

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 481**

51 Int. Cl.:

B01J 13/02 (2006.01)

A61K 49/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2013** **E 13731334 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016** **EP 2864033**

54 Título: **Preparación de una composición que comprende microburbujas de gas**

30 Prioridad:

26.06.2012 EP 12173606

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.05.2016

73 Titular/es:

GE HEALTHCARE AS (100.0%)
Nycoveien 1-2 P.O. Box 4220 Nydalen
0401 Oslo, NO

72 Inventor/es:

KVAALE, SVEIN y
TOKERUD, OLE JOHANNES

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 571 481 T3

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

DESCRIPCIÓN

Preparación de una composición que comprende microburbujas de gas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a medios de contraste para ultrasonidos. De manera más particular, se refiere a un procedimiento para la preparación de medios de contraste para ultrasonidos, en particular a composiciones que comprenden microburbujas de gas y más particularmente, a microburbujas encapsuladas por proteínas preparadas usando energía mecánica.

Antecedentes de la invención

10 Es bien conocido que la imaginología por ultrasonidos comprende una valiosa herramienta diagnóstica, por ejemplo, en estudios del sistema vascular, en particular en cardiografía, y de microvasculatura tisular. Se han propuesto una diversidad de medios de contraste para ultrasonidos para potenciar las imágenes acústicas así obtenidas, incluyendo suspensiones de partículas sólidas, gotitas líquidas emulsificadas, burbujas de gas y gases o líquidos encapsulados. Los medios de contraste para ultrasonidos más exitosos han consistido generalmente en dispersiones de pequeñas burbujas de gas que pueden ser inyectadas de manera intravenosa. Por ejemplo, los documentos WO 97/29783 y
15 WO 93/05819 describen tales dispersiones de microburbujas. Si se estabilizan de forma apropiada, las microburbujas pueden permitir la visualización por ultrasonidos altamente efectiva de, por ejemplo, el sistema vascular y la microvasculatura tisular, con frecuencia en dosis ventajosamente bajas. Tales medios de contraste normalmente incluyen un material estabilizador que estabiliza el gas, por ejemplo, emulsificantes, aceites, espesantes o azúcares, o atrapando o encapsulando el gas en una diversidad de sistemas, por ejemplo, como micropartículas porosas que
20 contienen gas o como microburbujas de gas encapsuladas. Las microburbujas incluyen un gas que es esencial para el comportamiento del agente de contraste para ultrasonidos, y se ha encontrado que una diversidad de gases mejora propiedades tales como la estabilidad de microburbujas y la duración del efecto ecogénico. Un grupo de medios de contraste para ultrasonidos se prepara y suministra como una preparación lista para usar que comprende una composición líquida de microburbujas de gas encapsuladas.

25 Pueden usarse diversos procedimientos para preparar microburbujas. Tales microburbujas que contienen gas pueden producirse agitando o sometiendo a ultrasonidos un líquido que contiene un material formador de membrana en presencia de un gas o mezcla de gases adecuados. Otros procedimientos incluyen secado por aspersión. Sin embargo, las microburbujas producidas por tales técnicas tienen una amplia distribución de tamaño, que puede variar entre lotes y además el rendimiento, es decir, el porcentaje de material formador de membrana, que termina en
30 microburbujas de tamaño apropiado, también puede variar entre lotes. El documento US 5.552.133 describe un procedimiento para preparar microesferas de gas encapsuladas que comprenden una proteína termodesnaturalizable que encapsula un gas, usando un molino coloidal. Una solución acuosa de una proteína termodesnaturalizable se combina con un gas, y se mezcla aplicando fuerzas de cizalla mecánica a la mezcla para formar una suspensión de microburbujas de gas, donde la proteína se desnaturaliza y depositada en la interfase gas-solución.

35 El documento AU 722 742 B2 describe un procedimiento para preparar una solución que comprende microburbujas de gas encapsuladas, que comprende la etapas de 1) proporcionar una solución de albúmina humana al 5 % a 68 °C; 2) añadir un gas a temperatura ambiente a la solución de albúmina humana calentada; 3) homogeneizar la mezcla en un molino coloidal para formar una solución de microburbujas de gas encapsuladas por albúmina humana desnaturalizada. El documento AU 722 742 B2 también describe un aparato que comprende un molino Gaulin y una
40 "t". La salida de dicha "t" está conectada a la entrada de dicho molino.

45 Cuando se preparan microburbujas, es importante tener un procedimiento robusto que proporcione repetidamente un producto de acuerdo con las especificaciones del producto. De manera deseable, las microburbujas producidas tendrán una estrecha distribución de tamaños alrededor del tamaño de microburbuja deseado, generalmente 1 a 7 µm, por ejemplo, 3-5 µm. De manera deseable, el porcentaje de las microburbujas grandes, tales como por encima de 7 µm, debería ser mínimo y bien limitado. Para lograr esto, la desviación típica de los tamaños de microburbuja debería ser pequeña. Esto no se ha logrado cuando se usan los procedimientos de la técnica anterior. Un objetivo es producir microburbujas reproducibles que tengan una distribución de tamaño estrecha en todo el ciclo de procedimiento y cada vez que se ejecute el procedimiento. Se ha buscado un procedimiento robusto para preparar medios de contraste, tal como para preparar una composición que comprende microburbujas de gas encapsuladas por una proteína
50 desnaturalizada.

Compendio de la invención

55 En vista de las necesidades de la técnica, la presente invención proporciona un procedimiento robusto para preparar un medio de contraste, tal como para preparar una composición que comprende microburbujas de gas encapsuladas por una proteína desnaturalizada. Se ha identificado y desarrollado ahora un procedimiento en el que el rendimiento puede mejorarse y se evita la producción indebida de microburbujas sobre- e infradimensionadas. En el procedimiento de la invención, una solución acuosa de una proteína termodesnaturalizable se combina con un gas, y esta se mezcla por medios mecánicos usando altas fuerzas de cizalla mecánica. De manera sorprendente, se ha encontrado que

antes de mezclar la proteína y el gas, tanto la proteína como el gas deberían calentarse, proporcionando un procedimiento robusto, en el que las microburbujas generadas tienen una distribución de tamaño estrecha.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición que comprende microburbujas de gas encapsuladas, que comprende las etapas secuenciales de

- 5 i) proporcionar una solución acuosa de proteína calentada de una proteína termodesnaturalizable a una temperatura necesaria para alcanzar una desnaturalización incipiente, donde dicha temperatura está en el intervalo de 50-100 °C;
- ii) calentar un gas usando calor de la solución de proteína calentada, donde el gas se calienta hasta una temperatura no menor de 20 °C por debajo de la temperatura de dicha solución de proteína calentada;
- 10 iii) mezclar el gas calentado y la solución de proteína calentada para obtener una mezcla de gas/líquido;
- iv) dispersar el gas en la solución de proteína sometiendo la mezcla de gas/líquido a fuerzas de cizalla mecánica para formar una composición de microburbujas de gas encapsuladas por proteína desnaturalizada.

En un segundo aspecto, la presente descripción proporciona una tubería de alimentación útil en la preparación de una composición que comprende microburbujas de gas encapsuladas, donde la tubería de alimentación comprende

- 15 i) una primera entrada y una segunda entrada que proporciona las aberturas respectivas de dos trayectos,
- ii) una sección de transferencia de calor que comprende una pared longitudinal que separa los dos trayectos,
- iii) una salida conectable a una entrada de un dispositivo de mezcla.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un aparato que comprende la tubería de alimentación de la presente descripción. El aparato de acuerdo con este aspecto puede comprender:

- 20 i) un dispositivo de mezcla que genera altas fuerzas de cizalla mecánica, y que tiene una entrada y una salida;
- ii) una tubería de alimentación que comprende
 una primera entrada y una segunda entrada que proporcionan las aberturas respectivas de dos trayectos,
 una sección de transferencia de calor que comprende una pared longitudinal que separa los dos trayectos,
 una salida conectada a la entrada del dispositivo de mezcla;
- 25 iii) un depósito de alimentación para una composición líquida conectada a la primera entrada de la tubería de alimentación;
- iv) un depósito de gas conectado a la segunda entrada de la tubería de alimentación.

Breve descripción de las figuras

30 La Figura 1 muestra esquemáticamente un aparato útil en la preparación de una composición que comprende microburbujas de gas encapsuladas por una proteína desnaturalizada.

Las Figuras 2a, 2b y 2c muestran esquemáticamente una tubería de alimentación de acuerdo con la invención que comprende dos trayectos, uno para transportar gas y uno para la solución de proteína.

Las Figuras 3a, 3b y 3c muestran esquemáticamente una tubería de alimentación alternativa de acuerdo con la invención.

35 Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la invención proporciona un procedimiento para preparar una composición que comprende microburbujas de gas encapsuladas, que comprende las etapas secuenciales de

- 40 i) proporcionar una solución acuosa de proteína calentada de una proteína termodesnaturalizable a una temperatura necesaria para alcanzar una desnaturalización incipiente, donde dicha temperatura está en el intervalo de 50-100 °C;
- ii) calentar un gas usando calor de la solución de proteína calentada, donde el gas se calienta hasta una temperatura no menor de 20 °C por debajo de la temperatura de dicha solución de proteína calentada;
- iii) mezclar el gas calentado y la solución de proteína calentada para obtener una mezcla de gas/líquido;
- iv) dispersar el gas en la solución de proteína sometiendo la mezcla de gas/líquido a fuerzas de cizalla mecánica

para formar una composición de microburbujas de gas encapsuladas por proteína desnaturalizada.

Usando el procedimiento de la invención, calentando tanto la solución de proteína como el gas antes de entrar al dispositivo de mezcla usado en la etapa iv), se evita que el gas se expanda cuando es alimentado en el dispositivo de mezcla. Se ha encontrado que esto es un factor clave para proporcionar un procedimiento estable y microburbujas de una distribución de tamaños estrecha. El procedimiento usa calor de la solución de proteína para calentar el gas, antes de que éstos se combinen. Por ello, tanto la solución de proteína como el gas a encapsular son precalentados antes de ser introducidos en el dispositivo de mezcla. La proteína se calienta hasta la temperatura en la que se produce una desnaturalización incipiente de la proteína. La temperatura de desnaturalización es la temperatura a la cual el material insoluble se observa primero. La temperatura de desnaturalización puede obtenerse de tablas de desnaturalización térmica de proteínas en la bibliografía, o de forma experimental mediante cualquier procedimiento conocido. La temperatura de desnaturalización de la proteína en solución normalmente estará en el intervalo de 50-100 °C, variando para diferentes proteínas, pureza, fuente, etc. En el procedimiento de la invención, albúmina es una proteína preferida para proporcionar microburbujas encapsuladas. Cuando se usa una solución de albúmina, ésta se calienta hasta 60-80 °C, más preferiblemente 65-75 °C, y lo más preferiblemente a 68-72 °C. La temperatura exacta necesaria depende de varios parámetros, y también debería tomarse en consideración que la temperatura puede aumentar ligeramente cuando la mezcla de gas/solución de proteína ha entrado en el dispositivo de mezcla como un resultado de estar expuesto a energía mecánica. Cuando los componentes entran en el dispositivo de mezcla, el calor se ha transferido desde la solución de proteína al gas, garantizando que el gas tenga una temperatura que esté cercana a la temperatura en el dispositivo de mezcla, de manera que el gas no se expanda significativamente cuando entre al dispositivo de mezcla. Por ello, el gas debería calentarse hasta una temperatura cercana a la temperatura de la proteína calentada, tal como hasta al menos una temperatura de la temperatura de desnaturalización menos 20 °C, más preferiblemente a la temperatura de desnaturalización menos 15 °C, y más preferiblemente a la temperatura de desnaturalización menos 10 °C. Lo más preferiblemente, la solución de proteína y el gas tienen aproximadamente la misma temperatura cuando entran al dispositivo de mezcla. La proteína se calienta, por ejemplo, usando un intercambiador de calor. La transferencia de calor desde la solución de proteína al gas puede lograrse transportando el gas y la proteína calentada en trayectos muy próximos unos con otros y discurriendo en paralelo antes de que las dos corrientes separadas sean combinadas e introducidas en el dispositivo de mezcla. Por ello, el calor se transfiere desde la solución de proteína a la corriente de gas, preferiblemente a través de paredes conductoras de calor que separan las diferentes trayectos de una tubería.

En un modo de realización adicional de la invención, la mezcla del gas calentado y la solución de proteína calentada tiene lugar en, o muy cerca de, la entrada del dispositivo de mezcla. Por ello, el gas y la solución de proteína son premezclados justo antes de que tenga lugar la etapa de dispersión. Se ha encontrado que si el gas y la solución de proteína se combinan a una distancia alejada de la entrada del dispositivo de mezcla, se genera un flujo pistón y esto crea una variación en la distribución de tamaños de las microburbujas producidas. Cuando se combinan los dos componentes en la entrada del dispositivo de mezcla, se consigue un control mucho mejor del procedimiento de mezcla. Así, la solución de proteína y el gas se combinan justo antes o en la entrada del dispositivo de mezcla. Esto se consigue transportando la solución de proteína y el gas en trayectos que están en estrecho contacto unos con otros y que discurren en paralelo antes de que se combinen dos corrientes calentadas cerca de la entrada del dispositivo de mezcla. Al hacerlo así, la corriente de gas y la corriente de solución de proteína entrarán en el dispositivo de mezcla como una mezcla uniforme distribuida homogéneamente, sin flujo pistón alguno, y a continuación se somete a mezcla mecánica produciendo las microburbujas. Como la fabricación de las burbujas en el dispositivo de mezcla, tal como en un molino, es muy rápida, se ha encontrado importante que el gas y la proteína encapsulante sean distribuidos de manera uniforme, teniendo una concentración estable a lo largo de un ciclo de producción cuando entran en el dispositivo de mezcla.

Además, en lugar de bombear la solución de proteína, por ejemplo, usando una bomba peristáltica, en el aparato de mezcla, se ha encontrado que proporcionar la solución de proteína bajo una presión de alimentación uniforme, por ejemplo, combinada con una válvula de control que controla el caudal, afecta positivamente a la distribución de tamaño de las microburbujas generadas. Se experimentó que cuando se prepara una línea de producción que incluye bombear la solución de proteína calentada en el dispositivo de mezcla, tal como en un molino coloidal, la bomba generó pulsos que ensancharon la distribución de tamaño de las microburbujas generadas en el dispositivo de mezcla. Por ello, en un modo de realización adicional de la invención, el procedimiento incluye una etapa de alimentar la solución de proteína bajo una presión uniforme, sin generación de pulso de presión alguno, antes de que esta solución de proteína se caliente y mezcle con el gas. Dicha presión de alimentación uniforme se alcanza mediante el uso de un depósito de alimentación presurizado. Por ello, el procedimiento usa preferiblemente una presión uniforme de la corriente de alimentación de solución de proteína y esto proporciona un caudal uniforme, tal como un caudal de 0,5-3,0 litros por minuto, por ejemplo, 1-2 litros por minuto. El flujo de la solución de proteína del depósito de alimentación y el caudal de este se controla y regula de manera opcional, preferiblemente antes de que inicie el calentamiento.

En un modo de realización preferido, el procedimiento incluye todos los elementos de calentamiento de la corriente de gas y la corriente de solución de proteína, la combinación del gas calentado y la solución de proteína calentada en la entrada del dispositivo de mezcla y la alimentación de la solución de proteína bajo una presión uniforme.

En el procedimiento de la invención, la mezcla del gas y la solución de proteína se mezclan intensamente sometiéndolas a fuerzas de cizalla mecánica. Las fuerzas de cizalla mecánica empleadas preparan microburbujas del

tamaño requerido. Esto se consigue usando un dispositivo de mezcla en el que se producen elevadas fuerzas de cizalla mecánica, tal como un mezclador de alta velocidad, un molino, un estátor de rotor, un fluidificador y similares. En un modo de realización preferido de la invención, un molino, tal como un molino coloidal o un molino de cono se usan en la etapa (iv) para dispersar la solución de proteína y el gas. Tal molino comprende un rotor de alta velocidad y un estátor asociado que tiene caras opuestas. Los mezcladores que utilizan un rotor y un estátor estacionario normalmente operan a velocidades rotacionales considerablemente altas que producen altas velocidades circunferenciales del rotor. La velocidad diferencial entre el rotor y el estátor imparte una cizalla extremadamente alta y energía turbulenta en el hueco entre el rotor y el estátor. Por tanto, la velocidad circunferencial es un factor muy importante cuando se considera el grado de cizallamiento en el producto. En el procedimiento de la invención, la velocidad relativa de las superficies de rotor y estátor debería ser al menos 20 m/s. Si el rotor es cónico, como se prefiere, la velocidad en la superficie dependerá del diámetro y por ello varía sobre el cono desde la punta hasta la base. Así, la mezcla calentada de gas y solución de proteína se hace pasar a través de una zona en la cual se somete a fuerzas de cizalla ejercidas por superficies que se mueven en relación unas a otras a una velocidad de al menos 20 m/s, preferiblemente al menos 25 m/s, especialmente preferiblemente al menos 30 m/s, y más especialmente preferiblemente al menos 35 m/s, por ejemplo, hasta 100 m/s, más particularmente hasta 60 m/s, y en especial hasta 50 m/s, en la punta.

En un modo de realización de la invención, el procedimiento incluye una etapa adicional, después de la etapa iv), transferir la composición preparada a recipientes de granel o directamente en un depósito de llenado. El recipiente de granel es, por ejemplo, un saco flexible grande, por ejemplo, de un volumen de 10 - 100 litros. Antes de transferir el producto preparado, es decir, la composición que comprende microburbujas de gas encapsuladas, del dispositivo de mezcla al recipiente de granel o depósito de llenado, se reduce la temperatura de la composición, por ejemplo, mediante el uso de un intercambiador de calor. La temperatura del flujo de producto fuera del dispositivo de mezcla se reduce, por ejemplo, hasta una temperatura de 20-30 °C, tal como 25-28 °C.

Usando el procedimiento de la invención se consigue una distribución de tamaño estrecha de las microburbujas generadas, y el procedimiento proporciona repetidamente un producto de acuerdo con las especificaciones de producto. Esto es importante con el fin de proporcionar un procedimiento económicamente viable, en particular cuando los ingredientes usados son costosos, y por este procedimiento se evita la pérdida de material debido a la producción de microburbujas que no cumplen los requerimientos especificados. Además de las mejoras del procedimiento reivindicado, parámetros como el flujo del gas y el flujo de solución de proteína, y la razón entre éstos, la temperatura de la solución de proteína y la velocidad del mezclador (velocidad de rotor) afectan las características del producto y necesitan optimizarse. Para cualquier producto dado, sus características se definen clínicamente. Por ejemplo, para Optison™ el intervalo de diámetro promedio es 3,0-4,5 µm, donde 95 % son menores de 10 µm. La especificación de concentración es $5,0\text{-}8,0 \times 10^8$ microburbujas/ml. Las microburbujas preparadas por el procedimiento de la invención tienen una distribución de tamaño estrecha y un tamaño de partícula promedio bien definido con una baja desviación típica. Las microburbujas producidas tendrán una distribución de tamaño estrecha alrededor del tamaño de microburbuja deseado, generalmente 1 a 7 µm, por ejemplo 3-5 µm, y la desviación típica es pequeña. En un intervalo de ejemplos de ejecución, como se muestra en el Ejemplo 1, el tamaño de partícula promedio obtenido fue muy estable y varió entre 2,8 y 4,3 µm. Usando el procedimiento de la invención, tal como cuando se producen microburbujas de albúmina de suero humano y un gas perfluorado, se logró una desviación típica en tamaño de partícula de 0,18-0,25 µm. Dado en porcentaje, se consigue por el procedimiento una desviación típica para el tamaño de partícula menor de 20 %, tal como menor de 10 %. Cuando se preparan partículas que tienen un tamaño de partícula promedio dentro del intervalo de 3,0-4,5 µm, se consigue una desviación típica de 7,3 % o menor. Además, se consigue una concentración bien definida de microburbujas (partículas/volumen) que tienen una desviación típica baja. Se consiguió una concentración que varía desde 3,1 a $11,8 \times 10^8$ microburbujas/ml, como se reporta en el ejemplo 1, proporcionando la mayoría de las ejecuciones una concentración entre 5,0 y $8,0 \times 10^8$ microburbujas/ml. La desviación típica en concentración es, por ejemplo, entre 0,40 y $0,70 \times 10^8$ microburbujas/ml. Dado en porcentaje, la desviación típica para la concentración obtenida es menor de 15 % y más preferiblemente menor de 12 %. Por ello, mediante el procedimiento empleado se consiguen los requerimientos de acuerdo con la especificación de producto con respecto a concentración y tamaño de partículas.

Las microburbujas de gas preparadas de acuerdo con el procedimiento de la invención se estabilizan por un agente estabilizante, que encierra las microburbujas de gas, retardando la difusión del gas hacia el líquido circundante y previniendo la fusión entre microburbujas. Para el procedimiento de la invención, tal agente estabilizante es termosensible, de manera que puede quedar parcialmente insolubilizado calentando durante el procedimiento de producción. El material preferido para formar las microburbujas es un polímero de aminoácido. Tales polímeros son biodegradables por la acción de enzimas proteolíticas. Polímeros de aminoácidos utilizables incluyen aminoácidos naturales (proteínas) y polímeros de aminoácidos sintéticos. La proteína preferida es albúmina, que puede ser albúmina animal o humana, pero muy preferiblemente albúmina de suero humano. Puede sustituirse la albúmina por otras proteínas solubles en agua, tales como hemoglobina, preferiblemente hemoglobina humana. Los polímeros de aminoácidos sintéticos utilizables incluyen poli-L-lisina y ácido poli-L-glutámico. Por ejemplo, puede usarse una poli-L-lisina o ácido poli-L-glutámico en el intervalo de peso molecular de 20.000-50.000 sola o en combinación con otro polímero, tal como albúmina. También están dentro del alcance de la invención derivados de proteína o fracciones de proteínas. La temperatura de desnaturalización real está en un intervalo que depende de la proteína o derivados de proteína usados.

Pueden emplearse gases biocompatibles en las microburbujas de las composiciones, apreciándose que el término "gas", incluye cualquier sustancia (incluyendo mezclas) sustancial o completamente en forma gaseosa (incluyendo vapor) a la temperatura corporal humana normal de 37 °C. Así, el gas puede comprender, por ejemplo, aire, nitrógeno, oxígeno, dióxido de carbono, hidrógeno, óxido nitroso, un gas inerte, tal como helio, argón, xenón o criptón; un fluoruro de azufre, tal como hexafluoruro de azufre, decafluoruro de diazufre o pentafluoruro de trifluorometilazufre;

hexafluoruro de selenio;

un silano opcionalmente halogenado, tal como tetrametilsilano;

un compuesto hidrocarbonado de bajo peso molecular (por ejemplo, que contenga hasta 7 átomos de carbono), por ejemplo, un alcano tal como metano, etano, un propano, un butano o un pentano, un cicloalcano, tal como ciclobutano o ciclopentano, un alqueno, tal como propeno o un buteno, o un alquino, tal como acetileno;

un éter; una cetona; un éster;

un compuesto hidrocarbonado de bajo peso molecular halogenado (por ejemplo, que contenga hasta 7 átomos de carbono); o una mezcla de cualquiera de los anteriores.

Se prefieren las composiciones que comprenden un compuesto hidrocarbonado de bajo peso molecular halogenado. Al menos algunos de los átomos de halógeno en gases halogenados ventajosamente son átomos de flúor. Así, pueden seleccionarse gases de compuesto hidrocarbonado halogenado biocompatibles, por ejemplo, de bromoclorodifluorometano, clorodifluorometano, diclorodifluorometano, bromotrifluorometano, clorotrifluorometano, cloropentafluoroetano, diclorotetrafluoroetano y perfluorocarbonos, por ejemplo, perfluoroalcanos, tales como perfluorometano, perfluoroetano, perfluoropropanos, perfluorobutanos (por ejemplo, perfluoro-n-butano, opcionalmente mezclado con otros isómeros, tal como perfluoroisobutano), perfluoropentanos, perfluorohexanos y perfluoroheptanos; perfluoroalquenos, tal como perfluoropropeno, perfluorobutenos (por ejemplo, perfluorobut-2-eno) y perfluorobutadieno; perfluoroalquinos, tal como perfluorobut-2-ino; y perfluorocicloalcanos, tal como perfluorociclobutano, perfluorometilciclobutano, perfluorodimetilciclobutanos, perfluorotrimetilciclobutanos, perfluorociclopentano, perfluorometilciclopentano, perfluorodimetilciclopentanos, perfluorociclohexano, perfluorometilciclohexano y perfluorocicloheptano. Otros gases halogenados incluyen cetonas fluoradas, por ejemplo, perfluoradas, tal como perfluoroacetona y éteres fluorados, por ejemplo, perfluorados, tal como perfluorodietil éter. Además, puede ser ventajoso el uso del procedimiento de la invención para composiciones que comprenden gases fluorados, tales como fluoruros de azufre o fluorocarbonos (por ejemplo, perfluorocarbonos), que son conocidos por formar suspensiones de microburbujas particularmente estables, donde se prefieren SF₆, perfluoropropano y perfluorobutano, y se prefiere particularmente perfluoropropano.

Lo más preferiblemente, el procedimiento de la invención es para la preparación de una composición que comprende microburbujas que comprenden proteínas, lo más preferiblemente que comprenden albúmina, que encapsulan un gas perfluorocarbono, muy preferiblemente perfluoropropano, también llamado octafluoropropano (OFP) o perflutreno. En un modo de realización preferido, se produce el producto Optison™ de acuerdo con el procedimiento reivindicado.

En un segundo aspecto, la descripción proporciona una composición preparada de acuerdo con el procedimiento del primer aspecto. La composición puede ser para fines terapéuticos o diagnósticos, o combinados, y es preferiblemente para uso diagnóstico como un medio de contraste para ultrasonidos. La composición es preferiblemente una preparación lista para usar, es decir, la composición es preferiblemente una dispersión de microburbujas de gas en un vehículo acuoso fisiológicamente aceptable, tal como en agua para inyección. Después de llenar en recipientes más pequeños, tal como en viales o botellas, y tapar, puede ser necesario volver a suspender mediante agitación suave para proporcionar una suspensión homogénea antes de inyectar a un paciente. Por ello, la composición está lista para ser inyectada en un paciente, que es un ser humano o animal. También están incluidos medios de contraste para ultrasonidos en los que la microburbuja comprende un vector que tiene afinidad por una diana biológica. Pueden emplearse una variedad de técnicas de imagenología en aplicaciones de ultrasonido, por ejemplo, incluyendo una imagenología en modo B armónica y fundamental e imagenología en modo de Doppler armónica y fundamental; si se desea, pueden usarse técnicas de imagenología tridimensionales.

En un tercer aspecto, la descripción proporciona una tubería de alimentación útil en la preparación de una composición que comprende microburbujas de gas encapsuladas, donde la tubería de alimentación comprende

- i) una primera entrada y una segunda entrada que proporcionan las aberturas respectivas de dos trayectos,
- ii) una sección de transferencia de calor que comprende una pared longitudinal que separa los dos trayectos,
- iii) una salida conectable a una entrada de un dispositivo de mezcla.

Las dos entradas están diseñadas para conectarse con líneas o tubos de transferencia, por ejemplo, mediante el uso de abrazaderas, tales como abrazaderas de tuberías, que proporcionan conexiones a prueba de fugas. Preferiblemente, una entrada es conectable con un tubo que transporta una composición líquida, tal como una solución acuosa de una proteína desnaturalizada por calor, y la otra entrada es conectable con un tubo que transporta un gas,

tal como un gas perfluorocarbono. Las dos entradas están separadas, proporcionando aberturas de dos secciones de tubería que se combinan, visto desde el exterior, en el inicio de la sección de transferencia de calor.

La sección de transferencia de calor preferiblemente constituye una parte predominante de la tubería en la que los dos trayectos van en paralelo y el calor puede transferirse desde una corriente transportada en un trayecto a la corriente del otro trayecto. Preferiblemente, la tubería tiene, al menos en la sección de transferencia de calor, una superficie cilíndrica exterior que proporciona dos trayectos separados en una tubería cilíndrica, donde los trayectos están separados por una pared interior longitudinal que previene la mezcla de las corrientes que discurren en los trayectos. En un modo de realización, el volumen del cilindro se divide en dos mitades por una pared longitudinal que proporciona dos mitades de tuberías, una para cada trayecto. En otro modo de realización, los dos trayectos están separados teniendo una tubería interior que discurre por el interior de la tubería exterior. Por ello, en este modo de realización la pared longitudinal forma una tubería interior cilíndrica, de manera que un trayecto discurre dentro del otro trayecto, donde las dos tuberías preferiblemente tienen la misma línea central. Preferiblemente, la corriente de gas discurre en el trayecto interior y la composición líquida discurre en el trayecto. Cuando existe una diferencia de temperatura entre las corrientes en los dos trayectos, esta diferencia disminuirá conforme las corrientes se mueven en paralelo hacia la salida. La longitud de la tubería debería ser suficientemente larga para permitir una transferencia de calor suficiente de la corriente de un trayecto a otro. La longitud de la sección de transferencia de calor es suficientemente larga para asegurar el intercambio de calor deseado y es, por ejemplo, 10-100 cm, tal como 15-50 cm, preferiblemente 20-40 cm. Un diámetro interior apropiado para la entrada para la composición líquida es 5-40 mm, tal como 15-25 mm. Un diámetro apropiado para la entrada para el gas es 0,5-40 mm. En el modo de realización en el que la tubería está dividida en dos mitades de tubería, la entrada de gas puede tener las mismas dimensiones que la entrada para la solución de proteína. En el modo de realización en el que la corriente de gas discurre en una tubería interior, el diámetro de la tubería de gas es preferiblemente considerablemente menor que el diámetro de la tubería para la solución de proteína, por ejemplo, solo de 0,5-3,0 mm. Para la sección de transferencia de calor, el diámetro exterior es preferiblemente aproximadamente el mismo que el diámetro exterior de la primera sección de tubería para la solución de proteína, por ejemplo, 10-45 mm.

La salida de la tubería de alimentación es conectable con una entrada de un dispositivo de mezcla, usando por ejemplo, una abrazadera, tal como una abrazadera de tubería, que proporcionan una conexión a prueba de fugas. En, o cerca de, la salida de la tubería, la pared interior longitudinal termina y los dos trayectos de la tubería se combinan, de manera que las corrientes que discurren en éstos se mezclarán, proporcionando una composición uniforme que es continuamente la misma a lo largo del procedimiento. De acuerdo con esto, cuando la tubería de alimentación se conecta a un dispositivo de mezcla entrará en esta bien una composición recién mezclada o la composición líquida y el gas se mezclarán en la entrada o justo después de entrar en ésta. En el modo de realización en el que el gas discurre en una tubería interior, esta tubería puede terminar, y tener la salida, en el mismo lugar que la salida de la solución de proteína. Por ello, la tubería interior y exterior tienen entonces la misma longitud. De manera alternativa, la tubería interior puede terminar poco antes que la salida de la tubería exterior, asegurando que los dos componentes se mezclan antes de entrar al dispositivo de mezcla. Todavía en otro modo de realización, la tubería interior puede ser más larga que la tubería exterior y extenderse fuera de la salida de la tubería exterior. En esta alternativa, cuando la tubería de alimentación se acopla al dispositivo de mezcla, la tubería interior se extenderá al dispositivo de mezcla. En el modo de realización en el que la sección de transferencia de calor de la tubería se divide en dos mitades de tubería por una pared longitudinal, esta pared puede terminar en la salida de la tubería o de manera alternativa, poco antes de la salida, garantizando que los componentes se mezclan antes de entrar al dispositivo de mezcla.

La tubería de alimentación puede ser de cualquier material o combinación de materiales conveniente, pero deseablemente será de metal o cerámica, en particular de un metal tal como acero, preferiblemente acero inoxidable.

En otro aspecto, la invención proporciona un aparato para la preparación de una composición que comprende microburbujas de gas encapsuladas, el aparato comprende una tubería de alimentación como se describe en el tercer aspecto de la invención.

El aparato de la invención comprende, por ello

- i) un dispositivo de mezcla que genera altas fuerzas de cizalla mecánica, y que tiene una entrada y una salida;
- ii) una tubería de alimentación que comprende
 - una primera entrada y una segunda entrada que proporcionan las aberturas respectivas de dos trayectos,
 - una sección de transferencia de calor que comprende una pared longitudinal que separa los dos trayectos,
 - una salida conectada a la entrada del dispositivo de mezcla;
- iii) un depósito de alimentación para composición líquida conectado a la primera entrada de la tubería de alimentación;
- iv) un depósito de gas conectado a la segunda entrada de la tubería de alimentación.

El dispositivo de mezcla es un dispositivo en el que se producen altas fuerzas de cizalla mecánica, tal como un mezclador de alta velocidad, un molino, un rotor-estátor, un fluidificador o similar. En un modo de realización preferido de la invención, el dispositivo de mezcla es un molino, tal como un molino coloidal o un molino de cono, y éste se usa en la dispersión de la solución de proteína y el gas. Tal molino comprende un rotor de alta velocidad y un estátor asociado que tiene caras opuestas, es decir, un mezclador en el que la mezcla inicial se hace pasar a través de una zona sobre la que se ejercen fuerzas de cizalla mediante rotación relativa de dos superficies, una en un elemento referido como rotor y la otra en un elemento referido como estátor. Los mezcladores que utilizan un rotor y un estátor estacionario normalmente operan a velocidades rotacionales considerablemente altas que producen altas velocidades circunferenciales del rotor. La velocidad diferencial entre el rotor y el estátor imparte cizalla extremadamente alta y energía turbulenta en la abertura entre el rotor y el estátor. En el dispositivo de mezcla del aparato de la invención, las superficies que se mueven relativamente una a otra para crear las zonas de fuerza de cizalla están deseablemente separadas unas de otras por menos de 2 mm, preferiblemente menos de 1 mm, especialmente preferiblemente menos de 600 μm , por ejemplo, 300 a 500 μm . La distancia entre el rotor y el estátor es preferiblemente ajustable, por ejemplo, entre 0,2-0,6 mm. La separación óptima dependerá de la viscosidad de la mezcla que pasa a través de las zonas de fuerza de cizalla y la separación mínima puede venir determinada por restricciones de fabricación. La mezcla de solución de proteína/gas se dispersa y cavita entre las superficies del rotor y el estátor. El dispositivo de mezcla preferiblemente comprende además una cámara de mezcla provista de un rotor y medios impulsores para el mismo, incluyendo un motor y cojinetes. El mezclador tiene un estátor en relación enfrentada al rotor, el estátor y el rotor pueden tener superficies lisas o pueden tener, en un modo de realización, crestas y surcos de enclavamiento que se extienden axialmente provistos con medios de tránsito de fluido que se extienden radialmente, por lo cual definen una pluralidad de zonas de fuerza de cizalla para el paso de fluido radialmente entre el rotor y el estátor desde la entrada. En el aparato mezclador de la invención, la entrada está es ubicada preferiblemente radialmente hacia adentro de las zonas de fuerza de cizalla, preferiblemente en o cerca del eje de rotación del rotor. Deseablemente, la entrada del dispositivo de mezcla es adyacente al eje impulsor del rotor, de manera que la mezcla de gas y solución de proteína de la salida de la tubería de alimentación puede premezclarse adicionalmente si fuera necesario, en la cámara de premezcla antes de entrar a las zonas de fuerza de cizalla.

Para garantizar que se produce la mezcla adecuada, pueden disponerse un segundo rotor, y si se desea rotores adicionales, por ejemplo, hasta 5 rotores, impulsados por los mismos medios impulsores, preferiblemente un eje impulsor del rotor. Cuando se proporciona un segundo rotor, el mezclador deseablemente tendrá una segunda cámara de mezcla con un puerto de entrada que comunique con el puerto de salida de la primera cámara y que tiene su propio puerto de salida.

Los rotores y estátors pueden ser de cualquier material conveniente o combinación de materiales, pero deseablemente serán metálicos o cerámicos, en particular de un metal, tal como acero. Además, si se desea, las superficies de rotor y estátor pueden estar revestidas o tratadas para proporcionar rendimiento óptimo o características para el producto final. La dimensiones de los componentes de rotor y estátor dependerán del material del cual esté realizado el rotor, los límites de tamaño superior de vesícula deseados, velocidades de rotación, diámetros de rotación y viscosidades de mezcla, aunque por lo general, para componentes de acero inoxidable pueden usarse velocidades de rotación de 5000 a 12000 rpm, y mezclas acuosas, diámetros de rotor de hasta 25 cm, por ejemplo 7,5 a 15 cm. Sin embargo, estos parámetros no son limitantes y pueden producirse dispositivos de mezcla útiles en el aparato de la invención con otras dimensiones, materiales y velocidades de operación.

Puesto que el dispositivo de mezcla del aparato de la invención puede generar un efecto de calentamiento notable y puesto que el tamaño y estabilidad de microburbuja pueden verse afectados por la temperatura, es particularmente deseable proporcionar el dispositivo de mezcla con medios de control de temperatura, por ejemplo, calentamiento controlado por un termostato o medios de enfriamiento, tal como una camisa de enfriamiento que rodee la cámara de mezcla o de manera alternativa, un elemento de enfriamiento, tal como un intercambiador de calor dentro o en conexión térmica con el estátor o el rotor, o de manera alternativa o adicional, un elemento de enfriamiento dentro o en conexión térmica con el eje impulsor del rotor o el sello mecánico que rodea al eje impulsor del rotor. La temperatura de la mezcla puede controlarse a la salida de cada cámara de mezcla o en el borde del rotor y esto puede usarse para controlar tal medio de control de temperatura. Además, es deseable proporcionar el dispositivo de mezcla con un elemento de enfriamiento, tal como un intercambiador de calor, en conexión térmica con la corriente de producto de la salida del dispositivo de mezcla, para reducir la temperatura del producto de corriente de producto que fluye fuera del dispositivo de mezcla, por ejemplo, a una temperatura de 20-30 °C, tal como a 25-28 °C. Preferiblemente, la salida está posicionada hacia el fondo del molino.

La tubería de alimentación del aparato se describe en el tercer aspecto.

El aparato incluye además un depósito de alimentación para una composición líquida, tal como una solución de proteína, conectada a la primera entrada de la tubería de alimentación, a través de otras entidades como se describe a continuación. El depósito de alimentación es un depósito de alimentación presurizado que proporciona una presión de alimentación uniforme, y se ha encontrado que esto afecta positivamente a la distribución de tamaño de microburbujas generadas, proporcionando una distribución de tamaño estrecha. El depósito de alimentación es presurizado, por ejemplo, soplando un gas inerte, tal como aire comprimido o nitrógeno gas en el depósito de alimentación. Preferiblemente, este gas se añade a través de un filtro estéril. La presión en el depósito de alimentación es, por ejemplo, 0,5-3,0 x 10⁵ Pa G (igual a 1,5-4,0 x 10⁵ Pa A) y es preferiblemente 1-2 x 10⁵ Pa G. Tal depósito de

alimentación presurizado puede incluir además medios de mezcla, tal como un agitador, proporcionando que se caliente una mezcla homogénea y se suministre al dispositivo de mezcla. El depósito de alimentación es, por ejemplo, de 10-200 litros, tal como 50-150 litros, y proporciona un caudal uniforme, tal como una velocidad de 0,5-3,0 litros por minuto, por ejemplo, 1-2 litros por minuto. El flujo de la solución de proteína del depósito de alimentación y la velocidad de flujo de ésta está controlado y opcionalmente regulado, preferiblemente antes de que se inicie el calentamiento. Esto puede hacerse incluyendo un controlador de flujo y una válvula reguladora en la salida del depósito de alimentación. Además, entre el depósito de alimentación y la tubería de alimentación, la corriente de alimentación de solución de proteína se calienta hasta una temperatura necesaria para conseguir una desnaturalización incipiente de la proteína. Es deseable proveer la corriente de alimentación con medios de control de temperatura, por ejemplo, calentamiento controlado por termostato, tal como por un intercambiador de calor dentro o en conexión térmica con la corriente de alimentación. La temperatura de la corriente de alimentación de solución de proteína puede controlarse antes de que entre en la tubería de alimentación, donde se transferirá calor de la corriente de alimentación de solución de proteína al gas.

El aparato incluye además un depósito de gas conectado a la segunda entrada de la tubería de alimentación, a través de otras entidades como se describe más adelante. El depósito de gas es la fuente del gas que va a ser encapsulado en las microburbujas. El caudal de gas de este se controla y opcionalmente regula, preferiblemente antes de que el gas entre en la tubería de alimentación en la que se calienta. Esta regulación puede hacerse incluyendo un controlador de flujo y una válvula reguladora a la salida del depósito de gas. El depósito de gas proporciona el gas bajo presión, por ejemplo, bajo una presión de $1-4 \times 10^5$ Pa G. El caudal de gas es, por ejemplo, 0,5-2,5 litros/minuto. Sin embargo, la presión del gas en el molino está fijada por el número de revoluciones por minuto y el caudal, y no puede regularse fácilmente por el gas.

En el aparato para eliminar o matar todas las formas de vida microbiana, incluyendo agentes transmisibles pueden incluirse uno o más filtros estériles.

Modos de realización de la invención preferidos se describirán ahora únicamente a modo de ejemplo y con referencia a los dibujos adjuntos, en los que la Figura 1 muestra esquemáticamente un aparato de acuerdo con la invención, y que es útil en la preparación de una composición que comprende microburbujas de gas encapsuladas por una proteína desnaturalizada. Por ello, la Figura 1 muestra un aparato 1 en el que los componentes principales son un dispositivo de mezcla 20, una tubería de alimentación 30, un depósito de alimentación 40 para composición líquida y un depósito de gas 50. El depósito de alimentación 40 comprende una solución líquida 42, tal como, por ejemplo, una solución de albúmina de suero desnaturalizable. En el depósito de alimentación 40 se encuentran los componentes 41, que constituyen la solución que se alimenta. En un modo de realización preferido, tales componentes son albúmina de suero 41a, por ejemplo, proporcionada en una solución al 5 %, agua para inyección 41b y NaCl 41c, preferiblemente en una solución al 0,9 %, constituyendo una solución de albúmina de suero humano 42 al 1 %. Se insufla aire comprimido o nitrógeno gas en el depósito de alimentación 40 a través de un filtro estéril 44, para presurizar el contenido. Además, una unidad de control de temperatura 47 está conectada al depósito de alimentación 40. Para proporcionar una solución homogénea 42, se incluye adicionalmente un agitador 46 en el depósito de alimentación 40. El flujo de la solución de proteína desde el depósito de alimentación 40 está controlado y opcionalmente regulado por un controlador de flujo 62 y una válvula reguladora 64 cerca de la salida del depósito de alimentación 40. Preferiblemente, la solución se hace pasar entonces a través de un filtro estéril 66. Además, entre el depósito de alimentación 40 y la tubería de alimentación 30, la corriente de solución de proteína 42 se calienta hasta una temperatura necesaria para conseguir una desnaturalización incipiente de la proteína usando un intercambiador de calor 68. Después de haberse calentado hasta la temperatura deseada, la solución de proteína entra en la tubería de alimentación 30, a través de una entrada 32.

El depósito de gas 50 proporciona el gas 52 que va a ser encapsulado en las microburbujas. El flujo del gas desde el depósito de gas 50 está controlado y regulado opcionalmente por un controlador de flujo 72 y una válvula reguladora 74 cerca de la salida del depósito de gas 50. Antes de entrar en la tubería de alimentación 30, preferiblemente el gas 52 se hace pasar a través de un filtro estéril 76. El gas entra entonces en la tubería de alimentación 30 a través de una entrada 34, separada de la entrada 32 para la solución de proteína. En la tubería de alimentación 30, se producirá una transferencia de temperatura desde la solución de proteína al gas, garantizando que el gas no se expanda de forma significativa cuando entre en el dispositivo de mezcla 20. La solución de proteína 42 y el gas 52 fluyen fuera de una salida 36 de la tubería 30 y hacia el dispositivo de mezcla 20 a través de una entrada 24, como una composición mezclada. La salida 36 de la tubería de alimentación 30 y la entrada 24 del dispositivo de mezcla 20 pueden estar conectados, por ejemplo, por una abrazadera. El dispositivo de mezcla 20 comprende un molino 22 que comprende un rotor 25 y un estátor 26 donde el rotor 25 es impulsado por un motor 29 y un medio impulsor para el mismo, incluyendo cojinetes 28 y sistemas de enfriamiento opcionales. El producto generado 80, es decir, preferiblemente, una composición de microburbujas de gas encapsuladas por proteína desnaturalizada, es retirado del dispositivo de mezcla preferiblemente en el fondo del molino 22. La temperatura de la corriente de producto 80 se mide opcionalmente y regula usando una unidad de control de temperatura 82, por ejemplo, que comprende un intercambiador de calor.

Las Figuras 2 y 3 muestran tuberías de alimentación alternativas de acuerdo con la invención. La Figura 2a muestra una tubería de alimentación 30 que tiene una primera entrada 32 que proporciona la abertura a una primera sección de tubería 33. La entrada 32, que preferiblemente es para alimentar una solución de proteína, tiene una circunferencia

32a conectable con un tubo o línea de transferencia usando una abrazadera. Una segunda entrada 34, con una circunferencia 34a, proporciona la abertura a una segunda sección de tubería 35, preferiblemente para alimentar un gas. Las secciones de tubería 34 y 35 se unen, visto desde el exterior, en un punto de unión 37, proporcionando una tubería con una pared cilíndrica exterior 38 y una pared longitudinal interior 31 que separa las dos corrientes. La sección de la tubería 30 desde el punto de unión 37 al extremo de la pared longitudinal 31 cerca de la salida 36 proporciona la sección de transferencia de calor. Como se muestra, la pared longitudinal 31 termina poco antes de la salida 36. En otras formas de realización, la pared puede terminar más cercana de, o en la salida 36. La salida 36 de la tubería 30 tiene una circunferencia 36a conectable con una entrada de un dispositivo de mezcla usando, por ejemplo, una abrazadera. La Figura 2b muestra la sección transversal de la sección de transferencia de calor de la tubería 30 que tiene una pared longitudinal 31 y una pared cilíndrica exterior 38. La Figura 2c muestra la tubería 30 desde una vista lateral vista de la salida 36, que tiene una primera entrada 32 con una circunferencia 32a y una segunda entrada 34 con una circunferencia 34a, y que tiene una pared cilíndrica exterior 38.

Las Figura 3 muestra una tubería de alimentación alternativa en la que la Figura 3a muestra la tubería de alimentación 30 que tiene una primera entrada 32 que proporciona la abertura a una primera sección de tubería 33. La entrada 32, que es preferiblemente para alimentar una solución de proteína, tiene una circunferencia 32a. Una segunda entrada 34, con una circunferencia 34a, proporciona la abertura a una segunda sección de tubería 35, preferiblemente para alimentar un gas. Las secciones de tubería 33 y 35 se unen, vistas desde el exterior, en un punto de unión 37, proporcionando una tubería con una pared cilíndrica exterior 38 y que discurre dentro de esta tubería interior 31 para la alimentación de gas. La sección de la tubería 30 desde el punto de unión 37 a la salida 36 proporciona la sección de transferencia de calor. Como se muestra, la tubería interior 31 termina ligeramente fuera de la salida 36, que una salida 39. En otras formas de realización, la tubería puede terminar más cerca de o en la salida o poco antes de la salida 36. La salida 36 de la tubería 30 tiene una circunferencia 36a conectable con una entrada de un dispositivo de mezcla usando, por ejemplo, una abrazadera. La Figura 3b muestra la sección transversal de la sección de transferencia de calor de la tubería 30 que tiene una tubería interior 31 y una pared cilíndrica exterior 38. La Figura 3c muestra la tubería 30 vista desde la salida 36, que tiene una primera entrada 32 con una circunferencia 32a y una segunda entrada 34 con una circunferencia 34a, y que tiene una pared cilíndrica exterior 38.

La invención se ilustrará ahora con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de Optison™

Se han evaluado lotes de Optison™ fabricados de acuerdo con el procedimiento de la invención, y se han comparado con respecto a la variabilidad y predictibilidad con un procedimiento de un tercero. El propósito fue comparar la predictibilidad de dos procedimientos de fabricación con el fin de comprender la futura predictibilidad de calidad de producto.

Material y procedimientos

Se fabricaron 25 experimentos que prepararon lotes de Optison™ por GE Healthcare de acuerdo con el procedimiento reivindicado, y 19 experimentos que prepararon lotes de Optison™ fabricados por un procedimiento de un tercero, se han evaluado y comparado con respecto a variabilidad y predictibilidad.

El procedimiento de GE incluyó el uso de un aparato como el que se muestra en la Figura 1 que incluye una tubería de alimentación en el que se transfiere calor desde la solución de proteína (albúmina de suero humano) al gas (perfluoropropano = OFP) y en el que se mezclan la solución de proteína y el gas justo antes de la etapa de dispersión, usando un molino. Para suministrar la solución de proteína al molino se usó un depósito de alimentación presurizado.

El procedimiento del tercero incluyó un aparato en el que se mezcló una solución de proteína calentada (albúmina de suero humana) con un gas no calentado (OFP) a una distancia de aproximadamente 1 metro antes de que entrara al molino. Para suministrar la solución de proteína al molino se usó una bomba peristáltica.

Resultados

En la Tabla 1 y 2 se presentan los datos en bruto, proporcionando los parámetros usados en los dos procedimientos. Se identificaron los tamaños de partícula promedio y las concentraciones obtenidas.

Tabla 1. Datos del procedimiento de un tercero - para comparación

Orden de ejecución	Velocidad del molino (rpm)	Flujo de albúmina (cm ³ /min)	Flujo de gas OFP (cm ³ /min)	Temp. de albúmina (°C)	MPS [μm]	Conc. [x10 ⁸ microburbujas/ml]
1	11500	1000	950	67	5,21	14,44
2	9000	2000	950	67	4,3	4,1
3	10250	1500	800	70	4,496	9,278
4	9000	2000	650	67	3,8	3,8
5	11500	2000	950	73	3,548	14,79
6	9000	1000	950	73	6,504	4,545
7	9000	2000	950	73	5,9	3,3
8	9000	1000	650	73	6,9	5,8
9	10250	1500	800	70	4,586	9,143
10	11500	2000	950	67	3,022	14,1
11	10250	1500	800	70	4,7	9,3
12	9000	1000	650	67	6,2	5,5
13	11500	2000	650	73	3,135	16,63
14	11500	1000	950	73	5,363	14,09
15	11500	1000	650	73	4,321	19,83
16	9000	1000	950	67	7,074	4,553
17	11500	1000	650	67	4,1	21
18	11500	2000	650	67	2,7	15,92
19	9000	2000	650	73	4,7	3,5

Tabla 2. Datos del procedimiento de GE

Orden de ejecución	Velocidad del molino (rpm)	Flujo de albúmina (cm ³ /min)	Flujo de gas OFP (cm ³ /min)	Temp. de albúmina (°C)	MPS [μm]	Conc. [x10 ⁸ microburbujas/ml]
1	10250	1500	800	69	3,99	11,7
2	9300	1800	840	66	3,83	6,93
3	8800	1500	940	69	3,99	6,3
4	9800	2100	940	68	3,38	7,45
5	9300	1800	840	66,5	3,86	5,97
6	8800	1500	740	66,5	3,97	5,09
7	9800	2100	740	64,5	3,51	6,73
8	8800	2100	940	64,5	3,67	4,21
9	8800	2100	740	67,5	4,19	3,57
10	9800	1500	940	64,5	3,42	9,39
11	9300	1800	840	67	3,69	7,36
12	9300	1800	840	67	3,59	7,16
13	9300	1800	840	66	3,43	6,93
14	9300	1800	840	66	3,5	6,68
15	8500	1000	950	68	3,89	8,04
16	8500	1000	950	68	3,81	8,3
17	8000	1300	1150	70,6	2,78	3,4
18	8500	1000	950	68,1	3,75	6,85
19	9000	700	750	66,3	3,76	9,6
20	8000	1300	750	65,7	3,58	3,1

Orden de ejecución	Velocidad del molino (rpm)	Flujo de albúmina (cm ³ /min)	Flujo de gas OFP (cm ³ /min)	Temp. de albúmina (°C)	MPS [μm]	Conc. [x10 ⁸ microburbujas/ml]
21	8000	700	1150	66,4	3,08	7,7
22	9000	1200	750	72	4,27	7,57
23	9000	1200	750	70	4,19	7,25
24	9000	1400	750	70	4,268	6,62

Se encontraron las desviaciones típicas (SD) (~error cuadrático medio de calibración RMSEC) para el tamaño de partículas obtenido y para la concentración:

Procedimiento de un tercero:

Tamaño de partículas promedio: SD de 0,33 μm

5 Concentración: SD de 1,19 x 10⁸ microburbujas/ml

Procedimiento reivindicado:

Tamaño de partículas: SD de 0,22 μm

Concentración: SD de 0,55 x 10⁸ microburbujas/ml

10 Las desviaciones típicas indican una mayor reproducibilidad de la fabricación, y por ello una mayor predictibilidad de la calidad de producto, aplicando el procedimiento novedoso y mejorado de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar una composición que comprende microburbujas de gas encapsuladas, que comprende las etapas secuenciales de:
 - 5 i) proporcionar una solución acuosa de proteína calentada de una proteína termodesnaturalizable a una temperatura necesaria para alcanzar una desnaturalización incipiente, donde dicha temperatura está en el intervalo de 50-100 °C;
 - ii) calentar un gas usando calor de dicha solución de proteína calentada, donde el gas se calienta hasta una temperatura no menor de 20 °C por debajo de la temperatura de dicha solución de proteína calentada;
 - 10 iii) mezclar el gas calentado de la etapa (ii) y la solución de proteína calentada de la etapa (i) para obtener una mezcla de gas/líquido calentada;
 - iv) dispersar el gas calentado en la solución de proteína sometiendo la mezcla de gas/líquido de la etapa (iii) a fuerzas de cizalla mecánica para formar una composición de microburbujas de gas encapsuladas por proteína desnaturalizada.
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la mezcla de la etapa (iii) se lleva a cabo bien en, o en la proximidad de, la entrada del dispositivo de mezcla usado para proporcionar las fuerzas de cizalla mecánica de la etapa (iv).
3. El procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la solución de proteína se proporciona bajo una presión de alimentación uniforme.
- 20 4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las microburbujas de gas tienen un tamaño de partícula con una desviación típica menor de un 20 % del tamaño de partícula promedio.
5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la proteína es albúmina de suero humano.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la solución de proteína calentada está a una temperatura en el intervalo de 60-80 °C.
- 25 7. Un aparato adecuado para llevar a cabo el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, comprendiendo dicho aparato:
 - i) un dispositivo de mezcla que genera altas fuerzas de cizalla mecánica, y que tiene una entrada y una salida;
 - ii) una tubería de alimentación que comprende
 - una primera entrada y una segunda entrada que proporcionan las aberturas respectivas de dos trayectos,
 - 30 una sección de transferencia de calor que comprende una pared longitudinal que separa los dos trayectos,
 - una salida conectada a la entrada del dispositivo de mezcla;
 - iii) un depósito de alimentación para una composición líquida conectada a la primera entrada de la tubería de alimentación;
 - iv) un depósito de gas conectado a la segunda entrada de la tubería de alimentación.
- 35 8. El aparato según la reivindicación 7, en el que la pared longitudinal está presente en una sección de tubería de la tubería de alimentación, y en el que la pared longitudinal atraviesa el diámetro de la sección de tubería para crear dichos dos trayectos.
9. Un aparato según la reivindicación 7, en el que la pared longitudinal está presente en una sección de tubería de la tubería de alimentación, y en el que la sección de tubería comprende una tubería exterior con una pared cilíndrica exterior, y una tubería interior, en el que dicha tubería interior discurre dentro de la tubería exterior.
- 40 10. El uso de un aparato según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 para preparar una composición que comprende microburbujas de gas encapsuladas como se define en la reivindicación 1.

Figura 1

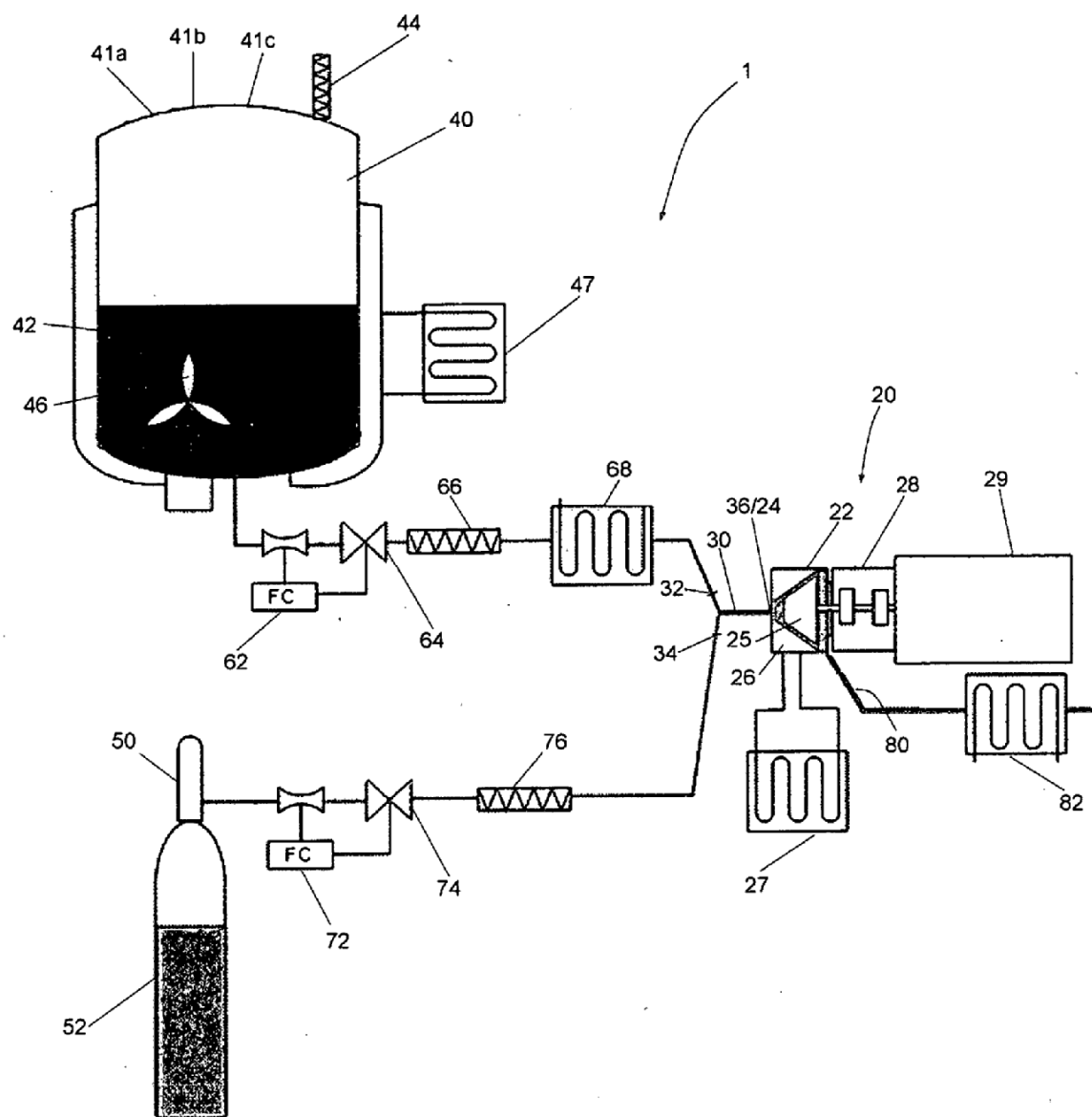


Figura 2a

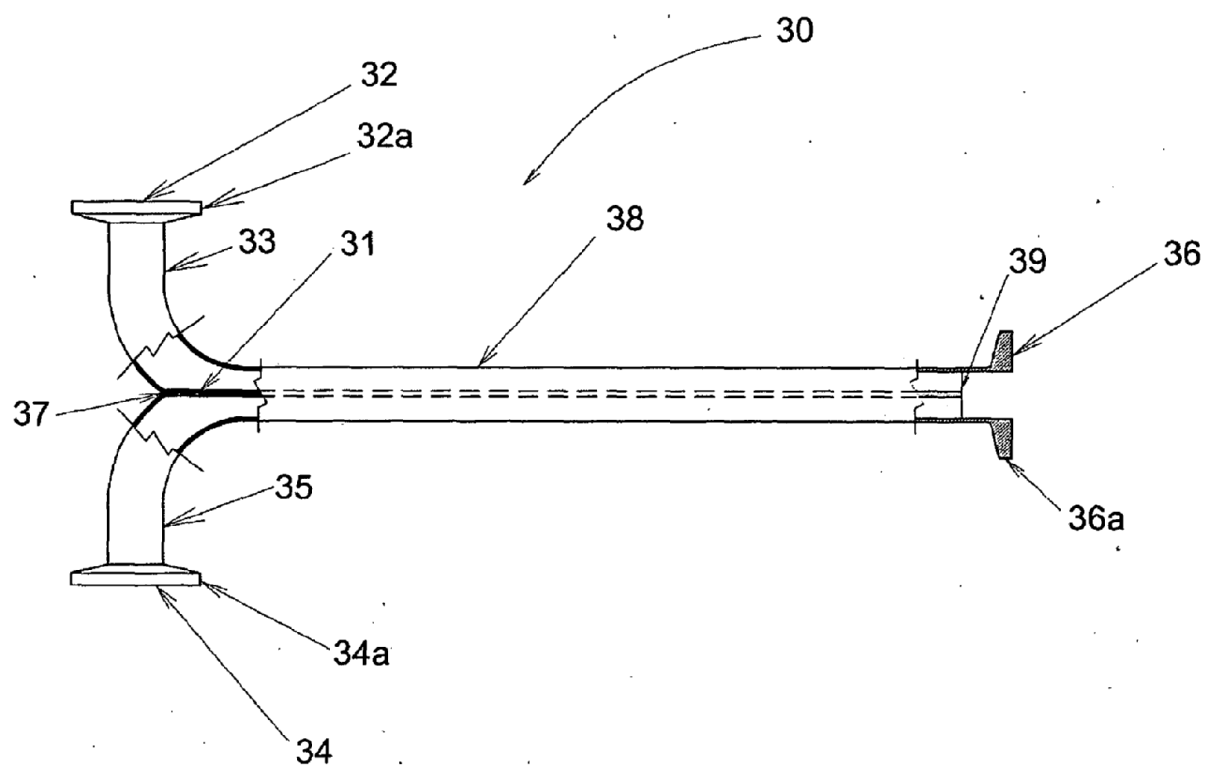


Figura 2b

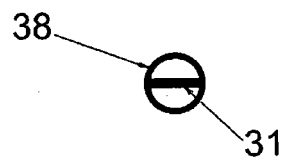


Figura 2c

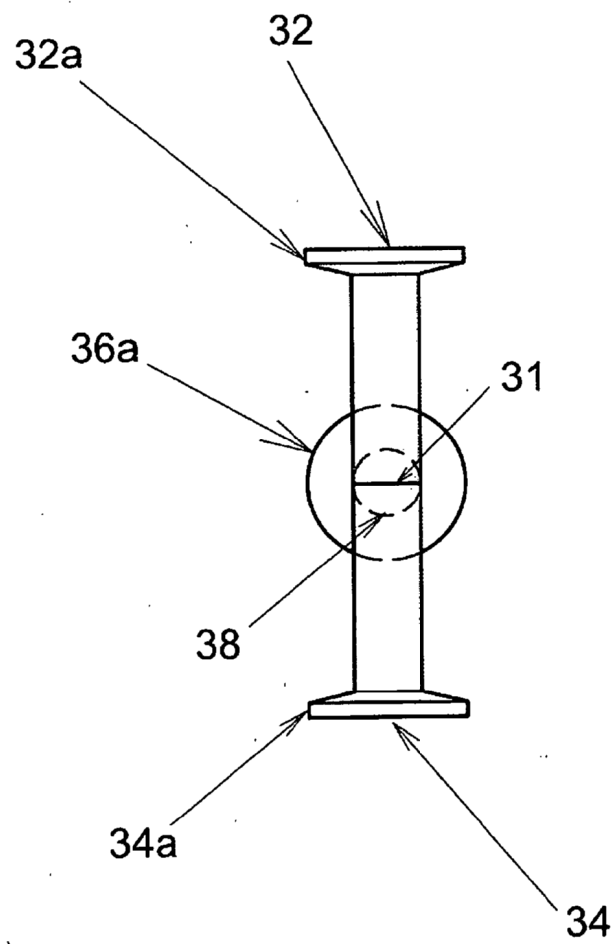


Figura 3a

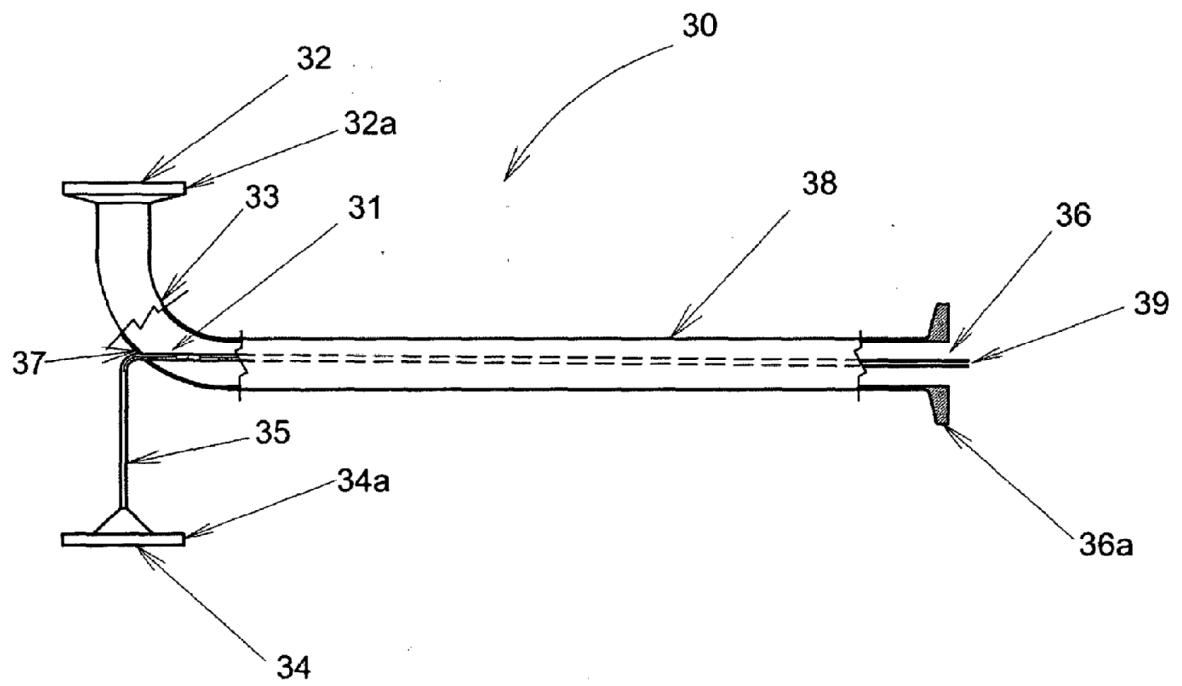


Figura 3b

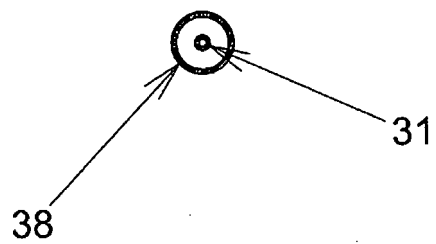


Figura 3c

