

Даний винахід стосується, загалом, способів приготування ліпідної суміші та однорідної фільтрівної фосфоліпідної суспензії, що містить дану ліпідну суміш, така суспензія корисна як ультразвуковий контрастуючий агент.

Технічне обґрунтування

Виробництво фосфоліпідного контрастуючого агента може бути поділено на наступні стадії: (1) приготування ліпідної суміші; (2) складання основної маси розчину, що включає гідратацію та диспергування даної ліпідної суміші у присутті водному середовищі для утворення ліпідної суспензії; (3) фільтрацію даної маси розчину через стерилізаційний фільтр (и) для очищення даної суспензії від мікробних забруднювачів; (4) розлив даної стерильної суспензії в окремі пляшечки у контролюємій асептичній зоні; (5) завантаження даних пляшечок у ліофілізатор для заміни залишкового газу в пляшечках на перфторопропан (ПФП); (6) перенесення загерметизованих пляшечок після газообміну в автоклав для термічної стерилізації. У розглянутому процесі є три основні перешкоди: (1) однорідність ліпідної суміші; (2) гідратація ліпідної суміші; (3) однорідність та розмір частинок даної суспензії; та (4) стерильне фільтрування суспензії через стерилізаційний фільтр (и).

Фосфоліпідні суміші звичайно одержують шляхом розчинення або суспендування потрібних ліпідів у відповідній системі водного або неводного розчинника з наступним зменшенням об'єму шляхом ліофілізації або дистиляції. В ідеальному випадку цей процес дає змішані тверді речовини з високим ступенем однорідності та чистоти. Проте, хоча зазначений простий підхід забезпечує добрі результати у невеликому лабораторному масштабі, він часто є проблематичним при переході до одержання даного продукту у виробничому масштабі. Вузькими місцями є: (1) підтримання однорідності вмісту на стадії вилучення розчинника (що зумовлено відмінностями у розчинностях); (2) підтримання чистоти (часто ця проблема виникає при використанні води, що зумовлено побічними гідролітичними реакціями); (3) підвищення чистоти; (4) мінімізація об'єму розчинника; та (5) дістання кінцевого твердого продукту (наприклад, зіскрібання продукту із великого реактора не є доброю практикою).

Після приготування ліпідної суміші кінцеве компаундування звичайно включає введення даної суміші у водне середовище. Оскільки фосфоліпіди є гідрофобними і слабо розчиняються у воді, додавання фосфоліпідів або ліпідної суміші безпосередньо у водний розчин зумовлює агрегацію ліпідного порошка з утворенням грудок, котрі дуже важко диспергувати. Таким чином, процес гідратації не піддається контролю протягом значного часу. Безпосередня гідратація фосфоліпідів або ліпідної суміші у водному середовищі призводить до утворення каламутної суспензії, розмір частинок якої варіює від 0,6 до 100мкм. Через відносно широке розподілення частинок за розмірами дану суспензію неможливо відфільтрувати при температурі оточуючого середовища, коли температура розчину суспензії є нижче температури фазового переходу гелі-рідкокристалічна фаза даних ліпідів. Дані ліпіди будуть накопичуватись на фільтрах, що зумовить обмеження швидкості потоку, і у більшості випадків через деякий час фільтри цілком заблокуються. Подальше зменшення розміру частинок суспензії за допомогою відомого періодичного процесу дозування буде неможливим навіть після довгого перемішування (наприклад, протягом 6 годин) при підвищених температурах (наприклад, при 40-80°C) з використанням звичайно застосовуємої пропелерної мішалки.

Хоча можлива фільтрація при підвищених температурах, тобто при температурах вище температури фазового переходу ліпідів, при застосуванні нормального тиску фільтрування значна частина більших за розміром ліпідних частинок буде виключена. У свою чергу, стерильний фільтрат буде мати відмінний від порції до порції вміст ліпідів, у залежності від ступеня первинної гідратації даних ліпідів, що в свою чергу визначається фізичними характеристиками, наприклад, морфологією вихідних матеріалів.

Процеси безпосередньої гідратації ліпідів або ліпідної суміші для одержання однорідної суспензії та фільтрації даної суспензії через стерилізаційний фільтр (и) можуть виявитись утрудненими та економічно невідповідними при переході до комерційних обсягів виробництва, наприклад, принаймні до > 20л.

Таким чином, способи виробництва ліпідної суміші та фосфоліпідної суспензії, згідно з даною заявкою, мають на меті вирішити зазначені вище проблеми шляхом запровадження практичного способу, котрий може бути легко адаптованим до різних обсягів виробництва та різних виробничих засобів без значного модифікування або пристосування існуючого устаткування.

Відповідно, предметом даного винаходу є запровадження нового способу для приготування ліпідної суміші.

Іншим предметом даного винаходу є запровадження нового способу для приготування фосфоліпідної суспензії із даної ліпідної суміші.

Зазначені та інші предмети даного винаходу, що стануть зрозумілими із подальшого детального опису, базуються на відкритті авторів, що розчинення ліпідної суміші у прийнятному неводному розчиннику до введення водного розчину дає можливість одержувати фосфоліпідну суспензію.

[1] Таким чином, у першому варіанті даний винахід запроваджує новий спосіб для приготування фосфоліпідної суспензії, що включає:

(1) контактування ліпідної суміші з неводним розчинником, внаслідок чого дана ліпідна суміш у значній мірі розчиняється у даному неводному розчиннику; та

(2) контактування розчину зі стадії (1) з водним розчином з одержанням ліпідної суспензії.

[2] У варіанті, якому віддається перевага, неводний розчинник вибирається із проіленгліколю, етиленгліколю та поліетиленгліколю 300.

[3] У варіанті, якому віддається більша перевага, неводним розчинником є пропіленгліколь.

[4] У іншому варіанті, якому віддається перевага, дана ліпідна суміш включає:

(a) 1,2-дипальмітоїл-sn-гліцери-3-фосфатиділхолін;

(b) 1,2-дипальмітоїл-sn-гліцери-3-фосфотидинову кислоту, моноватрієву сіль; та

(c) N-(метоксиполіетиленгліколь 5000 карбаміол) -1,2 - дипальмітоїл-sn-гліцери-3-фосфатидилетаноламін, моноватрієву сіль.

[5] У іншому варіанті, якому віддається перевага, на стадії (1), даний неводний розчинник перед

контактуванням із ліпідною сумішшю нагрівають до температури приблизно 30-70°C.

[6] У іншому варіанті, якому віддається більша перевага, даний неводний розчинник перед контактуванням із ліпідною сумішшю нагрівають до температури приблизно 50-55°C.

[7] У іншому варіанті, якому віддається перевага, співвідношення ліпідної суміші та неводного розчинника складає від приблизно 5мг ліпідної суміші на мл неводного розчинника до приблизно 15мг/мл.

[8] У іншому варіанті, якому віддається більша перевага, співвідношення ліпідної суміші та неводного розчинника складає приблизно 10мг/мл.

[9] У іншому варіанті, якому віддається перевага, на стадії (2), водний розчин вибирається із води, сольового розчину, суміші сольовий розчин/гліцерин, та суміші сольовий розчин/гліцерин/неводний розчинник.

[10] У іншому варіанті, якому віддається більша перевага, водний розчин являє собою суміш сольового розчину та гліцерину.

[11] У іншому варіанті, якому віддається більша перевага, водний розчин являє собою суміш сольового розчину, гліцерину та пропіленгліколю.

[12] У іншому варіанті, якому віддається більша перевага, у розчині присутні 6,8мг/мл хлориду натрію, 0,1мл/мл гліцерину, 0,1мл/мл пропіленгліколю та приблизно від 0,75 до 1,0мг/мл ліпідної суміші.

[13] У варіанті, якому віддається навіть більша перевага, у даному розчині присутня ліпідна суміш у кількості 0,75мг/мл.

[14] У іншому варіанті, якому віддається більша перевага, у даному розчині присутня ліпідна суміш у кількості 1,0мг/мл.

[15] У іншому варіанті, якому віддається перевага, на стадії (2), водний розчин нагрівають до температури від приблизно 45 до 60°C перед контактуванням з розчином зі стадії (1).

[16] У іншому варіанті, якому віддається більша перевага, водний розчин нагрівають до температури від приблизно 50 до 55°C перед контактуванням з розчином зі стадії (1).

[17] У іншому варіанті, якому віддається перевага, даний спосіб додатково включає:

(3) нагрівання ліпідної суспензії зі стадії (2) до температури, що приблизно дорівнює або перевищує найвищу температуру переходу гелю - рідкокристалічна фаза ліпідів, котрі присутні у даній суспензії.

[18] У іншому варіанті, якому віддається більша перевага, на стадії (3), ліпідна суспензія нагрівається до температури принаймні приблизно 67°C.

[19] У іншому варіанті, якому віддається більша перевага, даний спосіб додатково включає:

(4) фільтрування даної ліпідної суспензії через стерилізаційний фільтр.

[20] У іншому варіанті, якому віддається навіть більша перевага, на стадії (4), фільтрування виконується з використанням двох картриджей стерилізаційного фільтра.

[21] У варіанті, якому віддається додаткова перевага, на стадії (4), картриджі стерилізаційного фільтра мають температуру від приблизно 70 до 80°C.

[22] У іншому варіанті, якому віддається додаткова перевага, на стадії (4), застосовуються 0,2мкм гідрофільні фільтри.

[23] У іншому варіанті, якому віддається навіть більша перевага, даний спосіб додатково включає:

(5) розлив відфільтрованого розчину зі стадії (4) у пляшечки.

[24] У іншому варіанті, якому віддається додаткова перевага, даний спосіб додатково включає:

(6) обмін залишкового газу у пляшечці зі стадії (5) на перфторовуглеводневий газ.

[25] У іншому варіанті, якому віддається навіть більша додаткова перевага, перфторовуглеводневий газ являє собою перфторопропан.

[26] У іншому варіанті, якому віддається навіть більша додаткова перевага, обмін залишкового газу проводиться з використанням ліофілізатора.

[27] У іншому варіанті, якому віддається навіть більша додаткова перевага, даний спосіб додатково включає:

(7) стерилізацію пляшечки зі стадії (6).

[28] У варіанті, якому віддається ще більша додаткова перевага, на стадії (7), пляшечку стерилізують приблизно при 126-130°C протягом 1-10 хвилин.

[29] У другому варіанті даний винахід запроваджує новий спосіб для приготування ліпідної суміші, що включає:

(a) контактування принаймні двох ліпідів з першим неводним розчинником;

(b) концентрування даного розчину до стану густого геля;

(c) контактування даного густого геля з другим неводним розчинником; та

(d) збирання утвореної в результаті твердої речовини.

[30] У варіанті, якому віддається перевага, на стадії (a), дані ліпіди являють собою:

(i) 1,2-дипальмітоїл-sn-гліцеро-3-фосфатиділхолін;

(ii) 1,2-дипальмітоїл-sn-гліцеро-3-фосфотидинову кислоту, моноватрієву сіль; та

(iii) N-(метоксиполіетиленгліколь 5000 карбамоїл)-1,2-дипальмітоїл-sn-гліцеро-3-фосфатидилетаноламін, моноватрієву сіль.

[31] У іншому варіанті, якому віддається перевага, на стадії (a), перший неводний розчинник являє собою суміш метанолу та толуолу.

[32] У іншому варіанті, якому віддається перевага, на стадії (c), другий неводний розчинник являє собою метил t-бутиловий ефір.

[33] У іншому варіанті, якому віддається перевага, на стадії (a), даний розчин нагрівають до температури, що достатня для повного розчинення даних ліпідів у даному розчиннику.

[34] У іншому варіанті, якому віддається більша перевага, на стадії (a), даний розчин нагрівають до температури приблизно від 25 до 75°C.

[35] У іншому варіанті, якому віддається перевага, на стадії (d), зібрану тверду речовину промивають метил t-бутиловим ефіром та висушують у вакуумі.

[36] У третьому варіанті даний винахід запроваджує нову фосфоліпідну суспензію, що включає:

- (a) ліпідну суміш у кількості приблизно 0,75-1,0мг/мл суспензії;
- (b) хлорид натрію у кількості приблизно 6,8мг/мл суспензії;
- (c) гліцерин у кількості приблизно 0,1мл/мл суспензії;
- (d) пропіленгліколь у кількості приблизно 0,1мл/мл суспензії; та
- (e) воду;

де дану суспензію одержують за способом, що включає:

- (1) контактування ліпідної суміші з неводним розчинником, внаслідок чого дана ліпідна суміш у значній мірі розчиняється у даному неводному розчиннику;
- (2) контактування розчину зі стадії (1) з водним розчином з одержанням ліпідної суспензії;
- (3) нагрівання ліпідної суспензії зі стадії (2) до температури, що приблизно дорівнює або перевищує найвищу температуру переходу гель - рідкокристалічна фаза ліпідів, котрі присутні у даній суспензії; та
- (4) фільтрування даної ліпідної суспензії через стерилізаційний фільтр.

[37] У іншому варіанті, якому віддається перевага, дана ліпідна суміш включає:

- (a) 1,2-дипальмітоїл-sn-гліцери-3-фосфатиділхолін;
- (b) 1,2-дипальмітоїл-sn-гліцери-3-фосфотидинову кислоту, мононатрієву сіль; та
- (c) N-(метоксиполіетиленгліколь 5000 карбамоїл) -1,2 - дипальмітоїл-sn-гліцери-3-фосфатидилетаноламін, мононатрієву сіль.

[38] У іншому варіанті, якому віддається більша перевага, неводний розчинник нагрівають до температури приблизно 50-55°C перед контактуванням з даною ліпідною сумішшю.

[39] У іншому варіанті, якому віддається більша перевага, співвідношення ліпідної суміші та неводного розчинника складає приблизно 10мг/мл.

[40] У іншому варіанті, якому віддається більша перевага, даний водний розчин являє собою суміш сольового розчину, гліцерину та поліпропіленгліколю.

[41] У варіанті, якому віддається навіть більша перевага, у даному розчині присутня ліпідна суміш у кількості 0,75мг/мл.

[42] У іншому варіанті, якому віддається більша перевага, даний водний розчин нагрівають до температури приблизно 50-55°C перед контактуванням з розчином зі стадії (1).

[43] У іншому варіанті, якому віддається більша перевага, на стадії (3), дану ліпідну суспензію нагрівають до температури принаймні приблизно 67°C.

[44] У іншому варіанті, якому віддається додаткова перевага, на стадії (4), застосовують два 0,2мкм гідрофільні фільтри.

Складання композицій

Даний винахід, призначений для практичного застосування в обсягах принаймні декількох грамів, кілограму, декількох кілограмів або на промисловому рівні. Обсяг на рівні декількох грамів, як прийнято у даному тексті, стосується переважно таких кількостей, коли принаймні один із вихідних матеріалів присутній у кількості 10г або більше, краще, принаймні 50г або більше, ще краще, принаймні 100г або більше. Обсяг на рівні декількох кілограмів, як прийнято у даному тексті, стосується таких кількостей, коли використовується більше одного кілограма принаймні одного із вихідних матеріалів. Під промисловим рівнем у даному тексті мається на думці такий обсяг, який перевищує лабораторний і є достатнім для постачання продукту для клінічних випробувань або розподілу серед споживачів.

Ліпідна суміш або фосфоліпідна суміш, репрезентує два або більше ліпідів, котрі були змішані. Ліпідна суміш є, загалом, у порошковатій формі. Краще, коли принаймні один із ліпідів являє собою фосфоліпід. Краще, коли дана ліпідна суміш містить 1,2-дипальмітоїл-sn-гліцери-3-фосфатиділхолін (DPPC), 1,2-дипальмітоїл-sn-гліцери-3-фосфотидинову кислоту, мононатрієву сіль (DPPA), та N-(метоксиполіетиленгліколь 5000 карбамоїл)-1,2-дипальмітоїл-sn-гліцери-3-фосфатидилетаноламін, мононатрієву сіль (MPEG5000-DPPE). Кількість кожного ліпиду, що присутній у даній суміші, буде залежати від погрібного кінцевого продукту. Співвідношення кожного з ліпідів, яким віддається перевага, наведені у розділі Приклади. У даному способі може бути використаний широкий різновид інших ліпідів, таких, що описані у патенті Унгера (Unger) та інших, патент США №5469854, на який у даному тексті робиться посилання.

Фосфоліпід у даному контексті являє собою жирну речовину, що містить масляний (гідрофобний) вуглеводневий ланцюг (и) з полярною (гідрофільною) фосфорною головною групою. Фосфоліпіди є амфіфільними. Вони спонтанно утворюють границі та замкнуті везикули у водному середовищі. Фосфоліпіди складають приблизно 50% маси плазматичної мембрани тваринних клітин.

Приготування ліпідної суміші

Ліпідна суміш може бути одержана з використанням способу "водна суспензія - ліофілізація" або способу "розчинення в органічному розчиннику - осадження". У першому способі потрібні ліпіди суспендують у воді при підвищеній температурі і потім концентрують методом ліофілізації. Переважно застосовують спосіб розчинення в органічних розчинниках.

Стадія (a):

Спосіб "розчинення в органічному розчиннику - осадження" включає контактування потрібних ліпідів (наприклад, DPPA, DPPC та MPEG5000 DPPE) з першого системою неводного розчинника. Ця система звичайно являє собою комбінацію розчинників, наприклад, CHCl₃/MeOH, CH₂Cl₂/MeOH та толуол/MeOH. Краще, коли перший неводний розчинник є сумішшю толуолу та метанолу. Для досягнення повного розчинення може виникнути потреба у нагріванні ліпідного розчину до необхідної температури. Краще, коли така температура дорівнює приблизно від 25 до 75°C, ще краще, коли вона знаходиться у межах 35-65°C.

Після розчинення може виникнути потреба у вилученні сторонніх речовин методом гарячого фільтрування або охолодження до кімнатної температури з наступним фільтруванням. Можуть застосовуватись відомі методи фільтрації (наприклад, гравітаційне фільтрування, фільтрування під вакуумом або під тиском).

Стадія (b):

Потім даний розчин концентрують до стану густий гель/напівтверда речовина. Краще, коли концентрування здійснюють методом вакуумної дистиляції. Можуть застосовуватись також інші методи концентрування розчину, наприклад, такий метод як ротаційне випарювання. Краще, коли температура на даній стадії дорівнює приблизно 20-60°C, ще краще, 30-50°C.

Стадія (с):

Потім даний густий гель/напівтверду речовину диспергують у другому неводному розчиннику. Дану суміш суспендують, краще при температурі навколишнього середовища (наприклад, 15-30°C). Прийнятними другими розчинниками є такі, що спричиняють осадження ліпідів із відфільтрованого розчину. Краще, коли другим неводним розчинником є метил t-бутиловий ефір (МТВЕ). Можуть застосовуватись також й інші ефіри та спирти.

Стадія (d):

Тверді речовини, одержані після додавання другого неводного розчинника, потім збирають. Краще, коли зібрані тверді речовини промивають іншою порцією другого неводного розчинника (наприклад, МТВЕ). Збирання може здійснюватись шляхом вакуумної фільтрації або центрифугування, краще при температурі оточуючого середовища. Бажано, щоб після збирання дані тверді речовини висушувались під вакуумом при температурі приблизно 20-60°C.

Через ряд зазначених нижче причин перевага віддається способу "розчинення в органічному розчиннику - осадження" (відносно способу "водна суспензія/ліофілізація"):

(1) Через добру розчинність даних ліпідів у толуол/метанолі об'єми розчинників значно зменшені (відносно водної процедури).

(2) Через зазначену підвищену розчинність температура даного процесу також нижче, ніж для водної процедури, завдяки чому виключається гідролітична нестабільність ефірів жирних кислот.

(3) При охолодженні до кімнатної температури розчин ліпідів у толуол/метанолі залишається гомогенним, що дозволяє вилучати сторонні речовини фільтрацією при кімнатній температурі.

(4) МТВЕ осадження дозволяє швидко та легко виділяти тверду фазу ліпідної суміші. У випадку водного процесу для виділення продукту застосовується довготривалий процес ліофілізації.

(5) МТВЕ осадження дозволяє також вилучати будь-які розчинні у МТВЕ забруднення, які переходять у фільтратні відходи. Дана можливість вилучення забруднень не реалізується у випадку прямого концентрування або ліофілізації розчину у тверду фазу.

(6) Даний спосіб дає однорідну тверду фазу.

Приготування ліпідної суспензії

Стадія (1):

На першій стадії ліпідна суміш контактує з неводним розчинником, завдяки чому дана ліпідна суміш у значній мірі розчиняється у даному неводному розчиннику. Як альтернатива, окремі ліпіди можуть контактувати з неводним розчинником послідовно у такому порядку: DPPC, DPPA та MPEG5000-DPPE; DPPC, MPEG5000-DPPE та DPPA; MPEG5000-DPPE, DPPA та DPPC; або MPEG5000-DPPE, DPPC та DPPA. DPPA, котрий є найменш розчинним та найменш багатим на ліпіди, першим не додають. Додавання одного з інших ліпідів перед додаванням або разом з додаванням DPPA полегшує розчинення останнього. Як інша альтернатива, окремі ліпіди можуть комбінуватись у твердому вигляді, і дана комбінація твердих речовин контактує з неводним розчинником.

Показником суттєвого розчинення є, загалом, момент, коли суміш ліпідної суміші та неводного розчинника стає прозорою. Як зазначалось вище, фосфоліпіди, загалом, нерозчинні у воді. Тому пряме введення суміші фосфоліпідів у водне середовище зумовлює агрегацію ліпідної суміші з утворенням грудок, котрі дуже важко піддаються диспергуванню. У даному винаході ця проблема вирішується шляхом розчинення даної ліпідної суміші у неводному розчиннику перед введенням водного розчину. Це дає можливість легко диспергувати ліпідну суміш у рідині. Потім рідку дисперсію можна ввести у потрібне водне середовище.

Під неводним розчинником такий розчинник або суміш розчинників, де вміст води достатньо низький, щоб стати на заваді розчиненню даної ліпідної суміші. Потрібна кількість даного неводного розчинника залежить від розчинності даної ліпідної суміші і також від потрібної кінцевої концентрації кожного компонента. Як може оцінити будь-який рядовий фахівець у даній галузі, припустимий рівень вмісту води у даному неводному розчиннику буде варіювати у залежності від розчинностей окремих ліпідів даної суміші у воді. Чим більша розчинність окремих фосфоліпідів у воді, тим більша її кількість може бути присутньою на стадії (1). Як неводний розчинник переважно застосовується пропіленгліколь. Проте, можуть бути використані й інші члени сімейства поліолів, такі як етиленгліколь та поліетиленгліколь 300.

Для реалізації повного розчинення може виникнути потреба у механічному перемішуванні ліпідної суміші та неводного розчинника. Фахівцеві у даній галузі зрозуміло, що є можливість широкого вибору засобів перемішування. Перевага віддається застосуванню гомогенізатора з високим зсувним зусиллям.

Фахівцеві у даній галузі зрозуміло, що підвищення температури розчинника буде сприяти розчиненню даної ліпідної суміші. Температура, при якій може виконуватись стадія (1), може змінюватись від кімнатної до точки кипіння вибраного розчинника. Перевага віддається температурному інтервалу від приблизно 30 до приблизно 70°C, більша перевага віддається температурі від приблизно 45 до приблизно 60°C, і навіть ще більша перевага віддається температурі приблизно 50, 51, 52, 53, 54 або 55°C. При використанні етиленгліколю або поліетиленгліколю 300 перевага віддається температурному інтервалу від приблизно 50 до приблизно 60°C, і ще більша перевага температурі приблизно 55°C. Підтримання розчину при підвищеній температурі призведе до зменшення його в'язкості та полегшить приготування композиції.

Процедура розчинення ліпідної суміші, якій віддається перевага, наступна: (a) Додати пропіленгліколь до відповідного зваженого контейнера. (b) Підігріти пропіленгліколь до температури 40-80°C на нагрівальній бані. (c) Завантажити зважену ліпідну суміш в окремий контейнер. (d) Коли температура пропіленгліколю досягне зазначених меж, перенести даний розчин у контейнер, що містить дану ліпідну суміш. (e) Знову помістити зазначений контейнер на нагрівальну баню, доки даний розчин не стане прозорим. (f) Перемішати у

механічний спосіб розчин ліпідна суміш/пропіленгліколь, щоб додатково упевнитись у повному розчиненні та однорідному диспергуванні даної ліпідної суміші.

Співвідношення ліпідної суміші та неводного розчинника обмежується, звичайно, розчинністю даної ліпідної суміші. На це співвідношення також впливає потрібна кількість ліпідної суміші у кінцевому продукті. Краще, коли це співвідношення дорівнює від приблизно 1мг ліпідної суміші на мл розчинника (мг/мл) до приблизно 100мг/мл. Ще краще, коли дана ліпідна суміш присутня у кількості приблизно 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 або 15мг/мл. Навіть ще краще, коли дана ліпідна суміш присутня у кількості приблизно 10мг/мл.

Стадія (2):

Друга стадія включає контактування розчину зі стадії (1) з водним розчином для утворення ліпідної суспензії. Даним водним розчином може бути вода, сольовий розчин, суміш сольовий розчин/гліцерин або суміш сольовий розчин/гліцерин/неводний розчинник. Краще, коли неводним розчинником є, як зазначено вище, пропіленгліколь. Суспензією, у даному тексті, є дисперсія, у якій нерозчинні частинки дисперговані у рідкому середовищі.

Коли повне розчинення даної ліпідної суміші досягнуто (стадія (1)), утворений в результаті розчин може бути введений у водний розчин. Даний водний розчин може містити один або більше компонентів, що вибрані із хлориду натрію, гліцерину та неводного розчинника. Краще, коли даний водний розчин містить гліцерин та хлорид натрію. Краще, коли у даному водному розчині міститься достатня кількість пропіленгліколю, до введення розчину зі стадії (1), що сприяє досягненню потрібної кінцевої концентрації пропіленгліколю.

Послідовність додавання потрібних компонентів, як вживається, не впливає значним чином на утворену в результаті ліпідну суспензію. Проте, краще, коли даний розчин ліпідної суміші додається до води, котра вже може містити зазначені вище додаткові компоненти. Потім можуть додаватись додаткові необхідні компоненти. Ще краще, коли розчин ліпідної суміші додається до розчину води та хлориду натрію (тобто сольового розчину). Додаткова перевага віддається, коли розчин ліпідної суміші додається до розчину води, хлориду натрію та гліцерину. Ще більша перевага віддається, коли розчин даної ліпідної суміші додається до розчину води, хлориду натрію, гліцерину та пропіленгліколю.

Краще, коли на мл даної композиції припадає 6,8мг NaCl. Краще, коли на мл даної композиції припадає 0,1мл гліцерину. Перевага віддається кінцевій концентрації 0,1мл пропіленгліколю на мл композиції. Краще, коли кінцева величина рН даної композиції складає приблизно 5,5-7,0.

Дана ліпідна суміш присутня, переважно, у кількості 0,75-1,0мг/мл композиції.

Температура даного водного розчину може варіювати від кімнатної до 70°C. Краще, коли вона лежить у межах від приблизно 45 до 60°C, ще краще, коли вона дорівнює 50, 51, 52, 53, 54 або 55°C. З метою досягнення повного розчинення дану суміш треба струшувати, краще, перемішувати. Крім того, може виникнути потреба у коректуванні величини рН даного розчину, що залежить від необхідних властивостей кінцевої композиції. Так коректування може здійснюватись за допомогою кислоти (наприклад, HCl) або основи (наприклад, NaOH).

Дана ліпідна суспензія буде містити частинки різних розмірів. Однією з переваг даного винаходу є можливість одержати суттєво невеликі частинки практично однорідного розміру. Так, краще, коли більшість одержаних частинок мають діаметри менше 100нм, ще краще, менше 50нм.

Процедура розчинення даної ліпідної суміші, якій віддається перевага, наступна: (а) Додати воду для ін'єкцій (WFI) у резервуар для змішування. (b) Розпочати змішування, контролюючи температуру, яка має дорівнювати 50-55°C. (c) Додати у резервуар для змішування хлорид натрію. (d) Додати у резервуар для змішування гліцерин. Надати достатній час для повного змішування. (e) Додати залишок пропіленгліколю, котрий не міститься у розчині ліпідна суміш/пропіленгліколь. (f) Зменшити швидкість перемішування для зниження турбулентності у резервуарі для змішування. (g) Додати у резервуар для змішування розчин ліпідна суміш/пропіленгліколь. (h) Збільшити швидкість перемішування до початкової величини. (i) Додати, при потребі, додаткову кількість WFI. (j) Продовжити змішування протягом приблизно 25 хвилин і забезпечити повне змішування. (к) Перевірити та скоректувати величину рН даного розчину до необхідного значення.

Стадія (3):

Стадія (3) включає нагрівання даної ліпідної суспензії, що одержана на стадії (2), до температури, котра дорівнює або перевищує найвищу температуру фазового переходу гель - рідкокристалічна фаза ліпідів, що присутні у даному розчині.

Одне з призначень даної стадії полягає в одержанні фільтрівної суспензії. Розчин/суспензія вважається фільтрівним, якщо у межах нормального процесу не спостерігається суттєвого зниження швидкості течії та суттєвого підвищення перепаду тисків у даній фільтраційній системі.

Експериментальні дані вказують, що для спрощення процесу стерильного фільтрування температура ліпідів у даній композиції має бути за межами температури їх фазового переходу гель - рідкокристалічна фаза. Коли температура даних ліпідів нижче температури зазначеного фазового переходу, частинки суспензії знаходяться у твердому стані. Проте, коли їх температура вище температур відповідних фазових переходів гель - рідкокристалічна фаза, вони знаходяться у більш вільно організованій конфігурації і тому фільтруються легше.

DPPC та DPPA виявляють фазові переходи, відповідно, при 41 та 67°C. MPEG5000-DPPE є розчинним у воді і тому не дає фазового переходу гель - рідкокристалічна фаза, що є типовим для більшості гідратованих ліпідних суспензій. Оскільки всі ліпіди у композиції, якій віддається перевага, мають різні температури фазових переходів гель - рідка фаза, краще, коли для фільтрування даного розчину застосовується найвища температура зазначеного фазового переходу, 67°C. При підтриманні температури на рівні 67°C або за межами цієї величини всі зазначені ліпіди будуть знаходитись за межами їх відповідних фазових переходів, що забезпечує їм вільну конфігурацію при проходженні через фільтри.

Нагрівання може бути реалізовано шляхом розміщення резервуара для змішування у оболонці з теплообмінним змішувачем. Гаряча вода/пара, що надходить із контролюємого джерела, наприклад, бані з гарячою водою або водонагрівача, забезпечить достатню кількість тепла для підтримання змішувача

розчину при заданій температурі. Крім того, можуть використовуватись й інші теплові джерела, відомі фахівцям у даній галузі.

Стадія (4):

Стадія (4) виконується шляхом фільтрування даної ліпідної суспензії через стерилізаційний фільтр. Вона призначена для одержання суспензії, суттєво вільної від бактеріальних забруднень. Фільтрат вважається суттєво вільним від бактеріальних забруднень, коли вірогідність того, що даний фільтрат містить принаймні один мікроорганізм, здатний утворювати колонію, дорівнює менше 10^{-6} .

Краще, коли фільтрація здійснюється з використанням картриджей стерилізаційного фільтра. Крім того, може виникнути потреба у засобах, що сприяють проходженню розчину через фільтри (наприклад, відкачування або підвищений тиск). Оскільки розчин, котрий піддається фільтрації, необхідно підтримувати при температурі, що дорівнює або перевищує найвищу температуру фазового переходу гелю - рідкокристалічна фаза ліпідів у даному розчині, фільтрування має проводитись приблизно при такій самій температурі. Для реалізації зазначеного краще, коли фільтри (наприклад, картриджі стерилізаційного фільтра) розміщують в оболонках з постійним нагрівом, наприклад, потоком гарячої води із водяної бані з контролюємою температурою, для забезпечення температури суспензії на рівні, котрий перевищує температури фазових переходів даних ліпідів. Краще, коли температура стерилізаційного фільтра дорівнює від 50 до 100°C, ще краще, коли вона лежить у межах 60-90°C, і ще краще, коли вона дорівнює 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 або 80°C.

Для фільтрування суспензії може використовуватись один або більше стерилізаційних фільтрів. Потрібна кількість залежить від здатності даних фільтрів вилучати бактерії. Перевага віддається застосуванню двох фільтрів. Розмір пор фільтрів обмежується необхідністю одержання вільної від бактерій суспензії. Перевага віддається застосуванню 0,2мкм гідрофільних фільтрів.

Розчин композиції, якій віддається перевага, піддавали фільтрації у безперервному режимі через два 0,2мкм гідрофільні фільтри протягом 3 годин при швидкості приблизно 1л за хвилину (1л/хвилину), тобто через зазначені фільтри було перепущено загалом 180л даного суспензійного розчину. Експериментальні результати показують, що блокування даних фільтрів не спостерігається. Ліпідний аналіз вказує на відсутність вимірних втрат у процесі фільтрації (що могли б бути зумовлені накопиченням на фільтрах).

Розчин композиції, якій віддається перевага, піддавали компаундуванню при 40-80°C, і дану суспензію охолоджували до температури оточуючого середовища перед стерильною фільтрацією. Будь-якого засмічування даних фільтрів не спостерігалось, що вказує на те, що розмір частинок даної суспензії лежить значно нижче розміру пор фільтра, 0,2мкм. З метою забезпечити максимальну рекуперацію ліпідної суміші у стерильному фільтраті (тобто мінімізувати можливе утримання ліпідних частинок на фільтрах) у процесі фільтрації бажано застосовувати нагрів.

Процедура фільтрування ліпідної суспензії, якій віддається перевага, наступна: (a) Переконатись, що температура всіх фільтрів в оболонках знаходиться у межах 70- 80°C. (b) Переконатись, що всі клапани у фільтраційній системі закриті. (c) З'єднати вхідний рукав фільтраційної системи з виходом резервуара для змішування. (d) Відкрити клапани для перепускання розчину через фільтри. (e) Промити дані фільтри перепусканням трьох літрів розчину перед збиранням фільтрату. (f) Продовжити фільтрацію до завершення процесу.

Стадія (5):

Розливання даного відфільтрованого розчину у пляшечки завершує стадію (5). Краще, коли цю стадію проводять у контрольованій асептичній зоні. Рядовому фахівцеві у цій галузі відомо, що вибір пляшечки та кількості суспензії, якою наповнюють дану пляшечку, залежить від кінцевого призначення даної ліпідної суспензії. Розлив може виконуватись за допомогою множини методів та приладів, включаючи піпетку, ручний шприцевий дозатор (наприклад, шприцевий дозатор Філаматік (Filamatic®)) або промислові автоматичні дозатори (наприклад, фірми Козолі (Cozzoli) чи автоматичний наповнювач типу TL).

Стадія (6):

На стадії (6) проводять заміну залишкового газу у пляшечці зі стадії (5) на перфторовуглеводневий газ. У методі газообміну, якому віддається перевага, пляшечки з суспензією завантажують у камеру ліофілізатора, і залишковий газ заміщують перфторовуглеводневим газом. Газ, якому віддається перевага, являє собою перфторопропан (PFP). Можуть застосовуватись й інші методи газообміну, відомі фахівцям у даній галузі.

Після завершення циклу газообміну дані пляшечки герметизують. Коли тиск у ліофілізаційній камері повернеться до величини атмосферного тиску після напуску PFP, пляшечки закривають пробками.

Стадія (7):

Стадія (7) включає кінцеву стерилізацію пляшечки після стадії (6). Один із методів кінцевої стерилізації реалізується за допомогою автоклава. Крім того, загерметизовані пляшечки можуть бути піддані кінцевій стерилізації у паровому стерилізаторі, що слугує додатковою гарантією стерильності даного продукту. Процес стерилізації має проводитись обережно, оскільки в результаті термічної обробки в автоклаві може спостерігатись деяка деградація ліпідів. Краще, коли пляшечки стерилізують при температурі у межах приблизно 126-130°C протягом 1-10 хвилин.

Інші особливості даного винаходу стануть зрозумілими із подальшого опису варіантів прикладів, котрі наведені для ілюстрації даного винаходу і не обмежують його.

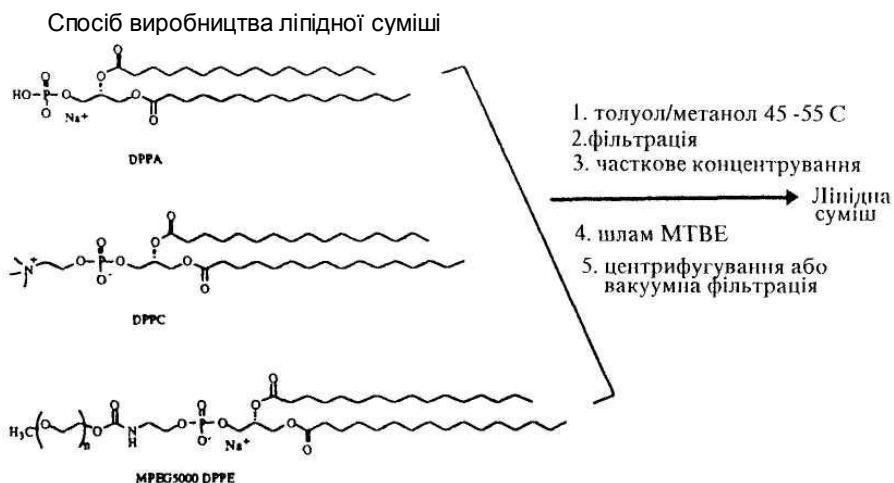
Приклади

Таблиця 1

Склад ліпідної суміші

Назва ліпиду	Загальна назва	Ваг. %	Мольн. %
--------------	----------------	--------	----------

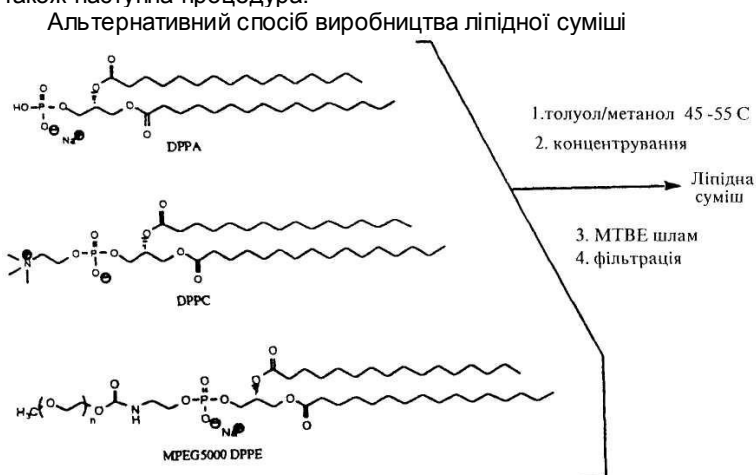
DPPA	1,2-дипальмітоїл-sn-гліцєро-3-фосфатидинова кислота, моноватрієва сіль	6,0	10
DPPC	1,2-дипальмітоїл-sn-гліцєро-3-фосфатиділхолін	53,5	82
MPEG5000-DPPE	N-(метокси поліетилєн гліколь 5000 карбамойл)-1,2-дипальмітоїл-sn-гліцєро-3-фосфатидилєтаноламін, моноватрієва сіль	40,5	8



Колбу наповнюють толуолом (3,3л), метанолом (1,2л), DPPA (59,6г), DPPC (535г) та MPEG5000 DPPE (405г). Після промивання твердих контактних поверхонь 0,9л метанолу даний шлам нагрівають до 45-55°C до повного розчинення.

Даний розчин відфільтровують і потім концентрують у вакуумі при 35-45°C до стану густого гелю. Додають метил t-бутиловий ефір (MTBE, 5,4л), і дану суміш суспендують при 15-30°C. Білу тверду речовину збирають центрифугуванням або вакуумною фільтрацією та промивають MTBE (0,9л). Потім тверду речовину поміщують у вакуумну піч та висушують до постійної ваги при 40-50°C. Одержану висушену ліпідну суміш переносять у пляшку та зберігають температури від -15 до -25°C.

У іншому варіанті способу виробництва ліпідної суміші згідно з даним винаходом може застосовуватись також наступна процедура.



Кількості фосфоліпідів коректували з урахуванням їх ступеней чистоти, базуючись на даних аналізу. Розмір наважки (загальна вага суміші фосфоліпідів) у даному експерименті складав 2кг.

Колбу ротаційного випарника завантажують послідовно толуолом (3300мл), метанолом (1200мл), DPPA (122,9г; кількість скоректована на чистоту 97,0%), DPPC (загалом, 1098,5г; 500,8г із партії з чистотою 98,4% та 597,7г із партії з чистотою 96,7%) та MPEG5000 DPPE (815,7г; скоректована на чистоту 99,3%). Після промивання залишкових твердих речовин у колбі метанолом (900мл) дану колбу поміщують на ротаційний випарник (без застосування вакууму), і даний шлам підігрівають до температури у межах 45-55°C (зовнішня). Після повного розчинення зовнішню температуру знижують до 35-45°C, систему вакуумують, і даний розчин концентрують до білої напівтвердої речовини. Потім колбу знімають з випарника, і тверду речовину розбивають за допомогою шпателя. Дану колбу знов поміщують на випарник, і концентрування продовжують. Після завершення даного процесу (кінцевий тиск 20мбар; біла гранульована тверда речовина) через боковий відвід ротаційного випарника додають MTBE (5400мл), вакуум переривають, і дану суміш суспендують протягом 15-45 хвилин при 15-30°C. Тверду речовину виділяють методом центрифугування або вакуумною фільтрації, промивають MTBE (3800мл) та висушують до постійної ваги у вакуумній печі (40-50°C). Перед

перенесенням у поліетиленові пляшки з поліпропіленовими ковпачками тверду речовину пропускають через сито (отвори 0,079 дюйм) і одержують 1966,7г (98%) ліпідної суміші (SG896) у вигляді білої твердої речовини.

Ліпідна суспензія, якій віддається перевага, містить:

1,2-дипальмітоїл-sn-гліцеро-3-фосфатидинову кислоту, мононатрієву сіль (DPPA);

1,2-дипальмітоїл-sn-гліцеро-3-фосфатиділхолін (DPPC);

N-(метоксиполіетиленгліколь 5000 карбамойл) - 1,2-дипальмітоїл-sn-гліцеро-3-фосфатиділетаноламін, мононатрієву сіль;

пропіленгліколь, фармацевтичної чистоти, згідно з Фармакопеєю США; гліцерин, фармацевтичної чистоти, згідно з Фармакопеєю США; хлорид натрію, фармацевтичної чистоти, згідно з Фармакопеєю США; та воду для ін'єкцій, фармацевтичної чистоти, згідно з Фармакопеєю США;

Таблиця 2

Склади контрастуючих агентів, яким віддається перевага

Компонент	A*	B*
NaCl, Фармакопея США	6,8мг/мл	6,8мг/мл
Гліцерин, Фармакопея США	0,1мл/мл	0,1мл/мл
Пропіленгліколь, Фармакопея США	0,1мл/мл	0,1мл/мл
Ліпідна суміш**	1мг/мл	0,75мг/мл
Перфторопропан	>65%	>65%
pH	6,0-7,0	6,0-7,0

*Композиція А містить 1мг/мл ліпідної суміші. Композиція В має концентрацію ліпідної суміші 0,75мг/мл.

**Дана ліпідна суміш складається із 53,5ваг.% DPPC, 6,0ваг.% DPPA та 40,5ваг.% MPEG5000-DPPE.

Таблиця 3

Типи контейнера та ущільнення, яким віддається перевага

Компонент	Тип
Пляшечка	Вітон (Wheaton) 2802, В33ВА, 2см ³ , 13мм, тип І, трубчасті пляшечки з флінту
Пробка	Вест (West) V50 4416/50, 13мм, сірий бутилію, силіційовані пробки
Герметик	Вест (West) 3766, білий 13мм, струшувальні алюмінієві герметики

Об'єм наповнення пляшечки кінцевим продуктом може дорівнювати 1,0-2,0мл/пляшечку.

У випадку приготування даної композиції, якій віддається перевага, прямим гідратуванням даної ліпідної суміші водним матричним розчином, що містить воду для ін'єкцій, хлорид натрію, гліцерин та пропіленгліколь, фільтрати містять меншу кількість ліпідів у порівнянні з попередньо відфільтрованою масою розчину. Втрати ліпідів варіюють від 12 до 48%. Дані результати демонструють, що процес стерильної фільтрації не піддається ефективному контролю, і тому вміст ліпідів у кінцевому продукті може значно змінюватись.

На відміну від зазначеного, при застосуванні щойно викладеного способу результати аналізу свідчать про повну рекуперацію ліпідів під час процесу фільтрації. Розкид результатів аналізу відносно теоретичних значень лежить у межах нормального розкиду, притаманного даному аналітичному методу. Розподіл частинок за числом, об'ємом та відбивною здатністю суспензії, котра готувалась спочатку шляхом розчинення ліпідної суміші у пропіленгліколі, вказує на те, що більшість даних частинок має розміри менше 50nm у попередньо відфільтрованому масовому розчині як при 55, так і при 70°C. Профіль розподілу даних частинок не змінюється після фільтрації.

Застосування

Заявлений спосіб є корисним для виготовлення ультразвукових контрастуючих агентів. Такі агенти можуть знайти використання у галузях, пов'язаних з аналізом різних зображень, зокрема, як підсилювачі контрасту в ехокардіографічних та радіологічних ультразвукових зображеннях.

Очевидно, що на основі викладеного вище матеріалу можливі численні модифікації та варіації даного винаходу. Тому слід розуміти, що у межах формули, котра додається, даний винахід може знайти інше практичне застосування, ніж викладене у даному тексті.