求1所述的组合物,及然后活化所述组合物以形成脂质封装的气体微球。
76. 一种形成超声对比剂的方法,其包含活化根据权利要求3所述的组合物以形成脂质封装的气体微球。
77. 一种形成用于采用超声的诊断成像和/或治疗的试剂的方法,其包含将水性稀释剂添加至根据权利要求3所述的组合物,及然后活化所述组合物以形成脂质封装的气体微球。
78. 一种形成用于采用超声的诊断成像和/或治疗的试剂的方法,其包含将丙二醇和/或水性稀释剂添加至根据权利要求5所述的组合物,及然后活化所述组合物以形成脂质封装的气体微球。
79. 根据权利要求75到78中任一权利要求所述的方法,其中将所述组合物活化20-45秒。
80. 根据权利要求75到78中任一权利要求所述的方法,其中将所述组合物活化60-120秒。
81. 根据权利要求75到78中任一权利要求所述的方法,其进一步包含在额外水性稀释剂中稀释所述脂质封装的气体微球。
82. 根据权利要求75到78中任一权利要求所述的方法,其中所述组合物是在小瓶中。
83. 根据权利要求75到78中任一权利要求所述的方法,其中所述组合物是在注射器中。
84. 根据权利要求75到78中任一权利要求所述的方法,其中所述组合物是在单一室容器中。
85. 根据权利要求75到78中任一权利要求所述的方法,其中所述组合物是在多室容器中。
86. 一种根据权利要求1到6中任一权利要求所述的组合物在制备药物中的用途,所述药物用于在有需要的个体中采用超声诊断成像和/或治疗。
87. 根据权利要求74所述的试剂盒,其中活化装置是VIALMIX®装置。

## 脂质封装的气体微球组合物及相关方法

[0001] 相关申请案

[0002] 本申请案根据35U.S.C.§119(e)主张2014年12月31日提出申请的美国临时申请案第62/098,453号的权益,所述临时申请案以全文引用方式并入本文中。

### 发明内容

[0003] 本发明部分地提供用于制造超声对比剂的新颖且经改进调配物以及超声对比剂制剂自身。所述调配物的组成、制造方法和其使用方法比用于制造超声对比剂的先前技术调配物更简单,且令人惊讶地更稳健,包括在室温下在延长时间段中更稳定。所述调配物可令人惊讶地在无复杂操作的情况下用于制造超声对比剂。

[0004] 本文提供这些新颖调配物、包含这些新颖调配物的试剂盒、使用这些调配物的方法(包括使用这些调配物制造超声对比剂的方法)和脂质封装的气体微球自身的组合物或制剂。这些新颖调配物包括本文更详细阐述的非水性混合物。

[0005] 在一个方面中,本文提供由DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE于丙二醇和甘油和缓冲剂中的非水性混合物组成或基本上由其组成的组合物。

[0006] 在另一方面中,本文提供由DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE于丙二醇和缓冲剂中的非水性混合物组成或基本上由其组成的组合物。

[0007] 在另一方面中,本文提供由DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE于甘油和缓冲剂中的非水性混合物组成或基本上由其组成的组合物。

[0008] 缓冲剂可为(但不限于)乙酸盐缓冲剂(例如,乙酸钠与乙酸的组合)、或苯甲酸盐缓冲剂(例如,苯甲酸钠与苯甲酸的组合)、或水杨酸盐缓冲剂(例如,水杨酸钠与水杨酸的组合)。

[0009] 前述组合物可于无菌容器中提供,任选地含有全氟碳气体,且进一步任选地具有使用说明,包括在全氟碳气体存在下和任选地在水性稀释剂存在下活化所述组合物以生成脂质封装的气体微球的说明。待活化的组合物可包含水性稀释剂作为第二相且因此在活化前可为非均匀。

[0010] 在另一方面中,本文提供包含DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE于丙二醇和甘油中的非水性混合物和全氟碳气体的组合物。

[0011] 在一些实施例中,DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE(组合)对丙二醇对甘油的重量对重量对重量(w/w/w)比率在约1:50:50到约1:1000:1000或约1:100:100到约1:600:700的范围内。在一些实施例中,DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE(组合)对丙二醇对甘油的w/w/w比率为约1:120:120到约1:400:400、或约1:120:120到约1:300:300或约1:120:120到约1:250:250。在一些实施例中,DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE(组合)对丙二醇对甘油的w/w/w比率为约1:100:150到约1:150:200。在一些实施例中,DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE(组合)对丙二醇对甘油的w/w/w比率为约1:250:300到约1:300:350。在一些实施例中,DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE(组合)对丙二醇对甘油的w/w/w比率为约1:500:600到约1:600:700。在一些实施例中,DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE(组合)对丙二醇对甘油的w/w/w比率为约1:138:168或约1:276:

336或约1:552:673。

[0012] 在一些实施例中,DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE(组合)对丙二醇对甘油的w/w/w比率为约0.75mg:103.5mg:126.2mg。在一些实施例中,DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE(组合)对丙二醇对甘油的w/w/w比率为约0.375mg:103.5mg:126.2mg。在一些实施例中,DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE(组合)对丙二醇对甘油的w/w/w比率为约0.1875mg:103.5mg:126.2mg。

[0013] 在另一方面中,本文提供包含DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE于丙二醇中的非水性混合物和全氟碳气体的组合物。

[0014] 在一些实施例中,DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE(组合)对丙二醇的w/w比率在约1:10到约1:2000、或约1:10到约1:1500、或约1:10到约1:1000、或约1:20到约1:2000、或约1:50到约1:1000、或约1:50到约1:600或约1:100到约1:600的范围内。

[0015] 在一些实施例中,DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE(组合)对丙二醇的w/w比率为约1:100到约1:200或约1:100到约1:150。在一些实施例中,DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE(组合)对丙二醇的w/w比率为约1:200到约1:350或约1:250到约1:300。在一些实施例中,DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE(组合)对丙二醇的w/w比率为约1:500到约1:600或约1:525到约1:575。在一些实施例中,DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE(组合)对丙二醇的w/w比率为约1:138或约1:276或约1:552。

[0016] 在一些实施例中,DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE(组合)对丙二醇的w/w比率为约0.75mg:103.5mg或约0.375mg:103.5mg或约0.1875mg:103.5mg。

[0017] 在另一方面中,本文提供包含DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE于甘油中的非水性混合物和全氟碳气体的组合物。

[0018] 在一些实施例中,DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE(组合)对甘油的w/w比率在约1:10到约1:2000、或约1:15到约1:1500、或约1:50到约1:1000、或约1:50到约1:7000或约1:100到约1:700的范围内。在一些实施例中,DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE(组合)对甘油的w/w比率为约1:100到约1:200或约1:125到约1:175。在一些实施例中,DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE(组合)对甘油的w/w比率为约1:250到约1:400或约1:300到约1:350。在一些实施例中,DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE(组合)对甘油的w/w比率为约1:550到约1:700或约1:650到约1:700。在一些实施例中,DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE(组合)对甘油的w/w比率为约1:168或约1:336或约1:673。

[0019] 在一些实施例中,DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE(组合)对甘油的w/w比率为约0.75mg:126.2mg、或约0.375mg:126.2mg或约0.1875mg:126.2mg。

[0020] 在其它方面中,本文提供包含前述组合物中的任一者的容器。

[0021] 在一些实施例中,容器是单一室容器。

[0022] 在一些实施例中,所述容器包含第一室和第二室,且其中非水性混合物在所述第一室中且全氟碳气体在所述第二室中。

[0023] 在其它方面中,本文提供包含第一室中之前述组合物中的任一者和第二室中的水性稀释剂的容器。

[0024] 在其它方面中,本文提供包含前述组合物中的任一者及水性稀释剂的容器,其中非水性混合物是在第一室中提供,全氟碳气体是在第二室中提供,且水性稀释剂是在第三室中提供。

[0025] 在一些实施例中,水性稀释剂是水性盐水溶液。在一些实施例中,水性稀释剂是水性缓冲溶液。在一些实施例中,水性稀释剂是水性缓冲盐水溶液。

[0026] 在另一方面中,本文提供包含呈固体形式的DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE的混合物和全氟碳气体的组合物。呈固体形式的DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE的混合物可为掺和固体形式(例如,相对均匀脂质混合物),或其可为每一脂质的固体形式的组合(例如,其可为或可不为均匀脂质混合物)。在另一方面中,本文提供包含前述固体形式组合物的容器。在一些实施例中,容器是具有单一室的容器。在一些实施例中,容器是具有两个室的容器,其中第一室包含呈固体形式的DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE,且第二室包含全氟碳气体。在一些实施例中,容器是具有两个室的容器,其中第一室包含呈固体形式的DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE和全氟碳气体,且第二室包含(a)丙二醇、(b)丙二醇和甘油或(c)甘油。经组合脂质对丙二醇和/或对甘油的w/w/w比率可如上文所陈述。在一些实施例中,容器是具有三个室的容器,其中第一室包含呈固体形式的DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE,第二室包含全氟碳气体,且第三室包含(a)丙二醇、(b)丙二醇和甘油或(c)甘油。在一些实施例中,容器是具有包含水性稀释剂的额外室的容器。

[0027] 在另一方面中,本文提供包含脂质封装的气体微球的组合物,所述微球包含DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE和全氟碳气体且在包含丙二醇和甘油的非水性溶液中。

[0028] 在另一方面中,本文提供包含脂质封装的气体微球的组合物,所述微球包含DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE且在包含丙二醇的非水性溶液中。

[0029] 在另一方面中,本文提供包含脂质封装的气体微球的组合物,所述微球包含DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE和全氟碳气体且在包含甘油的非水性溶液中。

[0030] 在一些实施例中,脂质封装的气体微球具有在约1.0微米到约2.0微米范围内的平均直径。在一些实施例中,脂质封装的气体微球具有在约1.2微米到约2.0微米范围内的平均直径。在一些实施例中,脂质封装的气体微球具有约1.4微米到1.8微米的平均直径。

[0031] 在一些实施例中,脂质封装的气体微球以大于 $10^8$ /mL的浓度存在于组合物中。

[0032] 各个实施例同样适用于前述组合物且现将加以列举。

[0033] 在一些实施例中,非水性混合物包含少于5重量%水(即,水重量对脂质和丙二醇和/或甘油的组合的重量)。在一些实施例中,非水性混合物包含1-4重量%水。在一些实施例中,非水性混合物包含少于1重量%水。

[0034] 在一些实施例中,组合物不含盐,意味着其可包含针对组合物中的脂质的反荷离子但不含其它离子。脂质反荷离子通常是阳离子,例如钠。因此,在一些实施例中,组合物不包含阴离子。在一些实施例中,组合物不含氯化钠。在一些实施例中,组合物不含氯离子。

[0035] 在一些实施例中,组合物进一步包含缓冲剂。在一些实施例中,组合物进一步包含非磷酸盐缓冲剂。在一些实施例中,组合物进一步包含乙酸盐缓冲剂、或苯甲酸盐缓冲剂或水杨酸盐缓冲剂。

[0036] 在一些实施例中,组合的DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE是以约0.9mg到约8mg脂质/ml非水性混合物、约0.9mg到约7.5mg脂质/ml非水性混合物、约2mg到约7.5mg脂质/ml非水性混合物或约2mg到约4mg脂质/ml非水性混合物的浓度存在。在一些实施例中,组合的DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE是以约0.94mg到约7.5mg脂质/ml非水性混合物、或约1.875mg到约7.5mg脂质/ml非水性混合物的浓度存在,包括约1.875mg到约3.75mg脂质/ml非水性混合物

和约3.75到约7.5mg脂质/ml非水性混合物。在一些实施例中,DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE是以约10:82:8(摩尔%)的比率存在。

[0037] 在一些实施例中,当在室温下存储约3个月时,单独或与全氟碳气体组合的非水性混合物包含少于5%杂质。在一些实施例中,当非水性混合物单独或与全氟碳气体组合存储于室温下时(即,当组合物与DEFINITY<sup>®</sup>存储于室温下时),所述非水性混合物包含的杂质少于DEFINITY<sup>®</sup>。

[0038] 在一些实施例中,全氟碳气体是全氟丙烷气体。

[0039] 在一些实施例中,PEG5000-DPPE是MPEG5000-DPPE。

[0040] 在一些实施例中,组合物是在小瓶中提供。在一些实施例中,组合物是在实际体积小于或等于约3.8ml的小瓶中提供。

[0041] 在一些实施例中,组合物是在具有V形底的小瓶中提供。在一些实施例中,组合物是在具有平底的小瓶中提供。在一些实施例中,组合物是在具有圆底的小瓶中提供。在一些实施例中,小瓶是玻璃小瓶。在一些实施例中,包含DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE组合于丙二醇和甘油中的非水性混合物和全氟碳气体的组合物是在2ml尼普洛(Nipro)(惠顿(Wheaton))小瓶中以约3.75mg/ml的脂质浓度提供。在一些实施例中,包含DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE组合于丙二醇和甘油中的非水性混合物和全氟碳气体的组合物是在2ml肖特(Schott)小瓶中以约3.75mg/ml的脂质浓度提供。

[0042] 在一些实施例中,组合物是在单一室容器中提供。在一些实施例中,组合物是在多室容器中提供。在一些实施例中,组合物是在第一室中提供且水性稀释剂是在第二室中提供。水性稀释剂可为盐水溶液或其可不含盐水。水性稀释剂可为缓冲溶液或其可不含缓冲剂。水性稀释剂可为缓冲盐水溶液。

[0043] 在另一方面中,本文提供于容器中包含前述组合物中的任一者的试剂盒。在一些实施例中,容器是单一室容器。

[0044] 在一些实施例中,试剂盒包含第二容器。在一些实施例中,第二容器包含水性稀释剂。在一些实施例中,第二容器是预填充注射器。

[0045] 在一些实施例中,容器是多室容器。在一些实施例中,第一容器包含呈固体形式的脂质(即,DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE),且第二容器包含丙二醇或甘油或丙二醇和甘油。第三容器可包含水性稀释剂。

[0046] 在一些实施例中,第一容器包含丙二醇中的脂质,且第二容器包含甘油或水性稀释剂。或者,第二容器包含甘油且第三容器包含水性稀释剂。

[0047] 在一些实施例中,第一容器包含甘油中的脂质,且第二容器包含丙二醇或水性稀释剂。或者,第二容器包含丙二醇且第三容器包含水性稀释剂。

[0048] 在一些实施例中,第一容器包含丙二醇和甘油中的脂质,且第二容器包含水性稀释剂。

[0049] 在一些实施例中,试剂盒进一步包含活化装置,例如(但不限于)VIALMIX<sup>®</sup>装置。

[0050] 根据本发明还发现,某些非水性混合物(即,某些这些经改质脂质调配物)可用于作为非水性混合物或在简单添加水性稀释剂后通过本文中称作“活化”的过程生成脂质封装的气体微球,不管组合溶液的均匀度如何。此是令人惊讶的,因为某些市售对比剂是通过活化在过量水溶液中包含脂质的预调配单相混合物来制造。在本发明之前认为,在不在水

溶液中预调配脂质或不存在水溶液的情况下,无法生成适宜大小和数目的脂质封装的微球。

[0051] 因此,在另一方面中,本文提供形成超声对比剂的方法,其包含在全氟碳气体存在下和在水性稀释剂存在或不存在下活化前述非水性混合物中的任一者,以形成脂质封装的气体微球。

[0052] 在另一方面中,本文提供形成超声对比剂的方法,其包含在全氟碳气体存在下组合前述非水性混合物中的任一者与水性稀释剂,及活化所述组合以形成脂质封装的气体微球。可在使用或不使用搅动或其它修改(例如,加热等)下将水性稀释剂添加至非水性混合物,且所述组合混合物可在全氟碳气体存在下经活化,不管其是单相混合物(即,脂质相及水相已大体上混合和/或混合物表现为相对均匀)还是双相混合物(即,脂质相及水相尚未大体上混合和/或混合物不表现为相对均匀)。

[0053] 在另一方面中,本文提供形成超声对比剂的方法,其包含组合某些前述非水性混合物与单独的丙二醇或丙二醇和水性稀释剂(同时或连续地),及在全氟碳气体存在下活化所述组合以形成脂质封装的气体微球。

[0054] 在另一方面中,本文提供形成超声对比剂的方法,其包含组合某些前述非水性混合物与单独的甘油或甘油和水性稀释剂(同时或连续地),及在全氟碳气体存在下活化所述组合以形成脂质封装的气体微球。

[0055] 非水性混合物在使用前可处于室温下和/或可已存储于室温下。可在室温下存储几天至几个月到几年。

[0056] 在一些实施例中,活化进行20-45秒。在一些实施例中,活化进行60-120秒。

[0057] 在一些实施例中,所述方法进一步包含在额外水性稀释剂中稀释脂质封装的气体微球。

[0058] 在一些实施例中,所述方法进一步包含将脂质封装的气体微球投与需要超声对比成像的个体。

[0059] 在一些实施例中,组合物在小瓶中。在一些实施例中,组合物在注射器中。在一些实施例中,组合物在单一室容器中。在一些实施例中,组合物在多室容器中。

[0060] 在其它方面中,本文提供检测和/或测量本文所述组合物中的任一者中的杂质含量的方法。所述方法尤其可用于评价组合物的完整性,且可用于确定组合物适于使用或应丢弃。可针对本文所述组合物的新近制造批次实施所述方法,或可针对在制造后已运输或存储一段时间的批次实施所述方法。

[0061] 所述方法包含检测和识别样品的组份。在一些实施例中,所述方法进一步包含任选地在检测和识别之前基于物理化学性质(例如(但不限于)电荷及亲脂性)分离各组份。在一些实施例中,在检测之前实施分离且在分离之前用盐水稀释样品。在一些实施例中,将样品混合直到获得均匀溶液为止。基于物理化学性质的分离技术为业内已知且包括(但不限于)HPLC,例如反相HPLC。然后使用例如(但不限于)荷电气溶胶检测(CAD)的技术检测杂质并任选地测量。在另一实施例中,在分离后可使用蒸发光散射检测(ELSD)。此一检测的实例更详细地阐述于本文中。

[0062] 本文将更详细地阐述本发明的这些和其它方面及实施例。

## 附图说明

- [0063] 图1. 脂质掺合物/丙二醇 (LB/PG) 调配物对DEFINITY<sup>®</sup>的稳定性。
- [0064] 图2. 脂质掺合物/丙二醇/甘油 (LB/PG/G) 调配物对DEFINITY<sup>®</sup>的稳定性。
- [0065] 图3. 脂质掺合物/丙二醇/甘油/缓冲剂 (LB/PG/G/缓冲剂) 调配物对DEFINITY<sup>®</sup>的稳定性。

## 具体实施方式

[0066] 根据本发明已发现,用于生成待用作超声波成像剂的脂质封装的气体微球的脂质调配物可维持在室温下,包括在室温下维持延长时间段,而无显著降解。先前认为,待用于相同目的的脂质调配物必须存储于4℃下以避免降解。根据本发明已发现,将这些经改质脂质调配物在室温下存储几个月产生少于5%杂质,此含量少于在室温下存储相同时间段时当前市售超声对比剂中存在的含量。

[0067] 重要的是,将这些经改质脂质调配物(称为含脂质非水性混合物)存储在室温下(包括长期存储在室温下)对其形成供用作超声对比剂的微球的能力无负面影响,如由形成大小及数量与当前市售超声对比剂相当的微球的能力所证明。因此,至少在此增强稳定性方面,这些经改质脂质调配物比某些市售脂质调配物更稳健。

[0068] 本文所述的新颖脂质调配物比某些现有调配物更易于使用,此至少部分是由于其无需冷冻。与此相比,某些当前市售脂质调配物在其存储阶段中必须始终冷冻,但随后在室温下投与患者。这意味着,所述调配物必须首先从约4℃升温至到约室温才可使用。与此相比,本文提供的经改质脂质调配物可基本上“现成的”使用,而无需等待升温至室温所需的时间段。此使得这些改质调配物更易于使用且也有助于其在(例如)紧急情况中直接使用。

[0069] 另外,由于经改质脂质调配物固有地更稳健性质,其完整性在使用前(包括例如在运输和存储期间)受损的机率较低。在当前实践中,如果某些市售调配物已在室温下存储任一较长时间段,那么所述调配物的质量可能有问题,且因此可能需要被丢弃。对于新颖调配物,最终用户无需担心调配物的历史或处理。因此,除了增加易用性外,由于完整性问题,经改质脂质调配物的浪费也应较少。

[0070] 这些经改质脂质调配物打算用作超声对比剂或用作其中间体。因此,且如本文所述,在与气体一起提供时,其可经活化以形成具有或不具有水性稀释剂的脂质封装的气体微球。此外,在使用水性稀释剂时,所述调配物可在简单添加水性稀释剂后活化,而无需预调配或预混合非水性混合物及水性稀释剂。作为实例,添加水性稀释剂可产生不均匀或二相混合物,且此二相混合物可经活化。某些市售超声对比剂是作为于水性基质中调配的预调配、相对均匀的单相脂质混合物来提供,且以此基本上经水性调配的形式活化。与此相比,本文提供的经改质脂质调配物可以其非水性形式活化或可在简单添加水性稀释剂后活化,而无需将脂质及水性稀释剂预调配或使混合物均匀。此反过来意味着,脂质调配物体积在活化时(和运送及存储时)可明显较小,且如果需要可在即将使用前将其稀释。此还意味着,调配物完整性较不可能受损,因为可在不添加水性稀释剂的情况下活化,且随后如果不使用调配物,简单地将调配物存储以供将来使用即可。如果相反的非水性混合物必须与水溶液组合以活化,则在此情况下将失去此类型的灵活性,且将不得不丢弃所述调配物,再次导致不必要的浪费。

[0071] 因此,本发明部分地基于意外且惊人的发现,即用于制造自身适合作为超声对比剂的脂质封装的气体微球的脂质当于非水性混合物中调配时可在室温下存储延长时间段而无显著降解。非水性混合物可包含丙二醇、或甘油、或丙二醇和甘油的混合物。重要的是,本文提供的脂质调配物产生尤其在微球浓度和大小方面(此二者影响微球的声学性质)与当前市售超声对比剂DEFINITY<sup>®</sup>所产生者相当的脂质封装的气体微球。所述脂质调配物对于在室温下存储(包括长期存储)比DEFINITY<sup>®</sup>更稳健且更不敏感。

[0072] DEFINITY<sup>®</sup>是由FDA批准用于具有次最优超声波心动图的个体以使左心室腔不透明并改进左心室心内膜缘的描绘的超声对比剂。DEFINITY<sup>®</sup>是在小瓶中提供,所述小瓶包含于水溶液中以10:82:8摩尔%比率包含DPPA、DPPC及MPEG5000-DPPE的单相溶液及包含全氟丙烷气体的顶隙。在将其投与个体之前,通过机械振荡活化DEFINITY<sup>®</sup>(下文中称作“经活化DEFINITY<sup>®</sup>”)。活化导致形成足够数目的平均直径为1.1到3.3微米的脂质封装的气体微球。然而,DEFINITY<sup>®</sup>必须冷冻直到即将使用前为止。此尤其限制其尤其在存储阶段期间在缺少适当冷冻的环境中的实用性。

[0073] 本文尤其提供用于制造脂质封装的气体微球的组合物及脂质封装的气体微球自身的组合物及用途。本发明进一步提供制造所述微球的方法。

[0074] 存储调配物

[0075] 这些新颖调配物包含一或多种脂质与丙二醇(PG)、或甘油(G)或丙二醇和甘油(PG/G)的非水性混合物。根据本发明已发现,这些调配物与先前使用现有超声对比剂调配物可能的时间段相比可在较高温度下存储更长时间段,而无显著降解。因此,这些组合物可用于更宽范围的环境中而无需特别担心在使用前如何处理调配物。

[0076] 这些新颖调配物的增强稳定性展示于实例中,其中显示丙二醇或丙二醇和甘油中的脂质调配物可维持3个月或更长时间,同时降解少于在维持在室温下的DEFINITY<sup>®</sup>调配物中所观察者。实例展示,这些调配物可存储约3-6个月而无显著降解。

[0077] 脂质于丙二醇、或甘油、或丙二醇和甘油中的非水性混合物打算为具有少于或等于5重量%水(即,水重量对脂质与丙二醇和/或甘油的组合的重量)的混合物。在一些情况下,非水性混合物包含少于5%水(w/w)、1-4%水(w/w)、1-3%水(w/w)、2-3%水(w/w)或1-2%水(w/w)。在一些情况下,非水性混合物包含少于1%水(w/w)。水含量可在制造结束时(且在长期存储之前)测量,或其可在存储(包括长期存储)之后且即将使用之前测量。

[0078] 非水性混合物也可无盐,此意味着其不含除脂质反荷离子以外的任何盐。更特定地且作为实例,例如DPPA和DPPE等脂质通常作为钠盐提供。如本文所用,无盐非水性混合物可包含所述反荷离子(例如,如果使用DPPA和/或DPPE,则为钠),但其不含其它离子。在一些情况下,非水性混合物不含氯化钠或氯化物。

[0079] 非水性混合物可包含缓冲剂。缓冲剂可为乙酸盐缓冲剂、苯甲酸盐缓冲剂或水杨酸盐缓冲剂,但其并不限于此。在一些情况下,非磷酸盐缓冲剂由于其在本文所提供的非水性混合物中的溶解曲线而是优选的。在一些情况下,可使用磷酸盐缓冲剂(例如,在添加水性稀释剂后或与其同时)。

[0080] 在一些实施例中,非水性混合物包含以下物质、由其组成或基本上由其组成:(a)一或多种脂质,(b)丙二醇、或甘油或丙二醇/甘油,及(c)非磷酸盐缓冲剂。所述非水性混合物可与例如全氟碳气体等气体一起提供,或其可单独提供(即,在气体不存在下)。所述非水

性混合物可以单次使用量和/或在具有或不具有气体的单次使用容器中提供。所述容器通常将无菌。

[0081] 非磷酸盐缓冲剂可为(但不限于)乙酸盐缓冲剂、苯甲酸盐缓冲剂、水杨酸盐缓冲剂、二乙醇胺缓冲剂、三乙醇胺缓冲剂、硼酸盐缓冲剂、碳酸盐缓冲剂、谷氨酸盐缓冲剂、琥珀酸盐缓冲剂、苹果酸盐缓冲剂、酒石酸盐缓冲剂、戊二酸盐缓冲剂、乌头缓冲剂、柠檬酸缓冲剂、乙酸缓冲剂、乳酸盐缓冲剂、甘油酸盐缓冲剂、葡糖酸盐缓冲剂及tris缓冲剂。在一些情况下,缓冲剂是磷酸盐缓冲剂。所属领域的技术人员可熟练地确定并最优化每种缓冲剂类型的缓冲剂浓度。

[0082] 如本文所用,室温意指15-30℃温度,包括18-25℃及20-25℃及其间的所有温度。室温可受控(例如,维持恒温)以处于所述温度下,但其并不限于此。

[0083] 脂质

[0084] 这些新颖调配物包含一种且通常一种以上脂质。如本文所用,“脂质”或“总脂质”或“组合脂质”意指脂质混合物。

[0085] 脂质可以其个别固态(例如,粉末化)形式提供。或者,脂质可作为脂质掺合物提供。制造脂质掺合物的方法包括那些阐述于美国专利第8,084,056号及公开PCT申请案W099/36104中者。如本文所用,脂质掺合物打算表示两种或更多种脂质,其已经掺和而产生比原本通过简单混合呈其个别粉末化形式的脂质可得到者更均匀的脂质混合物。脂质掺合物通常呈粉末形式。脂质掺合物可经由水性悬浮-冻干工艺或使用有机溶剂的有机溶剂溶解-沉淀工艺制得。在水性悬浮-冻干工艺中,将所要脂质在升温下悬浮于水中,且然后通过冻干来浓缩。

[0086] 有机溶剂溶解方法涉及以下步骤:

[0087] (a) 使所要脂质(例如,DPPA、DPPC和MPEG5000DPPE)与第一非水性溶剂是统接触。此系统通常是溶剂组合,例如 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 和甲苯/ $\text{MeOH}$ 。优选地,第一非水性溶剂是甲苯与甲醇的混合物。可希望使脂质溶液升温至足以实现完全溶解的温度。此一温度优选为约25℃到75℃,更优选约35℃到65℃。溶解后,可通过热过滤或冷却到室温且然后过滤来去除未溶解的外来物质。可使用已知过滤方法(例如,重力过滤、真空过滤或加压过滤)。

[0088] (b) 然后将溶液浓缩为浓稠凝胶/半固体。浓缩优选通过真空蒸馏来实施。也可使用其它浓缩溶液的方法,例如旋转蒸发。此步骤的温度优选为约20℃到60℃,更优选30℃到50℃。

[0089] (c) 然后将浓稠凝胶/半固体分散于第二非水性溶剂中。优选在接近环境温度(例如,15-30℃)下使混合物浆化。可用第二非水性溶剂是那些使脂质从经过滤溶液沉淀者。第二非水性溶剂优选为甲基叔丁基醚(MTBE)。可使用其它醚和醇。

[0090] (d) 然后收集在添加第二非水性溶剂后产生的固体。优选地,用另一部分的第二非水性溶剂(例如,MTBE)洗涤所收集固体。收集可优选在环境温度下经由真空过滤或离心实施。收集后,优选将固体在真空中在约20-60℃的温度下干燥。

[0091] 美国专利第8,084,056号及公开PCT申请案W0 99/36104中关于生成脂质掺合物的方法的内容以引用方式并入本文中。

[0092] 有机溶剂溶解-沉淀工艺出于多种原因优选超过水性悬浮/冻干工艺,如美国专利

第8,084,056号及公开PCT申请案WO 99/36104中所概述,包括使用有机溶解方法所得的均匀分布的脂质固体。

[0093] 或者,脂质可作为个别粉末来提供,所述粉末一起或个别地直接溶于丙二醇、甘油或丙二醇/甘油中以形成非水性混合物。

[0094] 如本文所用,脂质溶液是包含脂质混合物的溶液。类似地,脂质调配物是包含一或多种脂质的调配物。脂质可为阳离子、阴离子或中性脂质。脂质可具有天然、合成或半合成来源,包括例如脂肪酸、氟化脂质、中性脂肪、磷脂、油、氟化油、糖脂、表面活性剂(surface active agent) (表面活性剂(surfactant)和氟表面活性剂)、脂肪族醇、蜡、萜烯和类固醇。

[0095] 至少一种脂质可为磷脂,且因此脂质掺合物可称为磷脂掺合物。如本文所用,磷脂是含有油性(疏水)烃链且具有极性(亲水)含磷头基的脂肪物质。磷脂是两亲性的。其在水性介质中自发形成边界和封闭的囊泡。

[0096] 优选地,所有脂质均为磷脂,优选1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱(DPPC);1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷脂酸(DPPA);和1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺(DPPE)。DPPA和DPPE可作为单钠盐形式提供。

[0097] 在一些情况下,脂质组份可经改质以降低微球与周围环境(包括活体内环境)的反应性,由此延长其半衰期。具有脂质的聚合物(例如几丁质、玻尿酸、聚乙烯基吡咯烷酮或聚乙二醇(PEG))也可用于此目的。偶联到PEG的脂质在本文中称作聚乙二醇化脂质。优选地,聚乙二醇化脂质为DPPE-PEG或DSPE-PEG。

[0098] 脂质与例如PEG等聚合物的偶联可通过多种键或键联来完成,例如(但不限于)酰胺、氨基甲酸酯、胺、酯、醚、硫醚、硫酸胺和二硫化物(硫酯)键联。

[0099] PEG上的末端基团可为(但不限于)羟基-PEG(HO-PEG)(或其反应性衍生物)、羧基-PEG(COOH-PEG)、甲氧基-PEG(MPEG)或另一低碳数烷基(例如如在异丙氧基PEG或叔丁氧基PEG中)、氨基PEG(NH<sub>2</sub>PEG)或硫醇(SH-PEG)。

[0100] PEG的分子量可从约500到约10000变化,包括约1000到约7500和约1000到约5000。在一些重要实施例中,PEG的分子量为约5000。因此,DPPE-PEG5000或DSPE-PEG5000是指附接有分子量为约5000的PEG聚合物的DPPE或DSPE。

[0101] 聚乙二醇化脂质相对于脂质溶液中的脂质总量的百分比以摩尔计为约2%到约20%或介于约2%到约20%之间。在各个实施例中,聚乙二醇化脂质相对于脂质总量的百分比为5摩尔%到约15摩尔%或介于5摩尔%到约15摩尔%之间。

[0102] 优选地,脂质为1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱(DPPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷脂酸单钠盐(DPPA)和N-(聚乙二醇5000氨甲酰基)-1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺单钠盐(PEG5000-DPPE)。聚乙二醇5000氨甲酰基可为甲氧基聚乙二醇5000氨甲酰基。在一些重要实施例中,脂质可为DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE中的一者、两者或所有三者。PEG5000-DPPE可为MPEG5000-DPPE或HO-PEG5000-DPPE。

[0103] 众多种脂质(如阐述于昂格尔(Unger)等人的美国专利第5,469,854号中者)可用于本发明方法中。适宜脂质包括(例如)脂肪酸、溶血性脂质、氟化脂质、磷酸胆碱,例如与血小板活化因子(PAF)结合者(阿文蒂极性脂质公司(Avanti Polar Lipids),阿拉巴斯特(Alabaster),亚拉巴马州(Ala.)),包括1-烷基-2-乙酰基-sn-甘油3-磷酸胆碱和1-烷基-2-羟基-sn-甘油3-磷酸胆碱;具有饱和和不饱和脂质二者的磷脂酰胆碱,包括二油酰基磷

酯酰胆碱;二肉豆蔻酰基-磷脂酰胆碱;二(十五酰基)磷脂酰胆碱;二月桂酰基磷脂酰胆碱;1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱(DPPC);二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC);和二花生四烯酰基磷脂酰胆碱(DAPC);磷脂酰乙醇胺,例如二油酰基-磷脂酰乙醇胺、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺(DPPE)和二硬脂酰基-磷脂酰乙醇胺(DSPE);磷脂酰基丝氨酸;磷脂酰基甘油,包括二硬脂酰基磷脂酰基甘油(DSPG);磷脂酰肌醇;神经鞘脂,例如鞘磷脂;糖脂,例如神经节苷脂GM1和GM2;糖脂;硫脂;鞘糖脂;磷脂酸,例如1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷脂酸(DPPA)和二硬脂酰基磷脂酸(DSPA);棕榈酸;硬脂酸;花生四烯酸;和油酸。

[0104] 其它适宜脂质包括磷脂酰胆碱,例如二油酰基磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)和二硬脂酰基磷脂酰胆碱;磷脂酰乙醇胺,例如二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二油酰基磷脂酰乙醇胺及N-琥珀酰基-二油酰基磷脂酰乙醇胺;磷脂酰基丝氨酸;磷脂酰基-甘油;神经鞘脂;糖脂,例如神经节苷脂GM1;糖脂;硫脂;鞘糖脂;磷脂酸,例如二棕榈酰基磷脂酸(DPPA);棕榈酸脂肪酸;硬脂酸脂肪酸;花生四烯酸脂肪酸;月桂酸脂肪酸;肉豆蔻酸脂肪酸;月桂烯酸脂肪酸;抹香鲸酸脂肪酸;肉豆蔻油酸脂肪酸;棕榈油酸脂肪酸;岩芹酸脂肪酸;油酸脂肪酸;异月桂酸脂肪酸;异肉豆蔻酸脂肪酸;异棕榈酸脂肪酸;异硬脂酸脂肪酸;胆固醇及胆固醇衍生物,例如胆固醇半琥珀酸酯、胆固醇硫酸酯和(4'-三甲基铵基)-丁酸胆固醇基酯;聚氧乙烯脂肪酸酯;聚氧乙烯脂肪酸醇;聚氧乙烯脂肪酸醇醚;聚氧乙基化失水山梨醇脂肪酸酯;甘油聚乙二醇羟基硬脂酸酯;甘油聚乙二醇蓖麻醇酸酯;乙氧基化大豆固醇;乙氧基化蓖麻油;聚氧乙烯-聚氧丙烯脂肪酸聚合物;聚氧乙烯脂肪酸硬脂酸酯;12-(((7'-二乙基氨基香豆素-3-基)-羰基)-甲基氨基)-十八烷酸;N-[12-(((7'-二乙基氨基-香豆素-3-基)-羰基)-甲基-氨基)十八酰基]-2-氨基-棕榈酸;1,2-二油酰基-sn-甘油;1,2-二棕榈酰基-sn-3-琥珀酰基甘油;1,3-二棕榈酰基-2-琥珀酰基-甘油;和1-十六烷基-2-棕榈酰基-甘油磷酸乙醇胺和棕榈酰基高半胱氨酸;月桂基三甲基溴化铵(月桂基=十二烷基-);鲸蜡基三甲基溴化铵(鲸蜡基=十六烷基-);肉豆蔻基三甲基溴化铵(肉豆蔻基=十四烷基-);烷基二甲基苄基氯化铵,例如其中烷基为C<sub>12</sub>、C<sub>14</sub>或C<sub>16</sub>烷基;苄基二甲基十二烷基溴化铵;苄基二甲基十二烷基氯化铵;苄基二甲基十六烷基溴化铵;苄基二甲基十六烷基氯化铵;苄基二甲基十四烷基溴化铵;苄基二甲基十四烷基氯化铵;鲸蜡基二甲基乙基溴化铵;鲸蜡基二甲基乙基氯化铵;鲸蜡基溴化吡啶鎓;鲸蜡基氯化吡啶鎓;N-[1-2,3-二油酰基氧基)-丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA);1,2-二油酰基氧基-3-(三甲基铵基)丙烷(DOTAP);和1,2-二油酰基-e-(4'-三甲基铵基)-丁酰基-sn-甘油(DOTB)。

[0105] 在一些使用DPPA、DPPC和DPPE的实施例,其摩尔百分比可为约77-90摩尔%DPPC、约5-15摩尔%DPPA和约5-15摩尔%DPPE,包括DPPE-PEG5000。每一脂质的优选比率包括阐述于实例部分中者,例如6.0比53.5比40.5(DPPA:DPPC:MPEG5000-DPPE)的重量%比率或10比82比8(10:82:8)(DPPA:DPPC:MPEG5000-DPPE)的摩尔%比率。

[0106] 打算用于长期室温存储的非水性混合物中的脂质浓度可视实施例而变化。在一些情况下,脂质浓度可在约0.1mg到约20mg/mL非水性混合物的范围内,包括约0.9mg到约10mg/mL非水性混合物和约0.9mg到约7.5mg/mL非水性混合物。在一些实施例中,脂质浓度可在约0.94mg到约7.5mg脂质/mL非水性混合物的范围内,包括约1.875mg到约7.5mg脂质/mL非水性混合物或约3.75mg到约7.5mg脂质/mL非水性混合物。在一些情况下,脂质浓度为

约0.94mg到约1.875mg/mL非水性混合物、约1.875mg到约3.75mg/mL非水性混合物或约3.75mg到约7.5mg总脂质/mL非水性混合物。

[0107] 作为实例脂质浓度可在约0.1mg到约10mg脂质/mL丙二醇/甘油(组合)的范围内,包括约1mg到约5mg脂质/mL丙二醇/甘油(组合)。在一些情况下,脂质浓度为约0.94mg到约3.75mg脂质/mL丙二醇/甘油(组合)。

[0108] 作为另一实例,脂质浓度可在约0.1mg到约20mg脂质/mL丙二醇的范围内,包括约1mg到约10mg脂质/mL丙二醇、或约2mg到约7.5mg脂质/mL丙二醇或约3.75mg到约7.5mg脂质/mL丙二醇。在一些实施例中,脂质浓度为约1.875mg到约7.5mg脂质/mL丙二醇,包括约3.75mg到约7.5mg脂质/mL丙二醇。

[0109] 作为再一实例,脂质浓度可在约0.1mg到约20mg脂质/mL甘油的范围内,包括约1mg到约10mg脂质/mL甘油、或约2mg到约7.5mg脂质/mL甘油或约3.75mg到约7.5mg脂质/mL甘油。在一些情况下,脂质浓度为约1.875mg到约7.5mg脂质/mL甘油,包括约3.75mg到约7.5mg脂质/mL甘油。

[0110] 与市售超声对比剂脂质调配物相比,使用较低量脂质生成仍可用作超声对比剂的脂质封装的气体微球组合物的能力是有益的,因为其降低可从单一小瓶投与个体的脂质(及其它成份)的最大量,由此减小个体意外过量用药的机率。

[0111] 丙二醇在室温下是液体,在20°C下密度为1.035g/ml。甘油在室温下是液体,在20°C下密度为1.26g/ml。

[0112] 能长期室温存储的非水性混合物的总体积可视最终所要用途而不同。作为实例,体积可在约0.05mL到约10mL、或约0.1mL到约10mL、或约0.1mL到约5mL、或约0.25mL到约5mL、或约0.5mL到约1mL或约0.1mL到约1.0mL的范围内。

[0113] 应理解,这些非水性混合物通常将如下文所述在活化之前和/或在投与个体之前经例如水溶液稀释。总稀释度可为约1倍到约100倍,包括约5倍到约30倍,包括约5倍、约10倍、约20倍和约50倍。

[0114] 在一些实施例中,包含脂质、丙二醇和甘油的脂质调配物可在活化之前稀释约5倍。在一些实施例中,包含脂质和丙二醇的脂质调配物可在活化之前稀释约10倍。在一些实施例中,包含脂质和甘油的脂质调配物可在活化之前稀释约10倍。之后,经稀释组合物可进一步稀释约1倍到约50倍,包括约10倍到约50倍,包括约10倍。

[0115] 因此,上文所提及的脂质、丙二醇和甘油浓度将在稀释后改变。例如,在稀释度为约10倍的情况下,最终调配物中的脂质浓度降低至上文所述浓度的约1/10。丙二醇和/或甘油浓度将发生类似降低。

[0116] 气体

[0117] 非水性混合物可与气体一起提供。例如,非水性混合物可与气体接触提供,或其可与气体提供于同一容器或外壳中但不与气体接触(即,非水性混合物及气体可在物理上彼此分离)。

[0118] 在此之前尚未得知或预计,这些非水性混合物可在室温下在与例如全氟碳气体等气体接触的情况下稳定长期存储。也未得知或预计,这些非水性混合物可经活化以形成脂质封装的气体微球。根据本发明进一步发现,这些非水性混合物中的某些可用于形成具有足够数目及足够大小(如例如表示为直径)以在临床上可用的微球。

[0119] 气体优选在本文提供的脂质调配物(例如非水性混合物)中大体上不可溶。气体可为不溶性氟化气体,例如六氟化硫或全氟碳气体。全氟碳气体的实例包括全氟丙烷、全氟甲烷、全氟乙烷、全氟丁烷、全氟戊烷、全氟己烷。可用于本发明微球中的气体的实例阐述于美国专利第5,656,211号中且以引用方式并入本文中。在重要实施例中,气体是全氟丙烷。

[0120] 气体实例包括(但不限于)六氟丙酮、异丙基乙炔、丙二烯、四氟丙二烯、三氟化硼、1,2-丁二烯、1,3-丁二烯、1,2,3-三氯丁二烯、2-氟-1,3-丁二烯、2-甲基-1,3-丁二烯、六氟-1,3-丁二烯、丁二炔、1-氟丁烷、2-甲基丁烷、十氟丁烷(全氟丁烷)、十氟异丁烷(全氟异丁烷)、1-丁烯、2-丁烯、2-甲基-1-丁烯、3-甲基-1-丁烯、全氟-1-丁烯、全氟-1-丁烯、全氟-2-丁烯、4-苯基-3-丁烯-2-酮、2-甲基-1-丁烯-3-炔、硝酸丁酯、1-丁炔、2-丁炔、2-氯-1,1,1,4,4,4-六氟-丁炔、3-甲基-1-丁炔、全氟-2-丁炔、2-溴-丁醛、羰基硫、巴豆腈、环丁烷、甲基环丁烷、八氟环丁烷(全氟环丁烷)、全氟异丁烷、3-氯环戊烯、环丙烷、1,2-二甲基环丙烷、1,1-二甲基环丙烷、乙基环丙烷、甲基环丙烷、联乙炔、3-乙基-3-甲基二氮杂环丙烷、1,1,1-三氟重氮乙烷、二甲基胺、六氟二甲基胺、二甲基乙基胺、双-(二甲基膦)胺、2,3-二甲基-2-降冰片烷、全氟-二甲基胺、二甲基氧鎢氯化物、1,3-二氧杂环戊烷-2-酮、1,1,1,1,2-四氟乙烷、1,1,1-三氟乙烷、1,1,2,2-四氟乙烷、1,1,2-三氯-1,2,2-三氟乙烷、1,1-二氯乙烷、1,1-二氯-1,2,2,2-四氟乙烷、1,2-二氟乙烷、1-氯-1,1,2,2,2-五氟乙烷、2-氯-1,1-二氟乙烷、1-氯-1,1,2,2-四氟-乙烷、2-氯-1,1-二氟乙烷、氯乙烷、氯五氟乙烷、二氯三氟乙烷、氟乙烷、硝基五氟乙烷、亚硝基五氟-乙烷、全氟乙烷、全氟乙基胺、乙基乙基醚、1,1-二氯乙烯、1,1-二氯-1,2-二氟-乙炔、1,2-二氟乙炔、甲烷、三氟甲烷磺酰氯、三氟甲烷磺酰氟、(五氟硫基)三氟甲烷、溴-二氟-亚硝基甲烷、溴-氟甲烷、溴-氯-氟甲烷、溴-三氟甲烷、氯-二氟-硝基甲烷、氯-二硝基甲烷、氯-氟甲烷、氯-三氟甲烷、氯-二氟甲烷、二溴-二氟甲烷、二氯-二氟甲烷、二氯-氟甲烷、二氟甲烷、二氟-碘甲烷、二硅基甲烷、氟甲烷、碘甲烷碘-三氟甲烷、硝基-三氟甲烷、亚硝基-三氟甲烷、四氟甲烷、三氯-氟甲烷、三氟甲烷、三氟甲基硫氯、2-甲基丁烷、甲基醚、甲基异丙基醚、乳酸甲酯、亚硝酸甲酯、甲基硫化物、甲基乙烯基醚、新戊烷、氮气(N<sub>2</sub>)、一氧化二氮、1,2,3-十九烷三甲酸2-羟基三甲酯、1-壬烯-3-炔、氧气(O<sub>2</sub>)、氧气<sup>17</sup>(<sup>17</sup>O<sub>2</sub>)、1,4-戊二烯、正戊烷、十二氟戊烷(全氟戊烷)、十四氟己烷(全氟己烷)、全氟异戊烷、全氟新戊烷、4-氨基-4-甲基-2-戊酮、1-戊烯、2-戊烯{顺式}、2-戊烯{反式}、1-戊烯-3-溴、全氟-1-戊烯、四氯邻苯二甲酸、2,3,6-三甲基哌啶、丙烷、1,1,1,2,2,3-六氟丙烷、1,2-环氧基丙烷、2,2-二氟丙烷、2-氨基丙烷、2-氯丙烷、七氟-1-硝基丙烷、七氟-1-亚硝基丙烷、全氟丙烷、丙烯、丙基-1,1,1,2,3,3-六氟-2,3-二氯、1-氯-丙烯、氯丙烯{反式}、2-氯-丙烯、3-氟-丙烯、全氟丙烯、丙炔、3,3,3-三氟丙炔、3-氟苯乙炔、六氟化硫、硫(二)-十氟(S<sub>2</sub>F<sub>10</sub>)、2,4-二氨基甲苯、三氟乙腈、三氟甲基过氧化物、三氟甲基硫化物、六氟化钨、乙烯基乙炔、乙烯基醚、氖、氩、氙、氫(尤其富铷超极化氫气)、二氧化碳、氮和空气。

[0121] 氟化气体(换句话说,含有一或多个氟分子的气体,例如六氟化硫)、氟碳气体(换句话说,为氟化碳或气体的氟化气体)和全氟碳气体(换句话说,全氟化的氟碳气体,例如全氟丙烷和全氟丁烷)是优选的。

[0122] 由于在产生期间纳入空气,气体(例如全氟碳气体)通常在室温下是以低于其一般浓度存在。预期在约一个大气压下,全氟丙烷在存于包含非水性混合物和气体顶隙的小瓶中时的浓度为约6.52mg/mL。如业内已知的其它气体的浓度会由于在产生期间纳入空气而

经类似稀释。

[0123] 本发明涵盖,不论与例如全氟碳气体等气体接触还是物理分离,本文所提供的非水性混合物可存储在约4°C到约40°C、约4°C到约30°C、约4°C到约25°C、约10°C到约40°C、约15°C到约40°C或约15°C到约30°C范围内的温度下。

[0124] 本发明进一步涵盖,不论与例如全氟碳气体等气体接触还是物理分离,本文所提供的非水性混合物可存储约1个月到约6个月、约1个月到约1年或约1个月到约2年。因此,作为非限制性实例,不论与例如全氟碳气体等气体接触还是物理分离,本文所提供的非水性混合物可在介于约15°C到约30°C范围内的温度下存储约1个月到约2年。

[0125] 容器及室配置

[0126] 非水性混合物可在容器(或外壳)中提供。容器可为单一室或多室容器,例如(但不限于)双室容器。

[0127] 在一些实施例中,容器是小瓶。小瓶可由任一材料制得,包括(但不限于)玻璃或塑料。玻璃可为医药级玻璃。容器可经塞子(例如橡胶塞)密封。在一些实施例中,容器是0.5-10mL容器。容器可为1-5mL容器、或1或2mL容器。所述体积是指通常置入容器中的液体的体积(称为液体填充体积)。此是与容器的整个内部体积相比,所述内部体积可高于所述液体填充体积。液体填充体积和内部体积的实例如下:具有2.9mL内部体积的肖特2mL(液体填充体积)小瓶;具有4.5mL内部体积的肖特3mL(液体填充体积)小瓶;和具有1.2mL内部体积的惠顿1mL(液体填充体积)v形小瓶。

[0128] 如在本发明上下文中将理解,容器的内部体积可由非水性混合物及气体占据。适宜容器的实例是惠顿2mL玻璃小瓶(可自例如尼普洛购得,目录号2702,B33BA,2cc,13mm,I型,燧石管瓶),其具有约3.75mL的实际内部体积。适宜塞子的实例是韦斯特(West)灰色丁基冻干(butyl lyo)矽化塞(目录号V50,4416/50,13mm)。适宜密封件的实例是韦斯特翻转式(flip-off)铝密封件(目录号3766,白色,13mm)。容器优选无菌和/或在引入脂质溶液和/或气体后经灭菌,如公开的PCT申请案W099/36104中所述。

[0129] 在一些实施例中,容器是平底容器,例如平底小瓶。适宜小瓶包括平底硼硅酸盐小瓶,包括惠顿小瓶。在一些实施例中,容器是非平底容器或小瓶。在一些实施例中,容器是V形底容器,例如V形底小瓶。在一些实施例中,容器是圆底容器,例如圆底小瓶。在一些实施例中,容器具有收敛式壁,使得其底部表面积(或底部表面直径)小于其顶部(开口)表面积(或直径)或小于其之间的任一直径(例如,体直径)。为明晰起见,V形底容器或小瓶具有收敛式壁,且其底部表面积显著小于其顶部或体表面积中的任一者。

[0130] 在一些实施例中,容器是注射器。非水性混合物可于预填充注射器中、任选地与气体物理接触来提供。

[0131] 在一些实施例中,容器是单一室容器,例如小瓶。在此一单一室中,非水性混合物及气体若存在,可彼此物理接触。

[0132] 在一些实施例中,容器包含两个或更多个室。两个室的内容物例如在存储期间彼此物理分离。然而,在使用时,两个室的内容物组合并掺和。因此,容器进一步包含屏障,所述屏障物理分离第一室与第二室的内容物,但最终可经“去除”以组合彼等内容物。本发明涵盖去除所述屏障的任何可能方式,包括压力、机械穿刺或穿孔、溶解等。

[0133] 双室装置(例如双室注射器或双室管)为业内已知且可自市场购得。非限制性实例

包括维特 (Vetter) 双室注射器及纽派克 (NeoPak) 双室管。

[0134] 在一些实施例中,由一或多种脂质、丙二醇、或甘油、或丙二醇/甘油及非磷酸盐缓冲剂组成或基本上由其组成的非水性混合物是在例如单一室容器等容器中提供。此一混合物可提供有或不提供有例如全氟碳气体等气体。若与气体一起提供,则所述气体可与非水性混合物在同一室中或在多室容器的单独室中,如下文所提供。

[0135] 容器可具有两个室,其中第一室包含含有丙二醇和甘油或丙二醇或甘油中的脂质(例如DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE)的非水性混合物,且第二室包含气体,例如全氟碳气体。非水性混合物可包含缓冲剂,例如非磷酸盐缓冲剂。

[0136] 在另一实施例中,容器可具有两个室,其中第一室包含

[0137] (i) 非水性混合物,其包含

[0138] (a) 脂质,例如DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE,及

[0139] (b) 丙二醇和甘油或丙二醇或甘油,且

[0140] (ii) 气体,例如全氟碳气体,且第二室包含水性稀释剂。

[0141] 非水性混合物可包含缓冲剂,例如非磷酸盐缓冲剂。或者,水溶液可包含缓冲剂,例如磷酸盐缓冲剂。

[0142] 在另一实施例中,容器可具有两个室,其中第一室包含

[0143] (i) 非水性混合物,其包含

[0144] (a) 脂质,例如DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE,及

[0145] (b) 丙二醇和甘油或丙二醇或甘油,且

[0146] 第二室包含

[0147] (i) 水性稀释剂,及

[0148] (ii) 气体,例如全氟碳气体。

[0149] 在另一实施例中,容器可具有至少三个室,其中第一室包含含有丙二醇或甘油或丙二醇和甘油中的DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE的非水性混合物,第二室包含气体(例如全氟碳气体),且第三室包含水溶液。

[0150] 在另一实施例中,容器可包含第一室,其包含含有脂质及丙二醇的非水性混合物;和第二室,其包含甘油。在另一实施例中,容器可包含第一室,其包含含有脂质及甘油的非水性混合物;和第二室,其包含丙二醇。

[0151] 水性稀释剂可包含盐,例如(但不限于)氯化钠,且因此可被视为盐水溶液。水性稀释剂可包含缓冲剂,例如磷酸盐缓冲剂,且因此可被视为缓冲水性稀释剂。水性稀释剂可为缓冲盐水溶液。非水性混合物可包含缓冲剂,例如非磷酸盐缓冲剂,其实例提供于本文中。非水性混合物及水性稀释剂可均包含缓冲剂。在典型实施例中,非水性混合物或水性稀释剂包含缓冲剂,或二者皆不包含缓冲剂。缓冲剂浓度将视所用缓冲剂类型而变,如所属领域的技术人员可理解且其可熟练确定。非水性脂质调配物中的缓冲剂浓度可在约1mM到约100mM的范围内。在一些情况下,缓冲剂浓度可为约1mM到约50mM、或约1mM到约20mM、或约1mM到约10mM、或约1mM到约5mM,包括约5mM。

[0152] 通常欲静脉内投与个体(包括人类个体)的最终调配物的pH可在4-8范围内或在4.5-7.5范围内。在一些情况下,所述pH可在约6到约7.5范围内,或在6.2到约6.8范围内。在其它情况下,pH可为约6.5(例如,6.5+/-0.5或+/-0.3)。在一些情况下,pH可在5到6.5的范

围内或在5.2到6.3的范围内或在5.5到6.1的范围内或在5.6到6的范围内或在5.65到5.95的范围内。在另一情况下,pH可在约5.7到约5.9的范围内(例如,所述范围的任一端点或两个端点 $\pm 0.1$ 或 $\pm 0.2$ 或 $\pm 0.3$ )。在另一情况下,pH可为约5.8(例如,5.8 $\pm 0.15$ 或5.8 $\pm 0.1$ )。

[0153] 在一些实施例中,水性稀释剂包含甘油、缓冲剂(例如磷酸盐缓冲剂)、盐及水。此一水性稀释剂可与缺少甘油的非水性混合物一起使用。在一些实施例中,脂质溶液进一步以8:1的重量比包含盐水(组合的盐和水)及甘油。

[0154] 在一些实施例中,水性稀释剂包含丙二醇、缓冲剂(例如磷酸盐缓冲剂)、盐及水。此一水性稀释剂可与缺少丙二醇的非水性混合物一起使用。

[0155] 在一些实施例中,水性稀释剂包含缓冲剂(例如磷酸盐缓冲剂)、盐及水。此一水性稀释剂可与包含丙二醇和甘油二者的非水性混合物一起使用。

[0156] 本文提供包含将脂质与丙二醇的非水性混合物及气体置入容器中的方法、包含将脂质与甘油的非水性混合物及气体置入容器中的方法及包含将脂质与丙二醇和甘油的非水性混合物及气体置入容器中的方法。在这些方法中的任一者中,可经由顶隙气体的交换将气体置入容器中。适于此目的的气体交换器为业内已知。气体交换装置的实例是冻干室。然后可将所述容器于约10°C到约50°C、或约15°C到约40°C或约20°C到约30°C下存储长达2年、或1到12个月或1-30天。在另一方面中,容器可提供有用于在前述温度下任选地存储前述时间段的说明书,或另一选择为缺少用于在4°C下或在冷冻下存储的说明书。

[0157] 本文提供一种方法,其包含组合包含脂质于丙二醇中的非水性溶液和全氟碳气体的第一组合物与包含水性稀释剂的第二组合物;一种方法,其包含组合包含脂质于甘油中的非水性溶液和全氟碳气体的第一组合物与包含水性稀释剂的第二组合物;及一种方法,其包含组合包含脂质于丙二醇和甘油中的非水性溶液和全氟碳气体的第一组合物与包含水性稀释剂的第二组合物。

[0158] 第一组合物和第二组合物可分别于容器的第一室和第二室中提供,且组合可包含使第一室与第二室之间的密封件破裂。第一组合物可于小瓶中提供,且第二组合物可于注射器中提供,且将注射器的内容物添加至小瓶的内容物中。或者,第二组合物可于小瓶中提供,且第一组合物可于注射器中提供,且将注射器的内容物添加至小瓶的内容物中。

[0159] 应理解,前述实施例的任一组合或变化形式涵盖并包括于本发明中,且除非明确指示,否则前述实例不打算视为限制性。

[0160] 任一前述容器实施例可在具有或不具有额外外壳的情况下提供有用于在高于4°C的温度下(或无冷冻)存储的说明书,或提供有与存储温度无关的说明书。应理解,本文所提供的调配物可存储于4°C下,但并未要求将其存储于此温度下。说明书可进一步叙述长期存储,例如存储几天、几个月或甚至几年,且可进一步叙述在室温下或大约在室温下(例如,18-25°C)长期存储。

[0161] 在一些实施例中,组合物在容器(例如小瓶)中,且所述容器经标记。容器可具有附着到其一或多个外表面的标记。所述标记可为纸质标记或肉眼可见且最终用户在没有其它帮助或装置的情况下能阅读并理解的其它此类标记。或者,标记可为机器可读或装置可读标记。机器可读或装置可读标记的实例包括磁条、芯片、条码(线性、矩阵及2D条码)、无线射频识别(RFID)标签等。例如线性条码等条码可为符合或满足统一代码委员会(Uniform

Code Council) 标准或保健业商务通信委员会 (Health Industry Business Communications Council) 标准者。所述标记可继而自例如以下等装置读取:磁条读取器、芯片读取器、条码扫描仪或读取器、RFID标签读取器等。实际上,已用于鉴定和/或“跟踪与追踪(track and trace)”目的的任何标记技术均可结合本文所提供的容器来使用。

[0162] 标记可为最终用户或容器的中间处置者提供多种信息,包括(但不限于)其中所含组合物的来源和/或生产者,包括(例如)制备组合物和/或产生组合物的组份的公司或子公司的名称、制备组合物的日期、制备组合物的物理位置、运送容器的日期、容器的处理(包括例如是否将其存储于远端位置及所述存储的条件及时长)、递送容器的日期、递送方式、如FDA所规定的国家药品代码(National Drug Code,NDC)、容器的内容物、使用剂量及方法(包括投与途径)等。

[0163] 标记可用于一或多种目的,包括例如容器及其中所含组合物的鉴定。鉴定意指将容器识别或标记为源于授权方且已由授权方制备的能力,且其容许最终用户或另一方识别源于另一未授权方的容器及组合物。标记也可用于对容器进行跟踪及追踪。此特征可用于在生产后且直到投与个体的点跟踪容器及其中所含组合物。就此而言,容器在所述时间段期间的移动可存储于数据库中,且任选地最终用户可存取所述数据库以确保组合物的完整性。

[0164] 标记也可作为组合标记,此意味着其可含有使用两种不同模式读取的信息。例如,标记可含有对于肉眼显而易见且可理解的信息(例如,其可以言语列举生产者的名称)及其它机器可读取的信息,例如RFID嵌入信息或条码嵌入信息。

[0165] 标记也可作为双重用途标记,此意味着其可用于两种或更多种目的。例如,标记可含有识别组合物的信息及识别制造商和/或制造日期的其它信息。此信息可以相同格式或使用不同格式传递(例如,一种信息可以RFID标记提供且另一种信息可以条码标记提供)。

[0166] 标记可提供对于人类可见且可理解的内容,例如制造商名称。或者或另外,标记可含有尽管对于人眼易见但在缺少必须参照的查找表或其它形式的数据库的情形下不提供有意义信息的信息。所述信息可例如作为 $\alpha$ -数字代码来提供。

[0167] 活化

[0168] 前述组合物中的任一者可用于形成脂质封装的气体微球,其进而可用作超声对比剂。如本文所用,脂质封装的气体微球是内部体积主要为气体且由脂质壳封装的球体。脂质壳可呈单层或双层布置,包括单层或多层双层。所述微球可用作超声对比剂。

[0169] 微球是从非水性混合物经由活化工序生成。如本文中更详细阐述,活化是指出于产生脂质封装的气体微球的目的剧烈振荡脂质溶液(例如非水性溶液)。活化通常产生至少 $1 \times 10^7$ 个微球/ml溶液、 $5 \times 10^7$ 个微球/ml溶液、或至少 $7.5 \times 10^7$ 个微球/ml溶液、或至少 $1 \times 10^8$ 个微球/ml溶液或约 $1 \times 10^9$ 个微球/ml溶液。

[0170] 本发明涵盖,本文提供的某些非水性混合物可用于在气体存在下形成脂质封装的气体微球。意外的是,这些非水性混合物可被活化。

[0171] 活化可通过剧烈搅动来实施,包括振荡定义的时间段。如上所述,活化可在水性稀释剂存在或不存在下进行。如本文所用,活化定义为搅动脂质溶液使得气体自顶隙引入脂质溶液中的运动。任何类型的搅动脂质溶液且导致引入气体的运动均可用于振荡。搅动必须具有足够力以容许在一段时间后形成泡沫。优选地,搅动具有足够力,使得在短时间段内

(例如30分钟,且优选在20分钟内,且更优选在10分钟内)形成泡沫。在一些实施例中,活化可在少于5分钟、少于4分钟、少于3分钟、少于2分钟内、在约75秒、少于1分钟内或在约45秒内进行。搅动可通过微乳化、通过微流化来进行,例如涡漩(例如通过涡旋)、侧向或上下运动。不同类型的运动可组合。搅动可通过振荡容纳脂质溶液的容器来进行,或通过振荡容器内的脂质溶液而不振荡容器自身来进行。此外,振荡可手动或通过机器进行。可使用的机械振荡器包括(例如)振荡台(例如VWR科技(Scientific)(加利福尼亚州喜瑞都(Cerritos, Calif.))振荡台)、微流化器Wig-L-Bug™(新月牙科制造公司(Crescent Dental Manufacturing, Inc.)),伊利诺依州莱昂斯(Lyons, Ill.)和机械油漆混合器VIALMIX®或实例12中所述的任何装置。剧烈振荡定义为至少约60次振荡运动/分钟。此在一些情况下是优选的。以至少1000转/分钟涡旋是剧烈振荡的实例且在一些情况下更优选。以1800转/分钟涡旋在一些情况下甚至更优选。

[0172] VIALMIX® 阐述于美国专利第6,039,557号中。容器(例如小瓶)可使用VIALMIX®充分搅动上文所列举的时间范围,包括例如45秒。使用VIALMIX®活化可进行少于1分钟或更久,包括30秒、45秒、60秒、75秒、90秒、105秒、120秒或更久。

[0173] 活化方法的其它实例提供于实例12中。

[0174] 包含脂质及丙二醇和甘油的非水性混合物可在气体存在下在不添加其它溶液的情况下活化。或者,此混合物可首先与水性稀释剂组合,然后在气体存在下活化。

[0175] 包括脂质及丙二醇的非水性混合物可首先与甘油组合,且任选地与水性稀释剂组合,然后在气体存在下活化。

[0176] 包含脂质及甘油的非水性混合物可首先与丙二醇组合,且任选地与水性稀释剂组合,然后在气体存在下活化。

[0177] 在其它情况下,呈固体形式的脂质无论是否作为脂质掺合物均可溶解于单独的丙二醇或单独的甘油中,或溶解于丙二醇和甘油中,或溶解于丙二醇、甘油及水性稀释剂中,所述水性稀释剂可进而包含盐及缓冲剂。这些混合物中的任一者可在使用前经活化,且在一些情况下,可进一步经水性稀释剂稀释。

[0178] 因此,本文提供包含脂质封装的气体微球的组合物,所述微球包含DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE和全氟碳气体且在包含丙二醇和甘油的非水性混合物中;包含脂质封装的气体微球的组合物,所述微球包含DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE和全氟碳气体且在包含丙二醇的非水性混合物中;和包含脂质封装的气体微球的组合物,所述微球包含DPPA、DPPC和PEG5000-DPPE和全氟碳气体且在包含甘油的非水性混合物中。

[0179] 本发明还涵盖在水性稀释剂(例如但不限于水性缓冲盐水溶液)存在下形成微球。水性稀释剂可包含盐、缓冲剂、丙二醇、甘油及水。

[0180] 在一些实施例中,包含脂质封装的气体微球的活化组合物可以8:1:1的重量%比率包含盐水、甘油及丙二醇。

[0181] 一旦形成,微球可稀释于水性稀释剂中,然后投与个体。水性盐水溶液通常将为医药上可接受的且可缺少防腐剂(本文中称作无防腐剂)。水性稀释剂可为盐水溶液(即,其可含有盐,例如(但不限于)氯化钠)和/或其可含有缓冲剂,例如(但不限于)磷酸盐缓冲剂。

[0182] 脂质封装的气体微球可稀释约5到约50倍或约35到约45倍。经稀释脂质封装的气体微球可通过浓注或连续输注至需要超声波对比成像的个体中来投与。

[0183] 微球的平均直径在微米范围内。在一些实施例中,微球的平均直径在约1.0微米到约2.0微米或约1.2微米到约1.8微米范围内。在一些实施例中,微球的平均直径为约1.6微米。

[0184] 在一些实施例中,大部分微球的直径可在约1.0微米到约3.0微米、或约1.0微米到约2.0微米、或约1.2微米到约2.0微米范围内,优选在约1.2微米到约1.8微米范围内。大部分微球意指至少50%、优选至少75%、更优选至少80%且甚至更优选至少90%的所测量的组合物中脂质封装的气体微球。在一些实施例中,至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%、至少90%、或至少95%的组合物中所检测脂质封装的气体微球的直径在所述范围内的任一范围内。

[0185] 平均直径代表组合物中所有检测微球的平均直径。微球直径通常是使用业内已知且可得的仪器来测量,包括(但不限于)莫尔文(Malvern)FPIA-3000希森美康(Sysmex)粒径分析仪。如业内将可理解,所述仪器通常对于下限及上限二者均具有截止大小。此意味着,不计数分别低于或高于这些截止值的微球(且不包括于微球浓度计算中)且不测量其直径(且在确定微球的平均直径时不考虑)。实例中所用仪器具有1.0微米下限截止值及40.0微米上限截止值。使用1.0微米下限截止值及40.0微米上限截止值计数或检测的大部分微球的直径在1.0至20.0微米范围内。应理解,本发明使用可互换地术语微球大小及微球直径。因此,除非另外规定,否则微球大小是指微球直径。

[0186] 本文提供的组合物(包括经活化组合物)可进一步包含其它成份,例如稳定材料或稳定剂、粘度改质剂、张力剂、涂布剂及悬浮剂。各类试剂的实例为业内已知且提供于例如以下文献中:美国专利第5,656,211号、公开的PCT申请案W099/36104和公开的美国申请案US 2013/0022550。

[0187] 本文提供的组合物(包括经活化组合物)可包含一或多种缓冲剂,包括(但不限于)乙酸盐缓冲剂、苯甲酸盐缓冲剂、水杨酸盐缓冲剂和/或磷酸盐缓冲剂。

[0188] 组合物的pH可为约6.2到约6.8。在一些情况下,pH可在5到6.5的范围内或在5.2到6.3的范围内或在5.5到6.1的范围内或在5.6到6的范围内或在5.65到5.95的范围内。在另一情况下,pH可在约5.7到约5.9的范围内(例如,所述范围的任一端点或两个端点 $\pm 0.1$ 或 $\pm 0.2$ 或 $\pm 0.3$ )。在另一情况下,pH可为约5.8(例如,5.8 $\pm 0.15$ 或5.8 $\pm 0.1$ )。所述范围可使用例如稀释于水中的乙酸盐缓冲调配物来实现。

[0189] 在一些实施例中,每ml最终组合物(在水性稀释剂稀释非水性溶液后)包含于水中的0.75mg脂质(由0.045mg DPPA、0.401mg DPPC和0.304mg DPPE-PEG5000组成)、103.5mg丙二醇、126.2mg甘油、2.34mg磷酸二氢钠一水合物、2.16mg磷酸氢二钠七水合物和4.87mg氯化钠。

[0190] 在一些实施例中,每ml最终组合物包含于水中的约0.43mg脂质(由0.0225mg DPPA、0.2mg DPPC和0.152mg DPPE-PEG5000组成)、103.5mg丙二醇、126.2mg甘油、2.34mg磷酸二氢钠一水合物、2.16mg磷酸氢二钠七水合物和4.87mg氯化钠。

[0191] 在一些实施例中,每ml最终组合物(在盐水稀释非水性溶液后)包含于水中的0.75mg脂质(由0.045mg DPPA、0.401mg DPPC和0.304mg DPPE-PEG5000组成)、103.5mg丙二醇、126.2mg甘油、0.074mg乙酸钠、0.006mg乙酸和7.20mg氯化钠。

[0192] 杂质及稳定性

[0193] 本发明进一步提供评价脂质溶液(例如非水性溶液)中的杂质含量的方法。此一方法包含使用多种分析方法中的任一种分析脂质溶液中杂质的存在,例如(但不限于)任选地与一或多种分离技术(例如HPLC)耦联的荷电气溶胶检测(CAD)。脂质溶液可为包含脂质及丙二醇或甘油或丙二醇和甘油的非水性溶液。脂质溶液可进一步包含缓冲剂,例如非磷酸盐缓冲剂。脂质溶液可进一步包含盐和/或水。杂质的存在高于限值可表示,脂质溶液未经适当存储,其稳定性已降低,且因此脂质溶液应被丢弃且不应投与个体。此一方法可用于质量控制目的。

[0194] 实例2提供测量非水性溶液中的杂质含量的方法。杂质含量是作为相对于输入(或理论或标称)脂质量的杂质%来提供,意指杂质是以假定脂质无损失时占所存在脂质总量的百分比表示。

[0195] 改质脂质调配物在室温下存储一段时间(包括例如约1个月、约2个月、约3个月、约6个月或更久,包括约1年或约2年)时,其可包含少于10%、少于5%或少于2%杂质。

[0196] 重要的是,在两种调配物均存储于室温下时(即,当组合物及DEFINITY<sup>®</sup>存储于室温下时),经改质脂质调配物包含的杂质可少于DEFINITY<sup>®</sup>。此杂质含量的降低可为约1%、约2%、约3%、约4%、或约5%或更大的差异。

[0197] 用途及应用

[0198] 本发明提供使用微球及微球组合物的方法。微球打算作为超声对比剂,且其可用于人类或非人类个体的活体内或活体外。本发明组合物可用于诊断或治疗目的或用于组合的诊断及治疗目的。

[0199] 在用作用于人类个体的超声对比剂时,组合物如本文所述来活化以形成足量微球,任选地将其稀释为较大体积,并以一或多次浓注注射或通过连续输注来投与。投与通常是静脉内注射。然后在之后不久实施成像。成像应用可针对心脏或其可涉及对超声波成像敏感的另一身体区域。成像可为身体一或多个器官或区域的成像,包括(但不限于)心脏、血管、心血管系统及肝。

[0200] 本发明的个体包括(但不限于)人类及动物。人类在一些情况下是优选的。

[0201] 脂质组合物是以有效量投与。有效量将为促进或引起既定活体内反应和/或应用的量。在成像应用(例如超声波应用)情况中,有效量可为脂质微球的容许个体或个体区域成像的量。

[0202] 实例

[0203] 实例1. 样品制备

[0204] 使用FDA批准的市售超声对比剂DEFINITY<sup>®</sup>(兰索斯医疗成像(Lantheus Medical Imaging))进行比较。每个小瓶含有以下物质:于注射用水中的103.5mg/mL丙二醇、126.2mg/mL甘油、和2.34mg/mL磷酸二氢钠一水合物、2.16mg/mL磷酸氢二钠七水合物和4.87mg/mL氯化钠的基质中的1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱(DPPC;0.401mg/mL)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷脂酸(DPPA;0.045mg/mL)和N-(甲氧基聚乙二醇5000氨甲酰基)-1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺(MPEG5000DPPE;0.304mg/mL)。pH为6.2-6.8。在2cc惠顿玻璃小瓶中,脂质溶液的标称填充体积为约1.76mL,所述小瓶的近似体积为3.80mL,且因此顶隙为约2.04mL并含有全氟丙烷气体(PFP,6.52mg/mL)。

[0205] 新颖调配物是如下制备:

[0206] 如专利US8084056中所述制备含有DPPC、DPPA、MPEG500DPPE的脂质掺合物(LB),此专利的内容以引用方式并入本文中且可用于本发明方法中。LB的调配物是通过在55°C下将LB粉末混合于丙二醇(PG)、或1:1v/v丙二醇/甘油(PG/G)或甘油媒剂中来制备。在一些研究中,将以90/10、75/25、50/50、25/79和10/90的盐:酸比率制备的0.005M乙酸盐、苯甲酸盐或水杨酸盐缓冲剂溶解于媒剂中。在一些情况下,磷酸盐缓冲剂包括于水溶液或盐水溶液中。

[0207] 实例2. 脂质稳定性

[0208] 将来自实例1的于丙二醇中的新颖调配物脂质掺合物样品置入2cc惠顿玻璃小瓶中,用PFP气体替代顶隙,插入韦斯特灰色丁基冻干塞且将小瓶用铝密封件卷边(crimp)。将小瓶存储于25°C环境室中以代表室温存储,或在干燥烘箱中加热至130°C以代表最终灭菌。在适当时间点,自存储去除样品小瓶,去卷边,将盐水添加至小瓶并混合以确保均匀溶液。将样品转移到HPLC小瓶并通过反相HPLC分离和电晕荷电气溶胶检测(CAD;具有荷电气溶胶检测的HPLC用于测量不同脂质类型(HPLC With Charged Aerosol Detection for the Measurement of Different Lipid Classes),I.N.阿克沃思(I.N.Acworth)、P.H.加马奇(P.H.Gamache)、R.麦卡锡(R.McCarthy)和D.阿萨(D.Asa),ESA生物科技公司(ESA Biosciences Inc.),美国马萨诸塞州切姆斯福德(Chelmsford,MA,USA);J.瓦拉斯卡(J.Waraska)和I.N.阿克沃思,美国生物技术实验室(American Biotechnology Laboratory),2008年1月)分析杂质。

[0209] 提供在25°C下存储3个月的DEFINITY®小瓶的结果以供比较。分析使用梯度反相HPLC及蒸发光散射检测(ELSD),使用C18管柱及含有以下的移动相:水、甲醇、乙酸铵及三乙胺。表1及2提供作为在25°C及130°C下小瓶中的总脂质含量百分比的总杂质。

[0210] 表1. 存储于25°C下的于丙二醇(PG)调配物中的脂质掺合物(LB)的杂质数据。

	7.50 mg 脂质掺合物/mL PG*	DEFINITY® (0.75 mg 脂质掺合物/mL)
[0211] 在 25°C 下的天数	96 天 (大约 3 个月)	3 个月
总杂质%	2.1	11.86

[0212] \*177mg含有LB的PG(0.72wt%LB;LB:PG的比率为1:138)。

[0213] 表2. 在130°C下处理30分钟的于丙二醇(PG)调配物中的脂质掺合物(LB)和DEFINITY®的杂质数据

	7.50 mg 脂质掺合物/mL PG*	3.75 mg 脂质掺合物/mL PG**	DEFINITY® (0.75 mg 脂质掺合物/mL)
[0214] 总杂质%	0.334	0.818	4.230

[0215] \*89mg含有LB的PG(0.72wt%LB;LB:PG的比率为1:138)。

[0216] \*\*177mg含有LB的PG(0.36wt%LB;LB:PG的比率为1:276)。

[0217] 图1图解说明DEFINITY®在2-8°C和25°C下和7.5mg LB/mL PG在25°C下随时间而变的总杂质含量。存储于2-8°C下的DEFINITY®中的总杂质含量与存储于25°C下的7.5mg

LB/mL PG调配物类似。然而,在将DEFINITY<sup>®</sup>存储于25℃下时,总杂质含量显著增加。

[0218] 这些数据展示,在较高温度下,7.5mg LB/mL PG调配物远比DEFINITY<sup>®</sup>调配物更稳健。此观察是意想不到的。

[0219] 实例3. 脂质掺合物/丙二醇/甘油 (LB/PG/G) 调配物的稳定性

[0220] 将于1:1 (v:v) 丙二醇/甘油中的来自实例1的新颖调配物脂质掺合物样品填充至2cc惠顿玻璃小瓶中,顶隙经PFP气体替代,插入韦斯特灰色丁基冻干塞,且将小瓶用铝密封件卷边。将小瓶存储于25℃环境室中以代表室温存储,或在烘箱中加热至130℃以代表最终灭菌。如实例2中所述制备并分析存储于25℃下的小瓶。如实例2中所述制备在130℃下加热的小瓶,但如实例2中针对DEFINITY<sup>®</sup>所述使用HPLC系统来分析。表3及4提供作为在25℃及130℃下的小瓶中的总脂质含量百分比的总杂质。提供如实例2中所述分析的DEFINITY<sup>®</sup>的结果以供比较。

[0221] 表3. 存储于25℃下的于PG/G调配物中的3.75mg脂质掺合物 (LB) /mL的杂质数据

	3.75 mg 脂质掺合物/mL PG/G*	DEFINITY <sup>®</sup> (0.75 mg 脂质掺合物/mL)
[0222] 在 25℃下的天数	87 天 (大约 3 个月)	3 个月
总杂质%	1.747	11.86

[0223] \*391mg含有LB的PG/G (0.33wt%LB:44.9wt%PG:54.8wt%G;LB:PG:G的比率为1:138:168)。

[0224] 表4. 在130℃下处理30分钟的于PG/G调配物中的脂质掺合物 (LB) 和DEFINITY<sup>®</sup>的杂质数据

	3.75 mg 脂质掺合物/mL PG/G*	DEFINITY <sup>®</sup> (0.75 mg 脂质掺合物/mL)
[0225] 总杂质%	2.558	4.150

[0226] \*391mg含有LB的PG/G (0.33wt%LB:44.9wt%PG:54.8wt%G;LB:PG:G的比率为1:138:168)。

[0227] 图2图解说明存储于2-8℃和25℃下的DEFINITY<sup>®</sup>和存储于25℃下的3.75mg LB/mL PG/G调配物随时间而变的总杂质含量。存储于2-8℃下的DEFINITY<sup>®</sup>中的总杂质含量与存储于25℃下的3.75mg LB/mL PG/G调配物类似。然而,在将DEFINITY<sup>®</sup>存储于25℃下时,总杂质含量显著增加。

[0228] 这些数据展示,在较高温度下,3.75mg LB/mL PG/G调配物远比DEFINITY<sup>®</sup>调配物更稳健。此观察是意想不到的。

[0229] 实例4. 缓冲脂质掺合物/丙二醇/甘油调配物的稳定性

[0230] 将于含有0.005M乙酸盐 (75/25乙酸钠/乙酸)、苯甲酸盐 (75/25苯甲酸钠/苯甲酸) 或水杨酸盐 (90/10水杨酸钠/水杨酸) 缓冲剂的1:1 (v:v) 丙二醇/甘油中的来自实例1的新颖调配物脂质掺合物样品填充至2cc惠顿玻璃小瓶中,顶隙经PFP气体替代,插入韦斯特灰

色丁基冻干塞,且将小瓶用铝密封件卷边。将小瓶存储于25℃下,如实例2中所述制备并分析。提供如实例2中所述分析的DEFINITY®的结果以供比较。表5提供作为在25℃下的小瓶中的总脂质含量百分比的总杂质。

[0231] 图3图解说明随时间而变的总杂质含量。然而,在将DEFINITY®存储于25℃下时,总杂质含量显著增加。这些数据展示,在较高温度下,3.75mg缓冲LB/mL PG/G调配物远比DEFINITY®调配物更稳健。此观察是意想不到的。

[0232] 表5. 存储于25℃下的3.75mg脂质掺合物/mL缓冲PG/G调配物的杂质数据

	3.75 mg 脂质掺合物/mL 缓冲 *PG/G 调配物			DEFINITY® (0.75 mg 脂质 掺合物/mL)
	75/25 乙 酸盐	75/25 苯 甲酸盐	90/10 水杨 酸盐	
在 25℃下的天数	50	50	50	2 个月
总杂质	0.562	0.658	1.475	8.94

[0234] \*于391mg含有LB的PG/G (0.33wt%LB;44.9wt%PG;54.8wt%G;LB:PG:G的比率为1:138:168) 中的5mM缓冲剂。比率代表乙酸钠对乙酸、苯甲酸钠对苯甲酸、水杨酸钠对水杨酸。

[0235] 实例5. 脂质掺合物甘油调配物的稳定性

[0236] 将于甘油中的来自实例1的新颖调配物脂质掺合物样品填充至2cc HPLC玻璃小瓶中,顶隙经PPF气体替代,且用含有隔膜的螺旋盖将小瓶密封。将小瓶存储在25℃下且如实例2中所述制备并分析。

[0237] 提供如实例2中所述分析的DEFINITY®的结果以供比较。表6提供此实验的总杂质结果。这些数据展示,在较高温度下,7.5mg缓冲LB/mL G调配物远比DEFINITY®调配物更稳健。此观察是意想不到的。

[0238] 表6. 存储于25℃下的7.50mg脂质掺合物/mL甘油(G)调配物\*的杂质数据。

	7.5 mg 脂质掺合物/mL G	DEFINITY® (Lot 4519M) (0.75 mg 脂质掺合物/mL)
在 25℃下的天数	149 天 (大约 5 个月)	6 个月
总杂质%	2.478	23.17

[0240] \*215mg含有LB (0.59wt%LB) 的G (LB:G的比率为1:168)。

[0241] 实例6. 脂质掺合物粉末的稳定性

[0242] 将LB粉末存储于25℃下的具有PTFE衬里盖的琥珀瓶中。在甲醇(50%)、丙二醇(10%)、甘油(10%)、乙酸铵(30%,5mM)溶液中制备样品。将溶液转移到HPLC小瓶并使用梯

度反相HPLC及蒸发光散射检测(ELSD)分析,使用C18管柱及含有以下的移动相:水、甲醇、乙酸铵及三乙胺。

[0243] 表7提供存储于25°C下的与DEFINITY<sup>®</sup>相比的脂质掺合物粉末的稳定性数据。

[0244] 这些数据展示,在较高温度下,脂质掺合物粉末远比DEFINITY<sup>®</sup>调配物更稳健。

[0245] 表7. 脂质掺合物粉末的杂质数据

	LB 粉末	DEFINITY <sup>®</sup> (0.75 mg 脂质掺合物/mL)
	25°C	25°C
[0246] 在 25°C 下的天数	87 天 (大约 3 个月)	3 个月
总杂质%	1.747	11.86

[0247] 实例7. DEFINITY<sup>®</sup>的活化

[0248] 通过使用VIALMIX<sup>®</sup>对PPF/脂质溶液进行机械振荡(阐述于美国专利6,039,557中,其内容以引用方式并入本文中且可用于本发明工艺中)来使FDA批准的市售超声对比剂DEFINITY<sup>®</sup>(兰索斯医疗成像公司)成为活性形式(“经活化”)。此导致将气体纳入脂质微球中且代表活性产物(见DEFINITY<sup>®</sup>处方信息)。DEFINITY<sup>®</sup>的最优VIALMIX<sup>®</sup>活化始终产生气体填充微球,可在稀释至适当鞘液中时使用具有1及40微米的下限截止值及上限截止值的粒径分析仪(莫尔文FPIA-3000希森美康)分析其数目及大小分布(见表8)。

[0249] 表8. 使用莫尔文FPIA-3000希森美康分析的DEFINITY<sup>®</sup>气泡数目和大小。

DEFINITY <sup>®</sup> 样品	微球平均直径(微米) <sup>a</sup>	微球/mL (x 10 <sup>9</sup> ) <sup>b</sup>
样品 1	1.7	2.67
样品 2	1.6	3.20
[0250] 样品 3	1.7	3.20
样品 4	1.7	1.75
样品 5	1.6	2.77
样品 6	1.6	2.97
平均值	1.7	2.76

[0251] <sup>a</sup>在1至40微米范围内的微球的平均微球直径。

[0252] <sup>b</sup>在1至40微米范围内的微球的平均微球浓度。

[0253] 使用飞利浦斯诺斯(Philips Sonos) 5500临床超声波成像系统测量所选样品的声衰减。将样品以1:7.7(1.3ml加8.7ml盐水)稀释于10ml注射器中。在室温下将200微升样品自此注射器吸取到含有200ml 0.9%盐水的烧杯中。用2cm搅拌棒维持溶液均匀度且将超声波系统的s3传感器置于烧杯顶部,刚刚进入溶液中且在搅拌棒上边缘上方8.9cm处。然后以

数字方式获取5秒的120Hz图像并写到磁盘上。US系统是以IBS模式使用,对于所有深度将TGC固定在最小值,且将LGC禁用。机械指数(MI)为0.2且功率设定为低于最大值18dB。将接收增益固定为90且将压缩固定为0。对于所测试的每一样品,在样品注射之前(空白)及之后获取US数据获取。在将样品引入烧杯后20秒、60秒及120秒进行测量。

[0254] 图像分析是使用飞利浦QLab实施,其读取US系统产生的文件并计算IBS模式的dB值。绘制搅拌棒上的所关注区域并将全部5秒(约360个视频帧)获取中的dB值平均化。衰减测量是通过自空白ROI值减去样品ROI值(二者均以dB表示)来获得。将此除以US传感器与搅拌棒上边缘之间的距离的两倍以产生以dB/cm表示的衰减。通过应用针对引入烧杯后的时间所取样品的线性回归来获得最终值。所用值衍生自回归线与y-轴的截距。

[0255] 表9. **DEFINITY**<sup>®</sup>声衰减测量<sup>a</sup>

	小瓶 1	小瓶 2	小瓶 3	平均值	SD
[0256] <b>DEFINITY</b> <sup>®</sup>	2.06	1.97	2.30	2.11	0.17

[0257] <sup>a</sup>**DEFINITY**<sup>®</sup>的声衰减是使用飞利浦斯诺斯5500测定。

[0258] 实例8. 非水性调配物的活化

[0259] 将实例1中所述脂质掺合物的新颖调配物称量至2cc惠顿玻璃小瓶中,若需要添加稀释剂,顶隙经PFP气体替代,插入韦斯特灰色丁基冻干塞,且将小瓶用铝密封件卷边。若需要,穿过塞子注射稀释剂,且使用**VIALMIX**<sup>®</sup>将小瓶机械振荡一定持续时间以产生最优产物活化。测定微球数目及分布且通过实例7中所述方法检查一些活化调配物的超声衰减。

[0260] 表10. 在即将活化之前添加有调配物稀释剂<sup>a</sup>的7.5mg脂质掺合物/mL PG调配物的微球特征。

	样品	微球平均直径(微米)	微球/mL(x 10 <sup>9</sup> )
[0261]			
[0262]	LB/PG 调配物(添加稀释剂,然后加盖) <sup>b</sup>	1.82	1.76
	LB/PG 调配物(加盖,然后通过塞子注射稀释剂) <sup>c</sup>	1.82	1.92

[0263] <sup>a</sup> 调配物稀释剂含有甘油、磷酸盐缓冲剂及盐水以在稀释调配物后匹配**DEFINITY**<sup>®</sup>小瓶组合物。

[0264] <sup>b</sup> 177mg丙二醇调配物(0.72wt%LB;LB:PG的比率为1:138),添加1.59mL稀释剂<sup>a</sup>,顶隙经PFP替代,将2mL小瓶用韦斯特灰色丁基塞密封,用铝密封件卷边,将小瓶用**VIALMIX**<sup>®</sup>活化45sec并如实例7中所述测试微球数目和平均大小。

[0265] <sup>c</sup> 177mg丙二醇调配物(0.72wt%LB;LB:PG的比率为1:138)于2mL小瓶中,顶隙经PFP替代且将小瓶加盖并卷边。使用一次性注射器将1.59mL稀释剂<sup>a</sup>穿过塞子注射至小瓶中,立即用**VIALMIX**<sup>®</sup>将小瓶活化45sec且然后如实例7中所述测试。

[0266] 表11. 在即将活化之前添加盐水的7.5mg脂质掺合物/mL PG调配物的微球特征及

声衰减.

	样品	微球平均直径(微米)	微球/mL( $\times 10^9$ )	平均(SD)声衰减 <sup>b</sup> (dB/cm)
[0267]	LB/PG 调配物(添加 盐水然后加盖) <sup>a</sup>	1.84	1.88	2.13 (0.34)

[0268] <sup>a</sup> 177mg丙二醇调配物(0.72wt%LB;LB:PG的比率为1:138),添加1.59mL 0.9%盐水,顶隙经PFP替代,将2mL小瓶用韦斯特灰色丁基塞密封,用铝密封件卷边,将小瓶活化并如实例7中所述测试微球数目和平均大小。

[0269] <sup>b</sup>如实例7中所述测定声衰减。

[0270] 表12. 7.5mg脂质掺合物/mL PG/G调配物的微球特征及声衰减

	样品	微球平均直径(微米)	微球/mL( $\times 10^9$ )	平均声(SD)衰减 <sup>c</sup> (dB/cm)
[0271]	LB/PG/G 调配物, 添加 盐水、随后活化 <sup>a</sup>	1.68	$2.65 \times 10^9$	未测定
	LB/PG/G 调配物, 活化 且然后用盐水稀释 <sup>b</sup>	1.82	$2.23 \times 10^9$	2.12 (0.27)

[0272] <sup>a</sup> 391mg丙二醇和甘油调配物(0.33%LB;44.9%PG:54.8%G;LB:PG:G的比率为1:138:168),添加1.38mL 0.9%盐水,顶隙经PFP替代,将2mL小瓶用韦斯特灰色丁基塞密封,用铝密封件卷边,将小瓶活化并如实例7中所述测试微球数目和平均大小。

[0273] <sup>b</sup> 391mg丙二醇和甘油调配物(0.33%LB;44.9%PG:54.8%G;LB:PG:G的比率为1:138:168),顶隙经PFP替代,且将小瓶加盖并卷边,如上文脚注a中所述。使用一次性注射器将1.38mL盐水注射至小瓶中,立即活化小瓶且然后如实例7中所述测试。

[0274] <sup>c</sup>如实例7中所述测定声衰减。

[0275] 表13. 在活化后添加盐水稀释剂的7.5mg脂质掺合物/mL缓冲(5mM)PG/G调配物的微球特征.

	乙酸钠对乙酸比率(5 mM 总乙酸根)	微球平均直径(微米)	微球/mL( $\times 10^9$ )
[0276]	90:10	1.72	$3.37 \times 10^9$
	80:20	1.70	$4.69 \times 10^9$
	70:30	1.74	$3.83 \times 10^9$
	50:50	1.71	$3.67 \times 10^9$
	10:90	1.82	$3.01 \times 10^9$

[0277] <sup>a</sup> 391mg缓冲丙二醇和甘油调配物(0.33%LB;44.9%PG:54.8%G;LB:PG:G的比率为1:138:168),将2mL小瓶用韦斯特灰色丁基塞密封,用铝密封件卷边,活化小瓶,添加

1.38mL 0.9% 盐水,混合小瓶并如实例7中所述测试微球数目和平均大小。

[0278] 这些研究显示,调配于a) PG b) PG/G c) 缓冲PG/G中的脂质掺合物可通过简单添加稀释剂并在 VIALMIX<sup>®</sup>上振荡经活化,以形成与经活化DEFINITY<sup>®</sup>具有等效特征和声衰减的微球(如实例7中所示)。此展示无需用水性稀释剂预调配且简单添加即足够。此外,稀释剂可通过穿过小瓶塞子注射添加至脂质调配物。另外,PG/G中的脂质掺合物可通过振荡后添加稀释剂经活化以形成与活化DEFINITY<sup>®</sup>具有等效特征及声衰减的微球(如实例7中所示)。执行发现令人惊讶。

[0279] 实例9. 个别脂质或脂质掺合物的活化

[0280] 通过在丙二醇中以0.045:0.401:0.304(w:w:w)比率(与脂质掺合物的比率相同)混合个别磷脂(DPPA、DPPC及MPEG5000DPPE)来制备调配物(个别脂质调配物)。将所得7.5mg/mL个别脂质丙二醇调配物添加至稀释剂(含有甘油、磷酸盐缓冲剂及盐水以匹配DEFINITY<sup>®</sup>小瓶组合物)并混合以形成0.75mg/mL的最终总脂质浓度。将1.7mL等份添加至2cc惠顿玻璃小瓶中,顶隙经PFP气体替代,插入韦斯特灰色丁基冻干塞,且将小瓶用铝密封件卷边。用VIALMIX<sup>®</sup>活化小瓶且使用希森美康FPIA 3000分析微球数目及平均微球大小。

[0281] 表14. 7.5mg个别脂质/mL PG调配物的微球特征

	微球平均直径(微米)	微球/mL(x 10 <sup>9</sup> )
[0282] 个别脂质调配物	1.7	2.46

[0283] 此研究展示,在PG中混合个别脂质而不制备脂质掺合物可产生容许与稀释剂混合以形成可经活化以产生特征等效于活化DEFINITY<sup>®</sup>的微球(在与实例7相比时)的调配物。

[0284] 在另一实验中,将脂质掺合物称量至2cc惠顿玻璃小瓶中,将基质(PG/G/盐水)添加至小瓶,顶隙经PFP气体替代,插入韦斯特灰色丁基冻干塞,用铝密封件将小瓶卷边,且然后在25°C下用VIALMIX<sup>®</sup>活化,并使用希森美康FPIA 3000分析微球数目及平均微球大小。结果呈现于表15中。

[0285] 表15. 具有PFP顶隙的小瓶中的脂质掺合物粉末(1.275mg)的微球特征

	微球平均直径(微米)	微球/mL(x 10 <sup>9</sup> )
[0286] 脂质掺合物调配物	1.63	4.10

[0287] 此研究展示,可将脂质掺合物粉末称量至小瓶中,添加稀释剂,顶隙经PFP替代,且将小瓶活化以产生特征等效于活化DEFINITY<sup>®</sup>的微球(在与实例7相比时)。此展示,脂质无需经预调配以容许活化。

[0288] 实例10. 不同脂质浓度的活化

[0289] 使用如实例1中所述的脂质掺合物通过在丙二醇(PG)或1:1v/v丙二醇/甘油(PG/G)中混合不同量的LB粉末来制备不同总脂质掺合物浓度的调配物。将每一脂质调配物称量至2cc惠顿玻璃小瓶中,若需要添加稀释剂,顶隙经PFP气体替代,插入韦斯特灰色丁基冻干塞,且将小瓶用铝密封件卷边。使用VIALMIX<sup>®</sup>将小瓶机械振荡以活化产物且若需要使用配备有针的注射器穿过塞子添加稀释剂。如实例7中所述测定微球数目及分布。

[0290] 表16. 不同脂质mg/mL PG调配物的微球特征<sup>a</sup>

	调配物中的脂质掺合物浓度	稀释时间	稀释后的脂质掺合物浓度	微球/mL( $\times 10^9$ )	直径( $\mu\text{m}$ )
[0291]	DEFINITY <sup>®</sup> 0.75 mg 脂质掺合物	n/a	n/a	3.05	1.66
	/mL <sup>d</sup>				
	7.5 mg 脂质掺合物 /mL PG	活化之前 <sup>b</sup>	0.75 mg/mL	4.55	1.63
	7.5 mg 脂质掺合物 /mL PG	活化之前 <sup>c</sup>	0.75 mg/mL	4.65	1.72
	DEFINITY <sup>®</sup> , 稀释到 0.375 mg 脂质掺合物/mL <sup>d</sup>	活化之前	0.375 mg/mL	1.38	1.66
[0292]	3.75 mg 脂质掺合物/mL PG	活化之前 <sup>b</sup>	0.375 mg/mL	2.24	1.7
	3.75 mg 脂质掺合物/mL PG	活化之前 <sup>c</sup>	0.375 mg/mL	2.69	1.72
	DEFINITY <sup>®</sup> , 稀释到 0.1875 mg 脂质掺合物/mL <sup>d</sup>	活化之前	0.1875 mg/mL	0.54	1.75
	1.875 mg 脂质掺合物/mL PG	活化之前 <sup>b</sup>	0.1875 mg/mL	0.892	1.72
	1.875 mg 脂质掺合物/mL PG	活化之前 <sup>c</sup>	0.1875 mg/mL	1.25	1.74

[0293] <sup>a</sup>小瓶 (2cc 惠顿小瓶) 是通过称量 177mg 含有 1.875mg、3.75mg 或 7.5mg 脂质掺合物/mL 的丙二醇 (LB:PG 比率分别为 1:552; 1:276; 和 1:138) 来制备。

[0294] <sup>b</sup>在即将活化之前将小瓶用 8:1 (v:v) 盐水及甘油稀释至 1.7mL 最终体积。然后将空气顶隙与 PFP 交换, 用韦斯特灰色丁基塞密封, 将小瓶用铝密封件卷边, 活化并如实例 7 中所

述测试微球数目及平均大小。

[0295] <sup>c</sup>在即将活化之前将小瓶用盐水稀释至1.7mL最终体积。然后将空气顶隙与PFP交换,用韦斯特灰色丁基塞密封,将小瓶用铝密封件卷边,活化并如实例7中所述测试微球数目及平均大小。

[0296] <sup>d</sup>小瓶(2cc惠顿小瓶)是通过用调配物基质1至4或1至2稀释DEFINITY<sup>®</sup>(还测试未稀释DEFINITY<sup>®</sup>)来制备,将顶隙气体与PFP交换,将小瓶加塞子并用铝密封件卷边,活化并如实例7中所述测试微球数目及平均大小。

[0297] 表17.不同脂质mg/mL PG/G调配物的微球特征<sup>a</sup>

调配物中的脂质掺合物浓度	稀释时间	稀释后的脂质掺合物浓度	微球/mL(x 10 <sup>9</sup> )	直径(μm)
DEFINITY <sup>®</sup> 0.75 mg 脂质掺合物/mL <sup>d</sup>	n/a	n/a	3.05	1.66
3.75 mg 脂质掺合物/mL PG/G	活化之前 <sup>b</sup>	0.75 mg/mL	4.71	1.66
3.75 mg 脂质掺合物/mL PG/G	活化之后 <sup>c</sup>	0.75 mg/mL	3.12	1.60
DEFINITY <sup>®</sup> , 稀释到 0.375 mg 脂质掺合物/mL <sup>d</sup>	活化之前	0.375 mg/mL	1.38	1.66
1.875 mg 脂质掺合物/mL PG/G	活化之前 <sup>b</sup>	0.375 mg/mL	2.45	1.74
1.875 mg 脂质掺合物/mL PG/G	活化之后 <sup>c</sup>	0.375 mg/mL	1.73	1.66
DEFINITY <sup>®</sup> , 稀释到 0.1875 mg 脂质掺合物/mL <sup>d</sup>	活化之前	0.1875 mg/mL	0.54	1.75
0.9375 mg 脂质掺合物/mL PG/G	活化之前 <sup>b</sup>	0.1875 mg/mL	1.00	1.72
0.9375 mg 脂质掺合物/mL PG/G	活化之后 <sup>c</sup>	0.1875 mg/mL	0.41	1.89

[0298]

[0299]	合物/mL PG/G				
--------	------------	--	--	--	--

[0300] <sup>a</sup>小瓶 (2cc惠顿小瓶) 是通过称量391mg含有0.9375mg、1.875mg或3.75mg脂质掺合物/mL的1:1 (v/v) 丙二醇和甘油 (LB:PG:G比率分别为1:552:672;1:276:336;和1:138:168) 来制备。

[0301] <sup>b</sup>在即将活化之前将小瓶用盐水稀释至1.7mL最终体积。然后将空气顶隙与PFP交换,用韦斯特灰色丁基塞密封,将小瓶用铝密封件卷边,活化并如实例7中所述测试微球数目及平均大小。

[0302] <sup>c</sup>将空气顶隙与PFP交换,将小瓶用韦斯特灰色丁基塞密封,用铝密封件卷边并活化。将盐水添加至1.7mL最终体积并如实例7中所述测试小瓶的微球数目及平均大小。

[0303] <sup>d</sup>小瓶 (2cc惠顿小瓶) 是通过用调配物基质1至4或1至2稀释DEFINITY<sup>®</sup> (亦测试未稀释DEFINITY<sup>®</sup>) 来制备,将顶隙气体与PFP交换,将小瓶加塞子并用铝密封件卷边,活化并如实例7中所述测试微球数目及平均大小。

[0304] 所述研究展示,具有不同脂质浓度的脂质掺合物调配物在活化时产生成比例数目的微球 (每给定体积,1mL)。微球大小等效于活化DEFINITY<sup>®</sup>且微球数目类似于或高于活化DEFINITY<sup>®</sup>或等效稀释形式。并未预期形成具有等效于活化DEFINITY<sup>®</sup>的特征及在PG或PG/G中的多种不同脂质掺合物浓度的微球的能力。在添加稀释剂之前通过活化PG/G中的脂质掺合物来实现此目标的能力甚至更令人惊讶。

[0305] 实例11. 容器

[0306] 将新颖脂质调配物或DEFINITY<sup>®</sup>填充至各种容器中,包括:小瓶、注射器及易曲折塑料管,随后将其活化。在所有研究中,将适当量的脂质调配物置于所述容器中,顶隙经PFP替代,密封所述容器且活化所述调配物。

[0307] 表18. 在2mL肖特小瓶中活化的PG或PG/G调配物中的脂质掺合物的微球特征<sup>a</sup>

填充重量	稀释时间	盐水稀释液 体积(mL)	微球平均直 径(微米)	微球/mL(x 10 <sup>9</sup> )
55 mg 的 7.5 mg LB/mL PG	活化之前	0.50	1.52	6.23
89 mg 的 7.5 mg LB/mL PG	活化之前	0.80	1.52	4.83
134 mg 的 7.5 mg LB/mL PG	活化之前	1.20	1.61	5.29

[0308]

[0309]	<b>177 mg 的 7.5 mg LB/mL PG</b>	活化之前	1.59	1.63	5.00
	<b>122 mg 的 3.75 mg LB/mL PG/G</b>	活化之前	0.43	1.57	5.43
	<b>196 mg 的 3.75 mg LB/mL PG/G</b>	活化之前	0.69	1.55	5.31
	<b>295 mg 的 3.75 mg LB/mL PG/G</b>	活化之前	1.04	1.61	4.48
	<b>392 mg 的 3.75 mg LB/mL PG/G</b>	活化之前	1.38	1.60	4.96
	<b>196 mg 的 3.75 mg LB/mL PG/G</b>	活化之后	0.69	1.88	1.77
	<b>295 mg 的 3.75 mg LB/mL PG/G</b>	活化之后	1.04	1.69	2.68
	<b>392 mg 的 3.75 mg LB/mL PG/G</b>	活化之后	1.38	1.56	4.06

[0310] <sup>a</sup>将适当量的7.5mg LB/mL PG或3.75mg LB/mL PG/G调配物称量至2mL肖特小瓶中,对于“活化前”样品添加适当量的盐水,空气顶隙经PPF替代,用韦斯特灰色丁基密封小瓶,用铝密封件卷边,活化,对于“活化后样品”添加适当量的盐水,且如实例7中所述测试微球数目及平均大小。使用VIALMIX<sup>®</sup>活化小瓶。

[0311] 表19. 在1mL惠顿V形小瓶中活化的PG或PG/G调配物中的脂质掺合物的微球特征<sup>a</sup>

填充重量	稀释时间	盐水稀释液 体积(mL)	微球平均直 径(微米)	微球/mL( $\times 10^9$ )
<b>55 mg 的 7.5 mg LB/mL PG</b>	活化之前	0.50	1.64	6.33
<b>88 mg 的 7.5 mg LB/mL PG</b>	活化之前	0.80	1.73	4.04
<b>177 mg 的 7.5 mg LB/mL PG</b>	活化之前	1.59	1.63	5.00
<b>122 mg 的 3.75 mg</b>	活化之前	0.43	1.57	5.28

	<b>LB/mL PG/G</b>				
	<b>392 mg 的 3.75 mg LB/mL PG/G</b>	活化之前	1.38	1.60	4.96
[0313]	<b>122 mg 的 3.75 mg LB/mL PG/G</b>	活化之后	0.43	1.78	1.06
	<b>392 mg 的 3.75 mg LB/mL PG/G</b>	活化之后	1.38	1.68	3.07

[0314] <sup>a</sup>将适当量的7.5mg LB/mL PG或3.75mg LB/mL PG/G调配物称量至1mL惠顿V形小瓶中,空气顶隙经PFP替代,对于“活化前”样品添加适当量的盐水,用韦斯特灰色丁基塞密封小瓶,用铝密封件卷边,活化,对于“活化后”样品添加适当量的盐水,且如实例7中所述测试微球数目及平均大小。使用VIALMIX<sup>®</sup>活化小瓶。

[0315] 表20. 在注射器中活化的DEFINITY<sup>®</sup>的微球浓度<sup>a</sup>

	<b>DEFINITY<sup>®</sup>的体 积(mL)</b>	<b>微球平均直径(微 米)</b>	<b>微球/mL(x 10<sup>9</sup>)</b>	
	<b>3 mL</b>	1.5	1.63	2.45
[0316]	<b>5 mL</b>	1.6	1.78	0.961
	<b>5 mL</b>	1.9	1.92	1.00
	<b>5 mL</b>	2.25	1.76	2.25
	<b>5 mL</b>	2.7	1.78	0.513

[0317] <sup>a</sup>将DEFINITY<sup>®</sup>填充(1.5mL至2.7mL)到3mL及5mL NORM-JECT<sup>®</sup>注射器(亨克-萨斯(Henke-Sass), 沃尔夫GmbH (Wolf GmbH), 德国图特林根(Tuttlingen, Germany))中。将空气顶隙用PFP替代,将注射器用Wig-L-Bug<sup>™</sup>活化,如实例7中所述测试微球数目及平均大小。

[0318] 表21. 在3mL NORM-JECT<sup>®</sup>注射器中活化的PG或PG/G调配物中的脂质掺合物的微球特征

	<b>填充重量</b>	<b>稀释时间</b>	<b>盐水稀释液 体积(mL)</b>	<b>微球平均直 径(微米)</b>	<b>微球/mL(x 10<sup>9</sup>)</b>
[0319]	<b>101 mg 的 7.5 mg LB/mL PG</b>	活化之前	0.90	1.79	4.02
	<b>177 mg 的 7.5 mg LB/mL PG</b>	活化之前	1.59	1.66	4.15

[0320]	<b>222 mg 的 7.5 mg LB/mL PG</b>	活化之前	0.78	1.72	3.63
	<b>222 mg 的 3.75 mg LB/mL PG/G</b>	活化之后	0.78	1.57	4.83

[0321] <sup>a</sup>将适当量的7.5mg LB/mL PG或3.75mg LB/mL PG/G调配物称量至3mL NORM-JECT®注射器(亨克-萨斯,沃尔夫GmbH,德国图特林根)中,对于“活化前”样品添加适当量的盐水,空气顶隙经PPF替代并活化注射器,对于“活化后”样品添加适当量的盐水,且如实例7中所述测试制剂的微球数目及平均大小。使用VIALMIX®活化注射器。

[0322] 表22.在注射器中活化的PG调配物中的脂质掺合物的微球特征,所述注射器经修改以具有两个用牙科汞齐胶囊形成的隔室<sup>a</sup>

	<b>填充重量<sup>b</sup></b>	<b>稀释时间</b>	<b>盐水稀释液 体积(mL)</b>	<b>微球平均直 径(微米)</b>	<b>微球/mL(x 10<sup>9</sup>)</b>
[0323]	<b>177 mg 的 7.5 mg LB/mL PG</b>	活化之前	1.59	1.66	4.15
	<b>391 mg 的 3.75 mg LB/mL PG/G</b>	活化之前	1.38	1.64	4.14
	<b>391 mg 的 3.75 mg LB/mL PG/G</b>	活化之后	1.38	1.59	3.92

[0324] <sup>a</sup>将5mL NORM-JECT®注射器(亨克-萨斯,沃尔夫GmbH,德国图特林根)减小至3mL。打开牙科汞齐胶囊(得自当地牙医),去除含有粉末的底部,且自顶部隔室去除柱塞以及顶部隔室的内容物。将顶部隔室装配至减小的注射器的筒中。

[0325] <sup>b</sup>将适当量的7.5mg LB/mL PG或3.75mg LB/mL PG/G调配物称量至减小到约2.5mL的5mL NORM-JECT®注射器主体中(亨克-萨斯,沃尔夫GmbH,德国图特林根),将牙科汞齐柱塞插入胶囊中,对于“活化前”样品添加适当量的盐水,空气顶隙经PPF替代,用鲁尔锁盖(luer lock cap)密封注射器,活化,对于“活化后”样品添加适当量的盐水,且如实例7中所述测试微球数目及平均大小。使用VIALMIX®活化小瓶。

[0326] 表23.在经修改以具有两个隔室的注射器中活化的PG或PG/G调配物中的脂质掺合物的微球特征<sup>a</sup>

	<b>填充重量<sup>b</sup></b>	<b>稀释时间</b>	<b>盐水稀释液 体积(mL)</b>	<b>微球平均直 径(微米)</b>	<b>微球/mL(x 10<sup>9</sup>)</b>
[0327]					

[0328]	<b>60 mg 的 7.5 mg LB/mL PG</b>	活化之前	0.54	1.83	4.74
	<b>133 mg 的 3.75 mg LB/mL PG/G</b>	活化之前	0.47	1.72	4.42
	<b>133 mg 的 3.75 mg LB/mL PG/G</b>	活化之后	0.47	1.89	1.40

[0329] <sup>a</sup> 3mL NORM-JECT®注射器(亨克-萨斯, 沃尔夫GmbH, 德国图特林根)经修改以具有约3mm×10mm×1mm膨出部作为市售二隔室注射器的典型旁路通道。所述通道是通过加热镊子的一个钳并在约2mL体积标志处将其压至注射器筒的内部来制备。将注射器柱塞末端截断到约1cm长度并用作旁路插塞。也减小第二注射器柱塞。

[0330] <sup>b</sup>将适当量的7.5mg LB/mL PG或3.75mg LB/mL PG/G调配物称量至经修改3mL NORM-JECT®注射器的主体中低于旁路通道处,将旁路插塞插入刚刚高于旁路通道的点,将适当量的盐水添加至在插入旁路插塞后形成的顶部室中,插入减小注射器柱塞,完成上部室的填充。将下部室中的空气顶隙用PFP替代,用鲁尔锁盖密封注射器。使用VIALMIX®活化注射器,推动注射器柱塞以将旁路插塞移动至旁路通道中,容许盐水进入含有“活化后”样品的活化产物的下部室中。对于“活化前”样品,推动注射器柱塞以将旁路插塞移动至旁路通道中,容许盐水进入下部室中,使用VIALMIX®活化注射器。如实例7中所述测试样品的微球数目及平均大小。

[0331] 表24. 在二隔室塑料管中活化的脂质掺合物PG或PG/G调配物的微球特征

填充重量 <sup>a</sup>	稀释时间	盐水稀释液	微球平均直	微球/mL(x 10 <sup>9</sup> )
		体积(mL)	径(微米)	
<b>177 mg 的 7.5 mg LB/mL PG</b>	活化之前	1.59	1.64	3.11
<b>392 mg 的 3.75 mg LB/mL PG/G</b>	活化之前	1.38	1.80	2.62
<b>392 mg 的 3.75 mg LB/mL PG/G</b>	活化之后	1.38	1.63	3.72

[0333] <sup>a</sup>将适当量的7.5mg LB/mL PG或3.75mg LB/mL PG 7G调配物称量至二隔室管(NEOPAC Fleximed管, 13.5×80mm, 霍夫曼内奥派克AG (Hoffmann Neopac AG), 瑞士上迪斯巴赫(Oberdiessbach, Switzerland))的下部室中,将适当量的盐水添加至顶部室中,将下部室中的空气顶隙用PFP替代,用鲁尔锁盖密封该管。对于“活化后”样品,使用VIALMIX®活化所述管,将上部隔室盐水转移到下部隔室并混合。对于“活化前”样品,将盐水转移到下部隔室,之后使用VIALMIX®使管活化。如实例7中所述测试样品的微球数目及平均大小。

[0334] 所述研究展示,用机械振荡器振荡脂质掺合物PG及PG/G调配物的工艺可在包括小瓶、注射器及塑料管在内的多种容器中实现,并产生具有等效于活化DEFINITY®的特征的

微球。令人惊讶的是,机械振荡克服了容器尺寸及用于容器制造材料的差异且容许形成具有欲形成的等效大小及数目的微球。注射器中PG及PG/G中的LB调配物在添加稀释剂之前及之后的活化均是令人激动的发现。另外,能自调配物分离稀释剂且然后在通过机械振荡活化之前或之后容许两种组份混合到一起证实了提供可以容易产物生产实现室温稳定调配物的制剂的新机会。

[0335] 实例12. 活化方法

[0336] 实施研究以展示用若干种并非使用VIALMIX<sup>®</sup>的方法活化DEFINITY<sup>®</sup>的能力。这些方法阐述于下文中,结果报告于表25中。

[0337] A. 将DEFINITY<sup>®</sup> (1.5mL) 抽吸至3ml塑料注射器中并连接至三通活塞。用PFP气体填充相同大小的单独注射器中并连接至活塞上的另一端口。通过来回交替推压每一注射器上的柱塞介于50-400次之间来混合DEFINITY<sup>®</sup>及PFP气体。微气泡计数及气泡直径测量指示DEFINITY<sup>®</sup>的活化。

[0338] B. 将DEFINITY<sup>®</sup> (3.0mL) 抽吸至10ml塑料注射器中并连接至三通活塞。用PFP气体填充相同大小的单独注射器中并连接至活塞上的另一端口。通过来回交替推压每一注射器上的柱塞200次来混合DEFINITY<sup>®</sup>及PFP气体。微气泡计数及气泡直径测量指示DEFINITY<sup>®</sup>的活化。

[0339] C. 将脂质调配物 (1.5mL的0.045mg/mL DPPA、0.75mg/mL DPPC、0mg/mL MPEG5000DPPE、4.87mg NaCl/mL、103.5mg/mL丙二醇、126.2mg/mL甘油、2.34mg/mL NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O、2.16mg/mL NaHPO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O) 抽吸至3ml塑料注射器中并连接至三通活塞。用PFP气体填充相同大小的单独注射器中并连接至活塞上的另一端口。通过来回交替推压每一注射器上的柱塞100次来混合调配物及PFP气体。微气泡计数及气泡直径测量指示此脂质调配物的活化。

[0340] D. 将改质的脂质调配物 (1.5mL的0.045mg/mL DPPA、0.75mg/mL DPPC、0mg/mL MPEG5000DPPE、4.87mg/mL NaCl、103.5mg/mL丙二醇、126.2mg/mL甘油、2.34mg/mL NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O、2.16mg/mL NaHPO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O) 抽吸至3ml塑料注射器中并连接至三通活塞。用PFP气体填充相同大小的单独注射器中并连接至活塞上的另一端口。在脂质调配物填充的注射器与活塞之间是填充有7个高效X-网格静态混合器 (StaMixCo, GXP-9, 4-PA66, 黑色) 的塑料管。通过来回交替推压每一注射器上的柱塞50次来混合调配物及PFP气体。微气泡计数及气泡直径测量指示此脂质调配物的活化。

[0341] E. 将改质的脂质调配物 (1.5mL的0.045mg/mL DPPA、0.75mg/mL DPPC、0mg/mL MPEG5000DPPE、4.87mg/mL NaCl、103.5mg/mL丙二醇、126.2mg/mL甘油、2.34mg/mL NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O、2.16mg/mL NaHPO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O) 抽吸至3ml塑胶注射器中并连接至两个串联三通活塞。用PFP气体填充相同大小的单独注射器中并连接至活塞上的另一端口。通过来回交替推压每一注射器上的柱塞100次来混合调配物及PFP气体。微气泡计数及气泡直径测量指示此脂质调配物的活化。

[0342] F. 将改质的脂质调配物 (1.5mL的0.045mg/mL DPPA、0.75mg/mL DPPC、0mg/mL MPEG5000DPPE、4.87mg/mL NaCl、103.5mg/mL丙二醇、126.2mg/mL甘油、2.34mg/mL NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O、2.16mg/mL NaHPO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O) 抽吸至3ml塑料注射器中并连接至三通活塞。用PFP气体填充相同大小的单独注射器中并连接至活塞上的另一端口。在脂质调配物填充的注射器与

活塞之间是填充有8个高效X-网格静态混合器 (StaMixCo, GXF-10-2-ME, 橙色) 的塑料管。通过来回交替推压每一注射器上的柱塞100次来混合调配物及PFP气体。微气泡计数及气泡直径测量指示此脂质调配物的活化。

[0343] G. 将改质的脂质调配物 (1.5mL的0.045mg/mL DPPA、0.401mg/mL DPPC、0.304mg/mL MPEG5000DPPE、4.87mg/mL NaCl、155.25mg/mL 丙二醇、31.55mg/mL 甘油、2.34mg/mL  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 、2.16mg/mL  $\text{NaHPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 抽吸至3ml塑料注射器中并连接至三通活塞。用PFP气体填充相同大小的单独注射器中并连接至活塞上的另一端口。通过来回交替推压每一注射器上的柱塞100次来混合调配物及PFP气体。微气泡计数及气泡直径测量指示此脂质调配物的活化。

[0344] H. 将DEFINITY<sup>®</sup> (1.5mL) 加3.5mL盐水抽吸至5ml塑料注射器中并连接至三通活塞。用PFP气体填充相同大小的单独注射器中并连接至活塞上的另一端口。通过来回交替推压每一注射器上的柱塞100次来混合DEFINITY<sup>®</sup>、盐水及PFP气体。微气泡计数及气泡直径测量指示DEFINITY<sup>®</sup>的活化。

[0345] I. 将DEFINITY<sup>®</sup> (1.5mL) 抽吸至3ml塑料注射器中并连接至三通活塞。用PFP气体填充相同大小的单独注射器中并连接至活塞上的另一端口。在DEFINITY<sup>®</sup>填充的注射器与活塞之间是具有塑料螺旋混合器 (StaMixCo, 2.5" x 3/16", 在2.5英寸中15个螺旋圈) 的塑料管。通过来回交替推压每一注射器上的柱塞50次来混合DEFINITY<sup>®</sup>及PFP气体。微气泡计数及气泡直径测量指示DEFINITY<sup>®</sup>的活化。

[0346] J. 将DEFINITY<sup>®</sup> (3.0mL) 抽吸至10ml塑料注射器中并连接至三通活塞。用PFP气体填充相同大小的单独注射器中并连接至活塞上的另一端口。在DEFINITY<sup>®</sup>填充的注射器与活塞之间是具有塑料螺旋混合器 (StaMixCo, 2.5" x 3/16", 在2.5英寸中15个螺旋圈) 的塑料管。通过来回交替推压每一注射器上的柱塞50次来混合DEFINITY<sup>®</sup>及PFP气体。微气泡计数及气泡直径测量指示DEFINITY<sup>®</sup>的活化。

[0347] K. 将DEFINITY<sup>®</sup> (1.5mL) 抽吸至3ml塑料注射器中并直接连接至具有塑料螺旋混合器 (StaMixCo, 2.5" x 3/16", 在2.5英寸中15个螺旋圈) 的塑料管。用PFP气体填充相同大小的单独注射器并连接至塑料管的另一端。通过来回交替推压每一注射器上的柱塞25次来混合DEFINITY<sup>®</sup>及PFP气体。微气泡计数及气泡直径测量指示DEFINITY<sup>®</sup>的活化。

[0348] L. 将DEFINITY<sup>®</sup> (1.5mL) 抽吸至3ml塑料注射器中并直接连接至20u QMA过滤器 (沃特斯 (Waters))。用PFP气体填充相同大小的单独注射器并连接至过滤器的另一端。通过来回交替推压每一注射器上的柱塞50次来混合DEFINITY<sup>®</sup>及PFP气体。微气泡计数及气泡直径测量指示DEFINITY<sup>®</sup>的活化。

[0349] M. 将DEFINITY<sup>®</sup> (1.5mL) 抽吸至3ml塑料注射器中并直接连接至20u QMA过滤器 (沃特斯) 及具有塑料螺旋混合器 (StaMixCo, 2.5" x 3/16", 在2.5英寸中15个螺旋圈) 的塑料管。用PFP气体填充相同大小的单独注射器并连接至混合器的另一端。通过来回交替推压每一注射器上的柱塞50次来混合DEFINITY<sup>®</sup>及PFP气体。微气泡计数及气泡直径测量指示DEFINITY<sup>®</sup>的活化。

[0350] N. 将DEFINITY<sup>®</sup> (0.6mL) 抽吸至1ml玻璃注射器并连接至含有5u过滤器的1.5英寸金属支架。用PFP气体填充相同大小的单独玻璃注射器并连接至金属支架的另一端。此挤

出装置可自市场购得 (LiposoFast-Basic, 奥维斯汀公司 (Avestin, Inc.))。通过来回交替推压每一注射器上的柱塞25次来混合DEFINITY<sup>®</sup>及PFP气体。微气泡计数及气泡直径测量指示DEFINITY<sup>®</sup>的活化。

[0351] O. 将DEFINITY<sup>®</sup> (0.6mL) 抽吸至1ml玻璃注射器并连接至含有5u过滤器的1.5英寸金属支架。用PFP气体填充相同大小的单独玻璃注射器并连接至金属支架的另一端。此挤出装置可自市场购得 (LiposoFast-Basic, 奥维斯汀公司)。通过来回交替推压每一注射器上的柱塞100次来混合DEFINITY<sup>®</sup>及PFP气体。微气泡计数及气泡直径测量指示DEFINITY<sup>®</sup>的活化。

[0352] P. 将DEFINITY<sup>®</sup> (0.6mL) 抽吸至1ml玻璃注射器并连接至含有0.4或1.0微米过滤器的1.5英寸金属支架。用PFP气体填充相同大小的单独玻璃注射器并连接至金属支架的另一端。此挤出装置可自市场购得 (LiposoFast-Basic, 奥维斯汀公司)。通过来回交替推压每一注射器上的柱塞25次来混合DEFINITY<sup>®</sup>及PFP气体。微气泡计数及气泡直径测量指示DEFINITY<sup>®</sup>的活化。

[0353] Q. 将DEFINITY<sup>®</sup>的小瓶 (1.5mL) 在最高设定下涡旋5分钟。微气泡计数及气泡直径测量指示DEFINITY<sup>®</sup>的活化。

[0354] R. 将DEFINITY<sup>®</sup>的小瓶 (1.5mL) 超声波处理2分钟。溶液为乳白色, 但未测试微气泡计数或气泡直径测量。

[0355] S. 用高速桨式匀浆器将DEFINITY<sup>®</sup>的小瓶 (1.5mL) 处理5分钟。溶液为乳白色, 但未测试微气泡计数或气泡直径测量。

[0356] T. 将DEFINITY<sup>®</sup>的小瓶 (1.5mL) 固定在0.75” x 2.25” x 23”木棍的末端上, 在两个相距15”的木柱之间以100次击打/27秒的速率移动300次与1500次之间, 并测试微气泡计数或气泡直径量测。微气泡计数及气泡直径测量指示DEFINITY<sup>®</sup>的活化。

[0357] 表25. 使用希森美康微气泡分析仪的微气泡计数及直径的结果。

[0358]

实例	注射器筒来回推压次数 (实例“T”为击打次数)	微气泡数 ( $\times 10^9$ )/ml	微气泡直径 (微米)
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

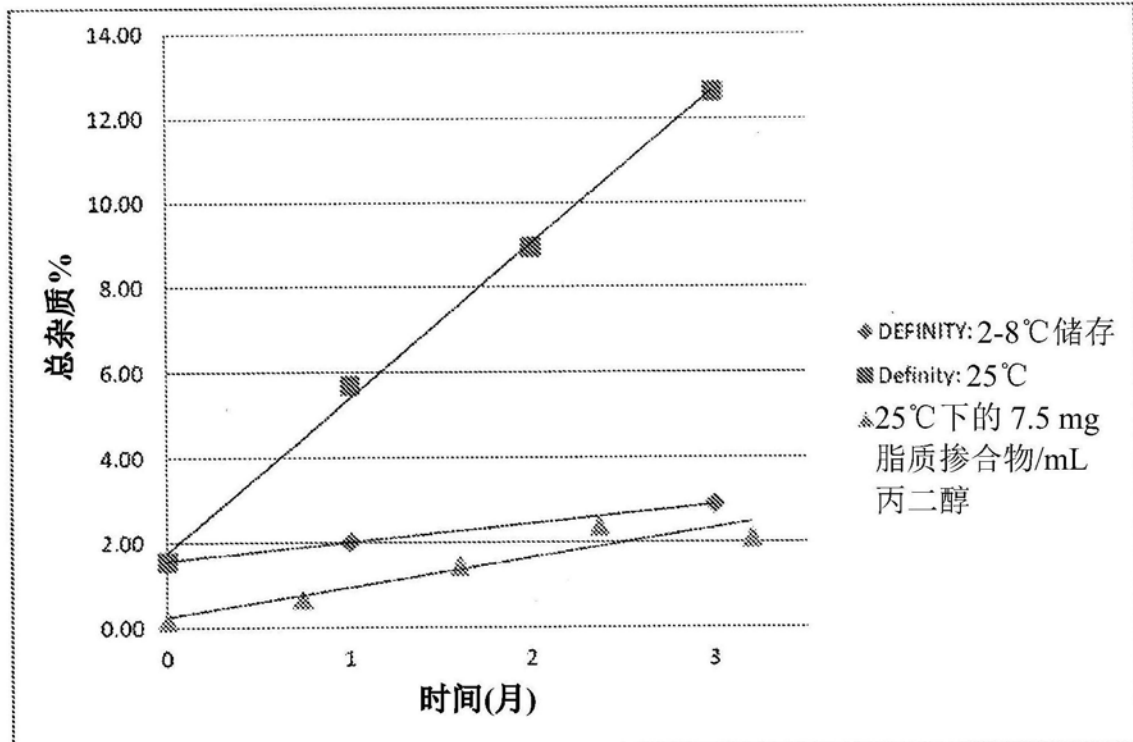
[0359]

K	25	0.14	2.0
L	50	0.07	2.1
M	50	0.11	2.1
N	25	0.10	1.7
O	100	0.57	1.3
P	0.4 u 和 1.0u 过滤器 25	0.01 和 0.12	3.6 和 1.9
Q	涡旋 5 min	0.13	2.1
R	超声波处理 2 min	未基于视觉测试-淡 乳白色	未基于视觉测试-淡 乳白色
S	宝创(Polytron) 5 min	未基于视觉测试-淡 乳白色	未基于视觉测试-淡 乳白色
T	以 100 次击打/27 秒 的速率移动 300 次与 1500 次之间		
	300x	0.056	1.86
	500x	0.096	1.93
	1000x	0.205	1.90
	1500x	0.194	1.74

[0360] 这些研究展示DEFINITY<sup>®</sup>或其修改形式的活化可使用多种活化装置来完成。

[0361] 本文所列举的参考文献(包括专利及专利申请案)其全文以引用方式并入本文中。

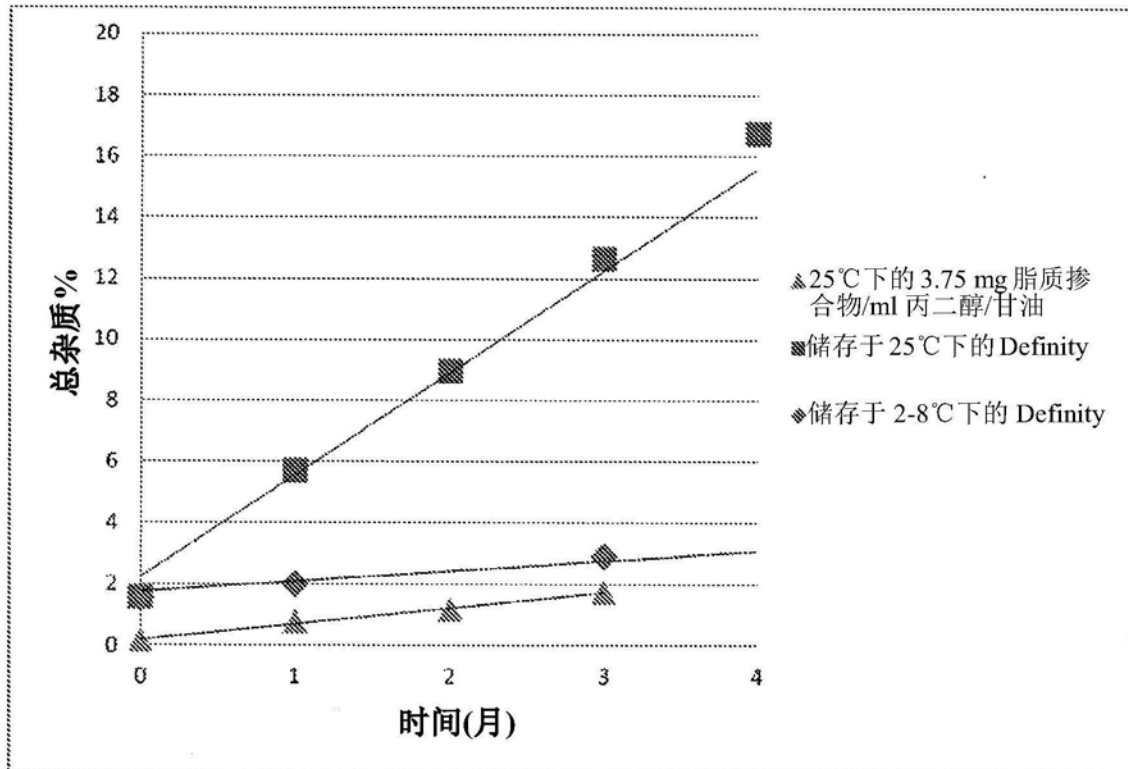
脂质掺合物/丙二醇\*调配物对 DEFINITY® 的稳定性



\*177 mg 含有脂质掺合物的丙二醇(0.72 wt%脂质掺合物; 脂质掺合物:丙二醇的比率为 1:138)。

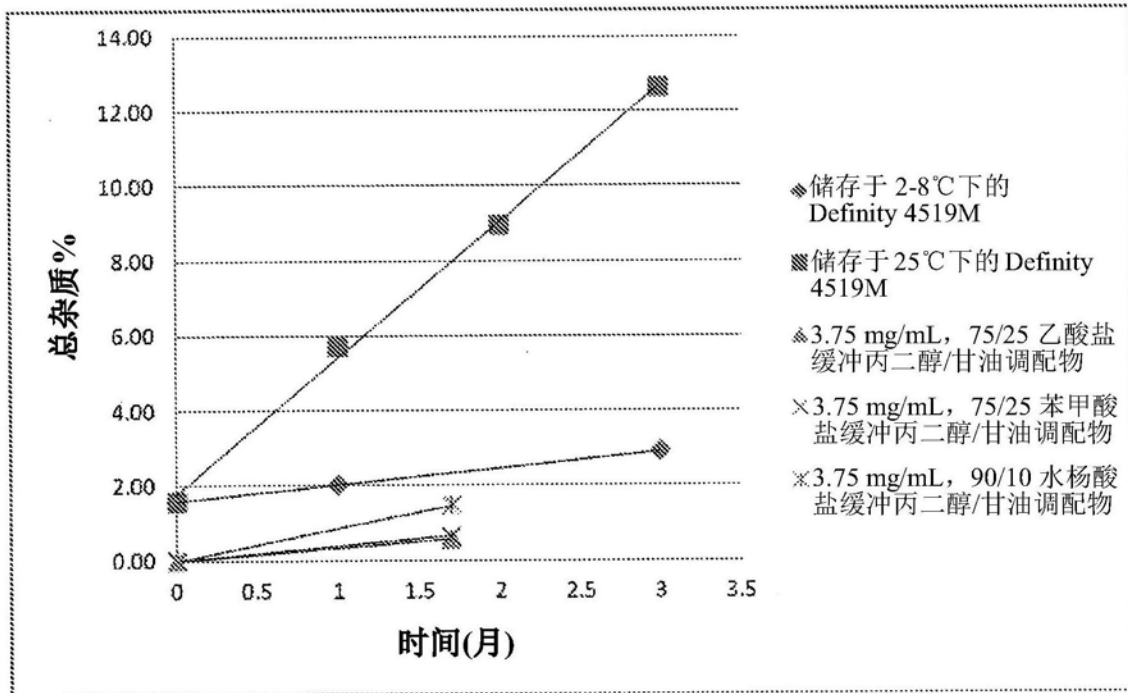
图1

## 3.75 mg 脂质掺合物/mL 丙二醇/甘油调配物\*对 DEFINITY® 的稳定性



\*391 mg 含有脂质掺合物的丙二醇/甘油(0.33 wt%脂质掺合物:44.9 wt%丙二醇:54.8 wt%甘油; 脂质掺合物:丙二醇:甘油的比率为 1:138:168)。

图2

**3.75 mg 脂质掺合物/mL 缓冲丙二醇/甘油调配物\*对 DEFINITY® 的稳定性:**

\* 391 mg 含有脂质掺合物的丙二醇/甘油中的 5 mM 缓冲液(0.33 wt%脂质掺合物; 44.9 wt% 丙二醇; 54.8 wt%甘油; 脂质掺合物:丙二醇:甘油的比率为 1:138:168)。比率代表乙酸钠对乙酸、苯甲酸钠对苯甲酸、水杨酸钠对水杨酸。

图3