

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
A61K 49/22
A61K 49/00



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 97180150.9

[43] 授权公告日 2003 年 4 月 30 日

[11] 授权公告号 CN 1106859C

[22] 申请日 1997. 10. 21 [21] 申请号 97180150.9
[30] 优先权
[32] 1996. 10. 21 [33] GB [31] 9621884.7
[32] 1997. 4. 23 [33] GB [31] 9708239.0
[86] 国际申请 PCT/GB97/02898 1997. 10. 21
[87] 国际公布 WO98/17324 英 1998. 4. 30
[85] 进入国家阶段日期 1999. 5. 27
[71] 专利权人 奈科姆成像有限公司
地址 挪威奥斯陆
[72] 发明人 J·奥斯腾森 M·艾里克森
S·夫里吉斯塔德 P·罗威德
[56] 参考文献
US5536489A 1996. 06. 16 A61B8/12
WO9503835A 1995. 02. 09 A61K49/00
WO9608234A 1996. 03. 21 A61K9/127

审查员 刘菊芳
[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所
代理人 刘金辉

权利要求书 2 页 说明书 62 页

[54] 发明名称 造影剂或与造影剂有关的改进
[57] 摘要

使用新的含气体造影剂制剂对个体、特别是心肌和其它组织灌注进行超声显影，在施用后，所述制剂在体内促进气相可控和暂时地生长，因此可以用作沉积的灌注示踪剂。该制剂包括可共同施用的组合物，所述组合物含有能够向内扩散至所述分散气相内以促进其暂时生长的可扩散组分。在心脏灌注成像中，可将该制剂有利地与血管舒张药如腺苷共同施用，以增强分别从正常的和灌注不足的心肌组织返回的信号强度的差异。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种在超声成像中作为造影剂同时、分别或依次使用的组合制剂，所述制剂含有：

i) 其中分散有气体的可注射含水介质；和

ii) 含可扩散组分的组合物，所述可扩散组分含有至少一种具有或能够在体内产生足够的气体或蒸汽压以便能够促进所述分散气体在体内的可控生长的物质，从而通过衍生于所述的物质的气体或蒸汽分子的向内扩散到气体中来促进所述分散气体的可控生长而至少瞬时增加其尺寸。

2. 权利要求 1 的组合制剂，其中所述分散的气体包括空气、氮气、氧气、二氧化碳、氢气、惰性气体、氟化硫、六氟化硫、任选卤代的硅烷、低分子量烃、酮、酯、卤代低分子量烃或者前述任何物质的混合物。

3. 权利要求 2 的组合制剂，其中所述气体包括全氟化酮、全氟化醚或全氟化碳。

4. 权利要求 3 的组合制剂，其中全氟化碳包括全氟链烷烃、全氟链烯烃或全氟环烷烃。

5. 权利要求 2 的组合制剂，其中所述气体包括六氟化硫或全氟丙烷、全氟丁烷或全氟戊烷。

6. 权利要求 1-5 任一项的组合制剂，其中通过抗融合的表面膜、成膜蛋白质、聚合物材料、非聚合和不可聚合的成壁材料或表面活性剂来稳定所述分散气体。

7. 权利要求 6 的组合制剂，其中所述表面活性剂至少包括一种磷脂。

8. 权利要求 7 的组合制剂，其中至少 75% 的所述表面活性剂材料包括各自携带净总电荷的磷脂分子。

9. 权利要求 8 的组合制剂，其中至少 75% 的成膜表面活性剂材料包括选自磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇、磷脂酸和心肌磷脂的一种或多种磷脂。

10. 权利要求 9 的组合制剂，其中至少 80% 的所述磷脂包括磷脂酰丝氨酸。

11. 权利要求 1-5 任一项的组合制剂，其中将含可扩散组分的所述组合

物进行配制用于经皮、皮下、肌肉内、静脉内或吸入施用。

12. 权利要求 1-5 任一项的组合制剂，其中含所述可扩散组分的所述组合物还含有载体液体。

13. 权利要求 12 的组合制剂，其中所述可扩散组分以水包油乳液或微乳液的形式被分散在含水载体液体中。

14. 权利要求 13 的组合制剂，其中可扩散组分包括脂族醚、多环油、多环醇、杂环化合物、脂族烃、环脂族烃或卤代低分子量烃。

15. 权利要求 14 的组合制剂，其中所述可扩散组分包括全氟化碳。

16. 权利要求 15 的组合制剂，其中全氟化碳包括有全氟链烷烃、全氟链烯烃、全氟环烷烃、全氟环烯烃或全氟化醇。

17. 权利要求 16 的组合制剂，其中所述可扩散组分包括全氟戊烷、全氟己烷、全氟二甲基环丁烷或全氟甲基环戊烷。

18. 权利要求 13-17 任一项的组合制剂，其中所述乳液通过磷脂表面活性剂稳定化。

19. 权利要求 18 的组合制剂，其中至少 75% 的所述磷脂表面活性剂含有各自携带净总电荷的分子。

20. 权利要求 19 的组合制剂，其中至少 75% 的所述磷脂表面活性剂选自磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇、磷脂酸和心肌磷脂。

21. 权利要求 20 的组合制剂，其中至少 80% 的所述磷脂表面活性剂包括磷脂酰丝氨酸。

22. 权利要求 1-5 任一项的组合制剂，还包括血管舒张药物。

23. 权利要求 22 的组合制剂，其中所述血管舒张药物是腺苷。

24. 权利要求 1-5 任一项的组合制剂，还含有治疗药物。

25. 权利要求 1-5 任一项的组合制剂，还包括用于除超声波外的成像方式的提高反差的部分。

造影剂或与造影剂有关的改进

本发明涉及超声波成像，更具体地讲，本发明涉及新的造影剂制剂及其在超声波成像例如显影组织灌注中的用途。

熟知利用微泡的低密度和易压缩性，含气体微泡分散液的造影剂是特别有效的超声反向散射剂。如果经适宜稳定化处理，所述微泡分散液常常可以较小的剂量进行高效的如血管系统和组织微血管系统的超声波显影。

测量血液灌注(即每单位组织量的血液流量)的超声检查法的使用在例如肿瘤检测(肿瘤组织通常与健康组织的血管供应不同)以及如用于检测心肌梗塞的心肌研究中是非常有价值的。用现有超声造影剂进行心脏灌注研究的问题是所得的图像信息量因心脏心室中造影剂引起的弱化而减少。

本发明是以下列发现为基础的，即个体，特别是心肌和其它组织灌注的超声显影可通过含气体的造影剂制剂来达到和/或提高，在施用后，所述制剂在体内促进气相的可控和暂时生长。因此，在组织微血管系统内，例如，可用所述造影剂制剂促进例如微泡形式的气相的可控和暂时的保留，由此，提高所述气体在所述组织中的浓度，从而例如相对于血液提高了其产生回波性。

应理解，就可静脉内施用的微泡超声造影剂而言，这种气体作为沉积灌注示踪剂的使用显著不同于现有的提议。因此，通常认为需要避免微泡的生长，因为如果失控，就会导致很危险的组织栓塞。因此，需要限制施用的剂量和/或使用与选定组合物混合的气体混合物以便通过抑制血液气体向内扩散至微泡中而使气泡在体内的生长减至最小(参见例如 WO-A-9503835 和 WO-A-9516467)。

根据本发明，另一方面，将含有分散气相的组合物与含至少一种物质的组合物共同施用，所述物质具有或能够在体内产生气体或蒸汽

压，从而足以通过衍生于所述物质的气体或蒸汽分子的向内扩散到气相中而促进所述分散气相的可控生长，为了简单起见，下文将所述物质称为“可扩散组分”，但应理解，如下文进一步详细讨论的，在本发明的实施中还额外或另外涉及扩散以外的运输机制。

就如在 WO-A-9416739 中所描述的单独施用挥发性物质(例如以相转变胶体的形式)而言，含分散气相的组合物和含具有适宜挥发度的可扩散组分的组合物的所述共同施用与这一以前的提议相反。因此，如下文详细描述，通过选择共同施用组合物的适宜组分，本发明的造影剂制剂可控制一些因素如分散气体生长的可能性和/或生长速率，而前述相转变胶体的单独施用可能会导致生长失控和不均匀的微泡产生，并且可能达到至少部分微泡可能引起例如心肌血管系统和脑的危险栓塞的程度(参见例如 Schwarz, 回波造影进展 (Advances in Echo-Contrast) [1994(3)], pp. 48-49)。

还发现单独施用相转变胶体不可能使分散相可靠或稳定地在体内挥发以产生气体或蒸汽微泡。Grayburn 等在美国胶体心脏病学杂志 (J. Am. Coll. Cardiol.) 26(5) [1995], pp. 1340-1347 中建议，需预活化全氟戊烷乳液以便在狗中以足以避免血液动力学副作用的低有效成像剂量达到心肌浑浊化。在 WO-A-9640282 中描述了用于所述胶体分散液的活化技术，涉及低压力的应用；通常这包括首先用所述乳液部分填充注射器，随后用力地拉回，然后释放注射器的活塞以产生瞬时压力改变，从而使乳液内形成气体微泡。这是一种本身有些麻烦的技术，这种技术可能不能使活化程度一致。

在 US-A-5536489 中指出，不溶于水的、可形成气体的化合物如全氟戊烷的乳液可用作位点特异性成像的造影剂，在超声能应用至身体需成像的具体位置后，所述乳液只产生显著量的提高成像的气体微泡。我们自己的研究表明，当用本发明两组分造影剂以足以产生清楚的造影效果的能量水平超声时，挥发性化合物如 2-甲基丁烷或全氟戊烷的乳液在体外或体内并未产生可检测的回波增加。

根据本发明的一个方面，提供了在超声成像中作为造影剂同时、

分开或依次使用的组合制剂，所述制剂包括：

- i) 其中分散有气体的可注射含水介质；和
- ii) 一种组合物，含有在体内能够扩散至所述分散气体内以便至少瞬时提高其尺寸的可扩散组分。

根据本发明的另一方面，提供了在人或非人动物个体中产生改善的图像的方法，所述方法包括下列步骤：

- i) 将其中分散有气体的生理上可接受的含水介质注射至所述个体的血管系统内；
- ii) 在注射所述含水介质之前、过程中或之后，给所述个体施用含有在体内能够扩散至所述分散气体内以便至少瞬时提高其尺寸的可扩散组分的组合物；和
- iii) 在所述个体的至少部分区域产生超声图像。

本发明方法可有利地用于显影个体中的组织灌注，提高所用分散气体的尺寸以使气体在所述组织的微血管系统中富集或暂时滞留，由此提高其产生回波性。

在气体分散液中可含有任何生物相容性气体，本文所用术语“气体”包括在 37℃ 的正常人体温度下至少部分，例如基本上或完全是气体（包括蒸汽）形式的任何物质（包括混合物）。因此，气体可包括空气；氮气；氧气；二氧化碳；氢气；惰性气体如氦气、氖气、氩气或氙气；氟化硫如六氟化硫、十氟化二硫或三氟甲基硫五氟化物；六氟化硒；任选卤代的硅烷如甲基硅烷或二甲基硅烷；低分子量烃（例如含至多 7 个碳原子），例如链烷烃如甲烷、乙烷、丙烷、丁烷或戊烷，环烷烃如环丙烷、环丁烷或环戊烷，链烯烃如乙烯、丙烯、丙二烯或丁烯，或炔烃如乙炔或丙炔；醚如二甲醚；酮；酯；卤代低分子量烃（例如含至多 7 个碳原子）；或前述任何物质的混合物。优选在卤代气体中的至少部分卤原子是氟原子；因此，生物相容性卤代烃气体可选自例如一溴一氟二氟甲烷，一氟二氟甲烷、二氟二氟甲烷，一溴三氟甲烷，一氟三氟甲烷，一氟五氟乙烷，二氟四氟乙烷，一氟三氟乙烯，氟乙烯，乙基氟化物，1, 1-二氟乙烷和全氟化碳。代表性的全氟化碳包括全氟

链烷烃如全氟甲烷, 全氟乙烷, 全氟丙烷, 全氟丁烷(例如全氟正丁烷, 任选地与其他异构体如全氟异丁烷混合), 全氟戊烷, 全氟己烷或全氟庚烷; 全氟链烯烃如全氟丙烯, 全氟丁烯(例如全氟丁-2-烯), 全氟丁二烯, 全氟戊烯(例如全氟戊-1-烯)或全氟-4-甲基戊-2-烯; 全氟炔烃如全氟丁-2-炔; 和全氟环烷烃如全氟环丁烷, 全氟甲基环丁烷, 全氟二甲基环丁烷, 全氟三甲基环丁烷, 全氟环戊烷, 全氟甲基环戊烷, 全氟二甲基环戊烷, 全氟环己烷, 全氟甲基环己烷或全氟环庚烷。其他卤代气体包括氯甲烷, 氟化(例如全氟化的)酮如全氟丙酮和氟化(例如全氟化的)醚如全氟二乙醚。从含所述气体的微泡在血流中的公知高稳定性来看, 使用全氟化气体例如六氟化硫和全氟化碳如全氟丙烷, 全氟丁烷, 全氟戊烷和全氟己烷是特别有利的。也可以使用其它有生理化学特征的气体, 所述生理特征可使所述气体在血流中形成高度稳定的微泡。

例如用任何适宜的含气体的超声造影剂制剂作为含气体组合物, 可以任何方便的形式施用分散的气体。所述制剂的代表性例子包括通过如下材料稳定化(例如至少部分包封)的气体微泡: 抗聚结表面膜(如明胶, 如 WO-A-8002365 所述)、成膜(filmogenic)蛋白(例如白蛋白, 如人血清白蛋白, 如 US-A-4718433, US-A-4774958, US-A-4844882, EP-A-0359246, WO-A-9112823, WO-A-9205806, WO-A-9217213, WO-A-9406477 或 WO-A-9501187 所述)、聚合物材料(例如 EP-A-0398935 中所述的合成的生物可降解聚合物, EP-A-0458745 中所述的弹性界面合成聚合物膜, EP-A-0441468 中所述的微粒状生物可降解聚醛, EP-A-0458079 中所述的微粒状聚氨基酸-聚环状酰亚胺的 N-二羧酸衍生物, 或者如 WO-A-9317718 或 WO-A-9607434 所述的生物可降解聚合物)、非聚合的和不可聚合的成壁材料(如 WO-A-9521631 中所述)或表面活性剂(例如聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物表面活性剂如 Pluronic, 在 WO-A-9506518 中描述的聚合物表面活性剂, 或成膜表面活性剂如磷脂, 例如在 WO-A-9211873, WO-A-9217212, WO-A-9222247, WO-A-9428780, WO-A-9503835 或 WO-A-9729783 中所述)。

其它有用的含气体造影剂制剂包括含气体的固体体系,例如其中含有气体或结合有气体(例如被吸附在其表面和/或被包含在空隙、洞或孔中,如 EP-A-0122624, EP-A-0123235, EP-A-0365467, WO-A-9221382, WO-A-9300930, WO-A-9313802, WO-A-9313808 或 WO-A-9313809 所述)的微粒(特别是微粒聚集体)。应理解,所述微粒状造影剂的产生回波性直接来自于含有的/结合的气体和/或从固体材料中释放(如微粒状结构溶解后)的气体(例如微泡)。

与含气体造影剂制剂有关的上述所有文献的公开内容均引入本文作为参考。

气体微泡和其他含气体材料如微粒优选具有一初始平均尺寸,其不超过10微米(例如7微米或更小)以便使其在例如通过静脉内注射施用后自由通过肺系统。但是,若微泡例如含有一种或多种较具血溶性或扩散性气体如空气、氧气、氮气或二氧化碳与一种或多种基本上不溶的和不可扩散气体如全氟化碳的混合物时,可使用较大的微泡。施用后,所述可溶性/扩散性气体的向外扩散将会使所述微泡迅速收缩至由所含的不溶性/不可扩散性气体量所决定并可经选择以使所得微泡通过肺系统的肺毛细管的尺寸。

由于根据本发明施用的分散气体在体内通过与可扩散组分的相互作用而生长,所以所施用的微泡、与固体结合的气体等的最小尺寸可显著小于通常认为提供与超声波具有显著相互作用所需的尺寸(在常规使用的成像频率下,通常约1-5微米);因此,分散的气体部分的尺寸可小至例如1nm或1nm以下。因此,本发明可以使用迄今为止由于分散气体部分的尺寸小,而未被提议用作超声造影剂的含气体组合物。

若根据本发明例如以磷脂-稳定化的气体微泡形式使用含磷脂的组合物,则有用磷脂的代表性例子包括卵磷脂(即磷脂酰胆碱),例如天然卵磷脂如蛋黄卵磷脂或大豆卵磷脂,半合成(如部分或全部氢化的)卵磷脂和合成的卵磷脂如二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱,二棕榈酰磷脂酰胆碱或二硬脂酰磷脂酰胆碱;磷脂酸;磷脂酰乙醇胺;磷脂酰丝氨酸;

磷脂酰甘油；磷脂酰肌醇；心肌磷脂；神经鞘磷脂；任何前述物质的氯化类似物；任何前述物质的混合物和与其他类脂如胆固醇的混合物。例如按 WO-A-9729783 所述，使用例如在天然（如大豆或蛋黄衍生的）、半合成（如部分或全部氢化的）以及合成的磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇、磷脂酸和/或心肌磷脂中主要（例如至少 75%）含各自带净总电荷如负电荷的分子的磷脂是特别有利的。

可在本发明中使用的含气体的微粒状材料的代表性例子包括碳水化合物（如己糖类如葡萄糖、果糖或半乳糖；二糖类如蔗糖，乳糖或麦芽糖；戊糖类如阿拉伯糖，木糖或核糖； α -、 β -和 γ -环糊精；多糖如淀粉、羟乙基淀粉，直链淀粉，支链淀粉，糖原，菊粉，短根霉多糖，葡聚糖，羧甲基葡聚糖，磷酸葡聚糖，酮基葡聚糖、氨乙基葡聚糖、藻酸盐、聚糖氨乙基几丁质，脱乙酰几丁质，透明质酸或肝素；和糖醇，包括醛醇如甘露糖醇或山梨糖醇），无机盐（如氯化钠），有机盐（如柠檬酸钠，醋酸钠或酒石酸钠），X-射线造影剂（任何市售的羧酸和非离子酰胺造影剂，如在甲泛影酸，泛影酸，碘拉酸，碘克沙酸，碘海醇，碘喷托，碘帕醇，碘克沙醇，碘普罗胺，甲泛葡胺，胆影酸，胆影酸葡胺，醋碘苯酸葡胺，泛影葡胺中通常在 3-和/或 5-位含至少一个带取代基的 2,4,6-三碘苯基，取代基如羧基，氨基甲酰基，N-烷基氨基甲酰基，N-羟基烷基氨基甲酰基，酰基氨基；N-烷基酰基氨基或酰基氨基甲基）以及多肽和蛋白质（如明胶或白蛋白如人血清白蛋白）。

可在本发明中使用的其它含气体材料包括通过金属稳定化的含气体材料（如在 US-A-3674461 或 US-A-3528809 中所述的），通过合成聚合物稳定化的含气体材料（如在 US-A-3975194 或 Farnand 在粉末技术（Powder Technology）22[1979], pp. 11-16 中描述的），Expancel® 型市售微球，如 Expancel 551 DE（参见例如，欧洲塑料通讯（Eur. Plast. New）9(5)[1982], p. 39，无纺布物工业（Nonwovens Industry）[1981], p. 21 和塑料及弹性体材料（Mat. Plast. Elast.）10[1980], p. 468），Ropaque® 型市售微球（参见例如涂料技术杂志 55(707)[1983], p. 79），微米级和毫微米级的含气体结构如沸石，无

机或有机气凝胶，毫微米级的含开口空隙的化学结构如富勒烯（fullerenes）、笼形包合物或 nanotubes（如 G. E. Gadd 在科学 277(5328) [1997], pp. 933-936 中描述的）和天然表面活性剂稳定化的微泡分散液（例如 d'Arrigo 在“稳定的液包气乳液物理和理论化学研究” 40-Elsevier, Amsterdam [1986] 中描述的）。

根据本发明可使用各种可扩散组分，包括气体/蒸汽，挥发性液体，挥发性固体和例如施用后能够产生气体的前体，主要要求是所述组分应具有或能够在体内产生足够的气体或蒸汽压（例如至少 10 托）以便能够促进气体或蒸发分子向内扩散至分散的气体中。应理解，如果需要，根据本发明，可以使用两种或多种可扩散组分的混合物；解释本文的“可扩散组分”时，包括所述混合物。同样，施用可扩散组分也应包括施用两种或多种所述组分，可以作为混合物施用，也可多次施用。

含所述可扩散组分的组合物可采用任何适宜的形式并可通过任何适宜的方法施用，施用的途径部分取决于待研究的个体区域。因此，例如若需促进气体在胃肠道壁组织的暂时滞留，那么口服施用含可扩散组分的适宜组合物是特别有用的。在所述应用的代表性实施方案中，可以与用于超声心动描记术类似的剂量静脉内注射气体分散液，可将所述可扩散组分配制成可口服的乳液，例如按下文的进一步详细描述以 0.2-1.0 μ l 全氟化碳/kg 的剂量使用的水包全氟化碳乳液。两种组合物施用并分布后，在胃或肠壁毛细血管血液中气体分散液的生长可增加与这些区域的轮廓反差。应理解可口服施用的气体分散液与静脉内可注射的可扩散组分的逆转组合可用于提供与胃肠系统的内壁和粘膜的轮廓反差。

当使用所述可口服施用的气体分散液或可扩散组分组合物时掺入化学基团或物质是有利的，所述化学基团或物质例如通过与组合物混合或通过与其组分如表面活性剂或其他稳定化部分的结合而促进与胃肠道壁的粘附，因为这样可通过增加其与可扩散组分的接触来刺激分散气相的生长。所述促进粘附的基团/物质的例子以前已就例如胃肠

X-射线造影剂作过描述，并包括如在 WO-A-9722365 中描述的丙烯酸酯，如在 US-A-5468466 中描述的碘代酚磺酸酯和在 US-A-5260049 中描述的碘代苯酯。

例如可以吸入适宜的挥发性可扩散组分以便在其刚通过肺毛细血管之后促进所施用的气体分散液的生长，例如从而使所述气体暂时保留在心肌的毛细血管中。在所述实施方案中，通过增加可扩散组分的肺压，例如使肺压升高至多 0.5 巴，例如通过使用呼吸器或使个体抗阻呼气而进一步提高分散气体的生长。

若需将组分的作用具体地限制在个体的特定靶区，则肌肉内或皮下注射适当配制的可扩散组分组合物是有利的，例如掺入生理上可接受的液体。一种用于皮下注射的组合物例子含有毫微米级颗粒如用于淋巴血管造影术的颗粒。皮下注射的可扩散组分可以被淋巴系统吸收，在淋巴系统中所述组分可引起静脉内注射的气体分散液的生长，从而有利于淋巴结成像。将皮下注射的气体分散液和静脉内注射的可扩散组分颠倒组合同样也是可以的。

静脉内注射适当配制的可扩散组分组合物，例如掺入生理学可接受的载体液体，可以使本发明有相当多的用途，因为如在下文更详细讨论的，可以选择气体分散液和可扩散组分组合物的组成以控制分散气体生长的开始和速率等参数，从而控制其中通过气体在例如组织微血管系统中的暂时滞留可以提高组织产生回波性的身体部分。

可经皮肤应用适宜的局部制剂以便促进可扩散组分的经皮吸收。在以身体四肢如腿的外周循环为目标时，所述施用可应用于皮肤、皮下组织和相邻区域及器官成像和/或治疗。

可将例如用于口服或注射的可扩散组分配制成在水和/或一种或多种水混溶性的以及生理学可接受的有机溶剂如乙醇、甘油或聚乙二醇中的溶液或与它们的混合物；用含水介质配制成分散液，例如作为水包油乳液的油相或油相的成分；微乳液，即其中物质被有效溶解于含水介质中表面活性剂胶束的疏水内部的体系；或者与用适宜的载体液分散的微粒或毫微米级颗粒结合，例如被吸附在微粒或毫微米级颗

粒表面和/或被包含在微粒或毫微米级颗粒空隙、洞或孔内，或被包封在微胶囊内。

若可扩散组分作为溶液施用，在体内衍生于可扩散组分的分压将取决于所述组分例如在血流中的浓度，以及在接近理想的系统中，例如根据 Raoult's 法则，纯组分材料的相应压力。因此，如果所述组分的水溶解度低，理想的是，在正常体温下，它在纯形式应具有足够的蒸汽压，例如至少 50 托，优选至少 100 托。具有高蒸汽压的相对水不溶性组分的例子包括前文所列的作为可能的微泡气体的那些气体。

因此，在体温下具有较低蒸汽压的、有更高水溶性/水混溶性的可扩散组分的代表性例子包括脂族醚如乙基甲基醚或甲基丙基醚；脂族酯如乙酸甲酯，甲酸甲酯或甲酸乙酯；脂族酮如丙酮；脂族酰胺如 N, N-二甲基甲酰胺或 N, N-二甲基乙酰胺；脂族腈如乙腈。

但是，优选在适宜的含水介质中使用显著水不混溶性的可扩散组分配制成乳液（即稳定化的悬浮液），因为在所述体系中，可扩散组分在水相中的蒸汽压将基本上等于纯组分材料的压力，甚至在很稀的乳液中也是如此。在所述实施方案中，可将可扩散组分例如配制成专有注册药物乳液如 Intralipid® (Pharmacia) 的一部分。

在加工和贮存温度，例如如果水相含有适宜的防冻材料，则所述温度可低至 -10℃，所述乳液中的可扩散组分有利的是液体，而在体温下是气体或显示出明显的蒸汽压。适宜的化合物例如可选自前述 WO-A-9416379 中给出的可乳化低沸点液体的各种，该文献的内容引入本文作为参考。可乳化的可扩散组分的具体例子包括脂族醚如乙醚；多环油类或醇类如薄荷醇，樟脑，桉叶醇；杂环化合物如呋喃或二噁烷；脂族烃，可以是饱和的或不饱和的以及直链的或支链的，例如正丁烷，正戊烷，2-甲基丙烷，2-甲基丁烷，2, 2-二甲基丙烷，2, 2-二甲基丁烷，2, 3-二甲基丁烷，1-丁烯，2-丁烯，2-甲基丙烯，1, 2-丁二烯，1, 3-丁二烯，2-甲基-1-丁烯，2-甲基-2-丁烯，异戊二烯，1-戊烯，1, 3-戊二烯，1, 4-戊二烯，丁烯炔，1-丁炔，2-丁炔或 1, 3-丁二炔；环脂族烃例如环丁烷，环丁烯，甲基环丙烷或环戊烷；以及卤代低分

子量烃(例如含至多 7 个碳原子)。代表性的卤代烃包括二氯甲烷, 溴甲烷, 1, 2-二氯乙烯, 1, 1-二氯乙烷, 1-溴乙烯, 1-氯乙烯, 溴乙烷, 氯乙烷, 1-氯丙烯, 3-氯丙烯, 1-氯丙烷, 2-氯丙烷和叔丁基氯。有利的是至少部分卤原子是氟原子, 例如二氯一氟甲烷, 三氯一氟甲烷, 1, 2-二氯-1, 2-二氟乙烷, 1, 2-二氯-1, 1, 2, 2-四氟乙烷, 1, 1, 2-三氯-1, 2, 2-三氟乙烷, 2-溴-2-氯-1, 1, 1-三氟乙烷, 2-氯-1, 1, 2-三氟乙基二氟甲基醚, 1-氯-2, 2, 2-三氟乙基二氟甲基醚, 部分氟化的链烷烃(例如五氟丙烷如 1H, 1H, 3H-五氟丙烷, 六氟丁烷, 九氟丁烷如 2H-九氟-叔丁烷和十氟戊烷如 2H, 3H-十氟戊烷), 部分氟化的链烯烃(如七氟戊烯如 1H, 1H, 2H-七氟戊-1-烯和九氟己烯如 1H, 1H, 2H-九氟己-1-烯), 氟化的醚(如 2, 2, 3, 3, 3-五氟丙基甲基醚或 2, 2, 3, 3, 3-五氟丙基二氟甲基醚), 更优选的是全氟化碳。全氟化碳的例子包括全氟链烷烃例如全氟丁烷, 全氟戊烷, 全氟己烷(如全氟-2-甲基戊烷), 全氟庚烷, 全氟辛烷, 全氟壬烷和全氟癸烷; 全氟环烷烃如全氟环丁烷, 全氟二甲基-环丁烷, 全氟环戊烷和全氟甲基环戊烷; 全氟链烯烃如全氟丁烯(如全氟丁-2-烯或全氟丁-1, 3-二烯), 全氟戊烯(如全氟戊-1-烯)和全氟己烯(如全氟-2-甲基戊-2-烯或全氟-4-甲基戊-2-烯); 全氟环烯烃例如全氟环戊烯或全氟环戊二烯; 以及全氟化醇如全氟叔丁醇。

所述乳液还可含有至少一种表面活性剂以便稳定所述分散液; 这可以与用于稳定气体分散液的任何表面活性剂相同或不同。任何所述表面活性剂的性质可显著影响如分散气相的生长速率这样的因素。总之, 许多表面活性剂都可以是有用的, 例如选自 EP-A-0727225 给出的大量例子, 该文献的内容引入本文作为参考。有用的表面活性剂的代表性例子包括脂肪酸(如含 10-20 个碳原子的直链饱和的或不饱和的脂肪酸)和碳水化合物和其甘油三酯, 磷脂(如卵磷脂), 含氟磷脂, 蛋白质(如白蛋白如人血清白蛋白), 聚乙二醇和嵌段共聚物表面活性剂(如聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物如 Pluronic, 增量聚合物如酰氧基酰基聚乙二醇, 例如聚乙二醇甲基醚 16-十六烷酰氧基-十六烷酸

酯，例如其中聚乙二醇部分的分子量为 2300，5000 或 10000)，含氟的表面活性剂(以 Zonyl 和 Fluorad 商标销售的产品，或 WO-A-9639197 中描述的，该文献的内容引入本文作为参考)。特别有用的表面活性剂包括含有带净总负电荷的分子的磷脂，如天然的(如大豆或蛋黄衍生的)，半合成的(如部分或全部氢化的)和合成的磷脂酰丝氨酸，磷脂酰甘油，磷脂酰肌醇和磷脂酸和/或心肌磷脂。

用于静脉内注射的乳液中，分散的可扩散组分的液滴尺寸优选应小于 10 微米，例如小于 7 微米，但大于 0.1 微米以便有利于不受阻碍地通过肺系统。

如上所述，还可将水不混溶性的可扩散组分配制成微乳液。所述体系由于其热力学稳定性和可扩散组分实际上均匀地分布在水相中的事实而是有利的；因此，微乳液具有溶液的外观，但就分散相的分压而言，却表现出乳液的特性。

可使用的气体前体包括任何在体内即在体温和生理 pH 下能够产生气体的生物相容性组分。代表性的例子包括无机和有机碳酸盐和碳酸氢盐，产氮物质如吡唑啉，吡唑，三唑啉，重氮酮，重氮盐，四唑和叠氮化物。应理解，在所述体系中，实际可扩散组分是最终产生的气体。

为了确保施用后可扩散组分的最大挥发作用并提高分散气体的生长，这两者都是吸热过程，有利的是在施用前控制可扩散组分的溶液或悬浮液和/或气体分散液的温度和/或向其中掺入放热反应成分；使用在超声照射的影响下发生放热反应的所述成分是特别有利的。

分散气相在体内的生长例如可伴有任何包封材料(其具有足够的柔软性)的膨胀和/或从施用的材料中抽出过量的表面活性剂至正在生长的气-液界面。但是，包封材料的拉伸和/或所述材料与超声波的相互作用也可能显著地增加其孔隙率。迄今为止，在许多情况下，已发现包封材料的所述破裂导致通过由此暴露的气体向外扩散和溶解而迅速损失产生回波性，但我们已发现，当用本发明的造影剂制剂时，暴露的气体基本上是稳定的。尽管不希望受理论计算的限制，但我们认

为例如释放的微泡形式的暴露气体可以通过由可扩散组分产生的过饱和环境而被稳定化，从而例如避免微泡的破裂，所述可扩散组分提供向内的压力梯度，抵消了微泡气体向外的扩散趋势。由于基本上没有包封材料，所以暴露的气体表面可使造影剂制剂表现出异常好的声学特性，这可从高反向散射和低能量吸收(如由高反向散射：衰减比例表示)得到证实；这种产生回波的作用可持续相当长的时期，甚至在连续超声照射过程中。

因此，利用共同施用的可扩散组分的稳定化作用，可以大大提高现有含气体造影剂制剂的产生回波性的持续时间和强度，而当单独施用该造影剂组合物时，这些参数是不够的。因此，例如白蛋白基造影剂的作用时间常常受包封的白蛋白材料破裂的严重限制，或者是由于心脏或静脉系统中收缩压变化或者是由于超声照射，但通过与本发明可扩散组分的共同施用可使所述作用时间显著增加。

在本发明方法的代表性实施方案中，选择含气体分散液的组合物和含可扩散组分悬浮液的组合物，以便至少部分分散的气相通过肺，然后，在通过肺后，通过可扩散组分的向内扩散而迅速生长，从而使所述气相暂时保留在心肌中，并由此可进行心肌灌注的超声显像。由于血流中挥发性可扩散组分的浓度降低，例如由于通过肺除去和由个体呼出，通过代谢或再分配至其它组织，所述组分被从血液中清除，所述可扩散组分通常将扩散出分散的气体，因此，分散的气体将收缩至其初始的较小尺寸，并最终又可以在血流中自由地流动，其通常由网状内皮系统从血流中除去。这种产生回波性的瞬时显著增加，接着造影剂的消失的模式明显不同于单独施用这两种组合物之一时所表现出的任何产生回波性能。因此，从前文可以理解，对所述分散气体的滞留时间的控制可通过适当调整可扩散组分的剂量和/或配方来达到。

其它毛细血管系统，例如包括但不限于肾、肝、脾、甲状腺、骨骼肌、乳腺和阴茎同样可进行成像。

应理解通过适当选择气体和任何包封的稳定化材料，更具体地讲

是所述可扩散组分的性质和配制可扩散组分的方式，包括所用的任何表面活性剂的性质和所述组分被配制成乳液时分散相液滴的尺寸，总的来说，就可控制分散气体的生长速率和/或生长程度等因素；就配制成乳液时分散相液滴的尺寸来说，对于给定量的乳化的可扩散组分，液滴尺寸的减小，相对于较大的液滴，可提高可扩散组分的转移速率，因为具有较大表面积：体积比的较小液滴可发生更迅速的释放。可以控制的其它参数包括施用的两种组合物的相对量，以及当所述组合物是分别施用时，施用的顺序、两次施用的时间间隔和两次施用的可能的空间间隔。就最后一点而言，应理解可扩散组分的内在扩散性可使其以各种方式例如吸入、经皮、皮下、静脉内、肌肉内或口服应用到身体的不同部分，而现有的用于施用分散气体的形式则或多或少更受限制。

就可扩散组分而言，特别重要的参数是其在水/血液中的溶解度和其扩散性(例如用其扩散常数表示)，这些参数将决定其通过载体液体或血液的运输速率，以及其通过包封分散气体的任何膜的渗透性。可扩散组分在体内产生的压力也将影响其扩散至分散气体中的速率，其浓度也是一样。因此，根据 Fick's 法则，相对于例如单个气体微泡与乳液液滴之间距离而言，可扩散组分的浓度梯度以及可扩散物质在周围液体介质中的扩散系数将决定通过简单扩散的转移速率；浓度梯度通过可扩散组分在周围介质中的溶解度和单个气体微泡和乳液液滴之间的距离来确定。

如果需要，例如通过调整分散气相组合物和/或可扩散组分组合物的粘度，例如通过将一种或多种生物相容性粘度增加剂如 X-射线造影剂、聚乙二醇、碳水化合物、蛋白质、聚合物或醇掺入制剂中，可控制可扩散组分的有效运输速率。例如可有利地以较大体积的药团(在 70kg 人个体的情况下，有至少 20ml 的体积)共注射两种组合物，因为这样可延缓所述成分与血液的完全混合(且因此延缓分散气体生长的开始)，直到其进入右心室和肺毛细血管后再混合。分散气体的生长延缓可通过载体液体的使用达到最大程度，所述载体液体就本文所定义的

气体和任何其他可扩散组分而言，例如由于被冷却而是欠饱和的。

如上所述，本发明的操作还涉及除扩散以外的运输机制。因此，通过周围液体介质中的流体动力学流动，也可进行运输；在可发生高剪切速率流动的血管和毛细管中，这是很重要的。可扩散组分向分散气体的运输也可能因例如气体微泡和乳液液滴之间的碰撞或近碰撞过程而发生，例如导致可扩散组分吸附在微泡表面和/或渗入微泡中，即呈融合形式。在这类情形中可扩散组分的扩散系数和溶解度对转移速率、可扩散组分的颗粒尺寸（例如配成乳液时的液滴尺寸）以及微泡与液滴之间的碰撞频率具有最小的影响，而后三者是控制微泡生长的速率和程度的主要因素。因此，例如对给定量的乳化的可扩散组分而言，液滴尺寸的减小将导致液滴总数增加且因而可以通过降低气体微泡与乳液液滴之间的平均粒间距离并因此增加碰撞和/或融合的可能性而增加转移速率。应理解若通过施加超声能量对气体微泡和可扩散组分的乳液液滴赋予额外的振动式运动，可以显著提高通过碰撞过程而进行的转移速率。由这种超声能量引起的碰撞过程的动力学不同于在载体液体和/或血液中运输可扩散组分动力学，例如不同之处为必须要有特定的能量水平来引起碰撞的气体微泡和乳液液滴发生融合。因此有利的是选择乳液液滴的尺寸并因此选择其质量，以使其与振动的微泡产生足够的碰撞力而引起融合。

如上所述，任何包封分散气相的材料的渗透性是可能影响该气相的生长速率的参数，且因此理想的是选择易于渗透任何这类包封材料（例如可以是聚合物或表面活性剂膜，例如单层或一个或多个双层成膜表面活性剂如磷脂）的可扩散组分。但是，我们已发现也可以使用基本上不可渗透的包封材料，因为所施用的本发明组合造影剂制剂的声处理，包括以低于和高于医学超声成像正常所用且具有连续照射或简单或复杂的脉冲图案的频率的声处理（例如在 10 Hz-1 GHz，优选 1 kHz-10MHz），本身可促进或提高所述分散气体的生长。通过用于影响调查的超声照射或通过初级定位照射，可诱导所述生长，例如定位照射用于影响特定靶器官微血管系统中气体的暂时滞留。或者，通过应

用足够量的其它形式的能量，例如振荡、振动、电场、辐射或例如用中性颗粒、离子或电子进行颗粒轰击来诱发分散气体生长的激活作用。

尽管我们不希望受理论的限制，但是超声处理至少瞬时改变了包封材料的渗透性、在周围液相中可扩散组分的可扩散性和/或乳液液滴与包封微泡间的碰撞频率。由于可用极短的超声脉冲(例如在 B 模式成像时持续约 $0.3\mu\text{s}$ 或在 Doppler 或第二谐波成像 (Second harmonic imaging) 时为约 $2\mu\text{s}$) 观察到所述影响，因此它不可能是一种调整的 (rectified) 扩散，其中连续的超声照射使气泡的平衡半径稳定增加 (参见 Leighton, E. G. - “声学泡 (The Acoustic Bubble)”, Academic Press [1994], p. 379)，而且超声脉冲可能破坏包封膜，由此提高了分散气体通过可扩散组分向内扩散至因此暴露的气相中而生长。

如果需要，分散气体或可扩散组分可包括共沸混合物或者可加以选择以便共沸混合物在可扩散组分与分散气体混合时在体内形成。可有效地利用所述共沸物形成作用以提高在标准条件下在正常人体温度 37°C 时是液体的相对高分子量的化合物如卤代烃如碳氟化合物 (包括全氟化碳) 的挥发性，从而在该温度下可以气体形式施用所述化合物。就含所述共沸混合物的造影剂在体内的有效产生回波期而言，这是非常有益的，因为已知象化合物如碳氟化合物的水溶解性、脂肪溶解性、扩散性和耐压性等参数随分子量的增加而减小。

总之，在制备、贮存和处理过程中以及施用后，共沸混合物对其成分分离作用的公认天然抗性将提高含所述混合物的造影剂组分的稳定性。

参考有关共沸物的文献、通过试验研究和/或通过理论预测，例如按 Tanaka 在流体相平衡 (Fluid Phase Equilibria) 24(1985), 187-203 页、Kittel, C. 和 Kroemer, H. 在热物理 (Thermal Physics) 第 10 章 (W. H. Freeman & Co., New York, USA, 1980) 或 Hemmer, P. C. 在静态力学 (Statistisk Mekanikk) 第 16 - 22 章 (Tapir, Trondheim, Norway, 1970) 中所述，选择可用于本发明的共沸混合物，所述文献

的内容引入本文作为参考。

将较高分子量组分的沸点有效降至正常体温以下的共沸物的一个文献例子是在 US-A-4055049 中描述的 1,1,2-三氟-1,2,2-三氟甲烷 (b. p. 47.6°C) 和 1,2-二氟甲烷 (b. p. 29.6°C) 的 57:43 w/w 混合物, 其共沸点为 24.9°C。含卤代烃的共沸混合物的其它例子描述于 EP-A-0783017、US-A-5599783、US-A-5605647、US-A-5605882、US-A-5607616、US-A-5607912、US-A-5611210、US-A-5614565 和 US-A-5616821, 所述文献的内容引入本文作为参考。

Simons 等在化学物理杂志, 18(3) (1950), 335-346 页中报道全氟正戊烷 (b. p. 29°C) 与正戊烷 (b. p. 36°C) 的混合物与 Raoult's 法则有较大的正偏差; 约等摩尔混合物的效果最好。在实践中, 发现共沸混合物的沸点是约 22°C 或更低。总之, 全氟化碳和未取代烃的混合物具有有用的共沸特性; 具有基本类似沸点的所述组分的混合物有强共沸作用。其它全氟化碳: 烃共沸物的例子包括全氟正己烷 (沸点 59°C) 和正戊烷的混合物, 其中共沸物的沸点在室温和 35°C 之间, 全氟-4-甲基戊-2-烯 (沸点 49°C) 和正戊烷的混合物, 所述共沸物的沸点为约 25°C。

其它很有用的共沸混合物包括氟烷与乙醚的混合物和两种或多种氟化气体的混合物, 例如全氟丙烷与氟乙烷、全氟丙烷与 1,1,1-三氟乙烷, 或者全氟乙烷与二氟甲烷。

已知氟化气体如全氟乙烷可与二氧化碳形成共沸物 (参见, 例如 WO-A-9502652)。因此, 含所述气体的造影剂的施用可在体内与血液气体如二氧化碳形成三元或更高的共沸物, 由此进一步提高了分散气体的稳定性。

若将本发明组合造影剂制剂的两组合物同时施用, 则可用不同的注射器经适宜的联合装置注射或者优选在控制的条件下预混合以避免过早的微泡生长。

将用于同时施用前混合的组合物有利的是贮存在适宜的双或多室装置中。因此, 例如可将气体分散液组合物或其干燥的前体 [例如在含

两亲材料的含水介质中包含气体微泡悬浮液的冻干残余物，特别是其中所述两亲材料主要由磷脂组成(例如至少 75%，优选基本上完全是)，所述磷脂含有各自带总净(负)电荷的分子]放在第一室如小瓶中，含可扩散组分组合物的注射器与其密封相连；用膜或塞将注射器出口密封以避免早期混合。注射器活塞的拔出使膜破裂并使可扩散组分组合物与气体分散液组分混合或者与其前体混合并重建其前体；然后，如果需要，可振荡和/或稀释，将混合物取出(例如通过注射器)并施用。

或者，将两种组合物贮存在一个密封的小瓶或注射器中，两种组合物可由例如膜或活塞分隔开；可将气体或蒸汽超压应用至两组合物中之一或同时应用至其上。例如通过将皮下注射针插入小瓶中，使膜或活塞破裂而使所述组合物混合；如果需要，通过手振荡可提高混合程度，此后，取出混合物并施用。同样可使用其它实施方案，例如其中含气体分散液组合物的干燥前体的小瓶装有所述前体再分散液的第一注射器和含可扩散组分组合物的第二注射器，或者其中含膜-分隔开的可扩散组分组合物和气体分散液组合物的干燥前体的小瓶装有所用于后者的再分散液的注射器。

其中在施用前，在制造阶段或随后将气体分散液组合物与可扩散组分组合物混合的本发明实施方案中，通常将所述混合物贮存在较高的压力或较低的温度下，以便可扩散组分的压力不足以使分散的气体生长。简单地通过释放过量压力或通过加热至体温，然后施用所述混合物可诱导分散气体生长的激活作用，或者如果需要，通过在施用前立即预热所述混合物来激活。

在气体分散液组合物和可扩散组分组合物分别施用的本发明实施方案中，可利用两次施用之间的时间控制来影响分散气相主要生长的身体区。因此，例如，可先注射可扩散组分，使其在肝中浓缩，由此提高在随后注射气体分散液时所述器官的成像。若气体分散液的稳定性允许，也可先注射所述气体分散液，使其在肝中浓缩，接着施用可扩散组分以提高其产生回波性。

可在本发明中使用的成像形式包括二维和三维成像技术,例如 B 模式成像(例如,使用从发射的超声波脉冲的基频、从次谐波或其较高谐波或者从所述发射脉冲和所述谐波衍生的总或差频产生的信号包线随时间变化的幅度,优选从基频或其第二谐波产生的图像),彩色 Doppler 成像、Doppler 幅度成像和后两种技术与上述任何其它形式的组合。对于给定剂量的气体分散液和可扩散组分组合物,已发现在随后的 B 模式成像过程中,用彩色 Doppler 成像超声波诱导分散气体的生长可产生更强的造影效果,这可能是使用了较高的超声波强度造成的。为了减少运动的影响,借助适宜的同步技术(例如选通(gating to)个体的 ECG 或呼吸运动)可收集组织如心或肾的连续图像。测量伴随分散气体生长的共振频率或频率吸收的变化,也可用于检测造影剂。

应理解本发明组合造影剂制剂的分散气体含量以一定的浓度暂时保留在组织中,所述浓度与组织灌注的区域率成正比。因此,当使用图像直接来自返回信号强度的超声成像模式如常规的或谐波 B 模式成像时,可将所述组织的图像解释为灌注图,其中表现出的信号强度是局部灌注的函数。这与用自由流动的造影剂得到的图像相反,后者中造影剂的区域浓度和相应的返回信号强度取决于实际的血液含量而不是局部组织的灌注速率。

在心脏研究中,若根据本发明的该实施方案,灌注图来自返回信号强度,有利的是使患者经受物理或药理学压力(stress)以便提高正常灌注的心肌与窄动脉供应的心肌区之间的区别,由此提高图像强度方面的差异。正如从放射性核素心脏成像中已知的,所述压力可诱导血管舒张并增加健康心肌组织中的血流,而在由窄动脉供应的灌注不足的组织中的血流基本上无改变,因为小动脉血管舒张的能力已被内在的自我调节作用耗尽,这种内在的自我调节作用是寻求提高受限制的血流。

作为物理练习或通过施用肾上腺素能激动剂以药理学方式施加的压力可引起不适如可能患心脏病患者组中患者的胸痛,因此,优选通

过施用血管舒张药物来提高健康组织的灌注,所述药物选自腺苷、双嘧达莫、硝酸甘油、单硝酸异山梨酯、哌唑嗪、多沙唑嗪、双肼屈嗪、肼屈嗪、硝普钠、pentoxifylline、amlodipine、非洛地平、伊拉地平、硝苯地平、尼莫地平、维拉帕米、地尔硫草和氧化亚氮。在腺苷的情况下,这会使健康心肌组织的冠状动脉中的血流增加4倍,大大提高本发明造影剂的摄入和暂时滞留,并因此显著提高正常与灌注不足的心肌组织之间的返回信号强度差别。由于涉及必需的物理截留过程,因此,本发明造影剂的滞留是非常有效的;这可以与放射性核素示踪剂如铊 201 和铟 sestamibi 的摄入相比拟,所述示踪剂的摄入受示踪剂和组织之间接触时间短的限制,并因此在示踪剂分布于血液池的整个过程(铊闪烁法为4-6分钟)中,均需保持血管舒张以确保效果最佳。另一方面,本发明的造影剂没有这种扩散或运输限制,且因为例如通过停止产生生长的超声波照射也可以迅速终止其在心肌组织中的滞留,因此,达到本发明本实施方案的心脏灌注成像所需的血管舒张期是很短的,例如不到1分钟。这将减少因施用血管舒张药物给患者引起的任何可能不适的时间。

就所需的血管舒张仅需持续很短的时间来看,腺苷是特别有用的血管舒张药物,因为它是一种内源物质并且持续作用时间很短,由血液池半衰期表明仅有2秒钟。因此,在心脏中的血管舒张作用最强,因为所述药物在低于药理学活性浓度下就可到达更远端的组织。应理解,由于半衰期短,在本发明本实施方案的心脏成像过程中,可能需要重复注射或输注腺苷;例如开始施用150 μ g/kg腺苷,基本上同时施用造影剂组合物,10秒钟后,例如在20秒钟内缓慢再注射150 μ g/kg腺苷。

有利的是可将本发明的造影剂制剂用作生物活性部分如治疗药物的传递剂(即对活人或非人动物的具体疾病有有益作用的试剂),特别是传递至靶位点。因此,例如可将治疗化合物放在分散的气体中,可例如通过共价键或离子键,如果需要,通过间隔臂与包封壁或者基质的部分相连,或者物理混合至该包封或基质材料中;如果治疗化合物

和包封材料或基质材料具有类似的极性 or 溶解度, 则所述最后一种方案是特别适宜的。

利用分散气体的可控生长特性, 使其暂时滞留在所需靶区的微血管系统中; 用超声波照射来诱导生长并因此使气体和结合的治疗化合物滞留在靶结构中是特别有利的。还可利用本文上述气体分散液组合物, 或更优选可扩散组合物的定位注射来集中分散气体在靶区的生长。

如果需要可与对特异性细胞、结构或病理学位点具有亲和性的位点-特异性载体相连的治疗化合物可因例如分散气体生长引起的包封材料或基质材料的拉伸或破裂、包封材料或基质材料的加溶或者微泡或微粒的崩解(例如通过超声处理或通过靶区可扩散组分浓度梯度的逆转而引起)而释放。若治疗药物与包封壁或基质化学相连, 则该键或与其相连的间隔臂有利的是含有一个或多个可裂解以释放所述药物的不稳定基团。代表性的可裂解基团包括在体内例如通过水解和/或酶催作用可生物降解的酰胺、酰亚胺、亚胺、酯、酸酐、缩醛、氨基甲酸酯、碳酸盐、碳酸酯和二硫化物基团。

用于本发明本实施方案的代表性和非限制性药物实例包括抗肿瘤药物如长春新碱、长春碱、长春地辛、白消安、苯丁酸氮芥、螺铂、顺铂、卡铂、甲氨蝶呤、阿霉素、丝裂霉素、博来霉素、阿糖胞苷、阿糖腺苷、巯嘌呤、米托坦、丙卡巴肼、放线菌素 D (actinomycin D)、柔红霉素、盐酸阿霉素、紫杉酚、普卡霉素、氮鲁米特、雌莫司汀、氟他胺、亮丙瑞林 (leuprolide)、醋酸甲地孕酮、他莫昔芬、睾内酯、曲洛司坦、安吖啶 (m-AMSA)、天冬酰胺酶 (L-天冬酰胺酶)、依托泊苷、干扰素 α -2a 和 2b、血液产品如血卟啉或前述药物的衍生物; 生物反应改性剂如胞壁酰肽 (muramylpeptides); 抗真菌剂如酮康唑、制霉菌素 (nystatin)、灰黄霉素、氟胞嘧啶、咪康唑或两性霉素 B; 激素或激素类似物如生长激素、促黑素细胞激素、雌二醇、二丙酸倍氯米松、倍他米松、醋酸可的松、地塞米松、氟尼缩松、氢化可的松、甲泼尼龙、醋酸帕拉米松、泼尼松龙、泼尼松、曲安西龙或

乙酸氟氢可的松；维生素如维生素 B 12 或类维生素 A；酶如碱性磷酸酶或超氧化歧化酶；抗过敏药如 amalexanox；抗凝剂如苄丙酮香豆素、苄丙香豆素或肝素；抗血栓形成药物；促进循环的药物如普萘洛尔；代谢增效剂如谷胱甘肽；抗结核药如对氨基水杨酸、异烟肼、硫酸卷曲霉素、cyclosexine、乙胺丁醇、乙硫异烟胺、吡嗪酰胺、利福平或硫酸链霉素；抗病毒剂如阿昔洛韦、金刚烷胺、叠氮胸苷、利巴韦林或阿糖腺苷；血管舒张剂如地尔硫卓、硝苯地平、维拉帕米、四硝赤醇、硝酸异山梨酯、硝酸甘油或戊四硝酯；抗生素如氨苄青霉素、氯霉素、新霉素、头孢克洛、头孢羟氨苄、头孢氨苄、头孢拉定、红霉素、克林霉素、林可霉素、阿莫西林、氨苄西林、巴氨西林、羧苄青霉素、双氯青霉素、环青霉素、picloxacillin、海他西林、甲氧西林、萘夫西林、青霉素或四环素；抗炎剂如二氟尼柳、布洛芬、吲哚美辛、meclefenamate、甲芬那酸、萘普生、保泰松、吡罗昔康、托美丁、阿司匹林或水杨酸盐；抗原生动物剂如氯喹、甲硝唑、奎宁、锑酸葡胺；抗风湿剂如青霉胺；麻醉剂如阿片樟脑酊；阿片制剂如可待因、吗啡、鸦片；强心苷如脱乙酰毛花甙、洋地黄毒甙、地高辛、洋地黄甙或洋地黄；神经肌肉阻断剂如阿曲库铵甲磺酸盐、加拉碘铵、溴己氨胆碱、碘甲筒箭毒、泮库溴铵、氯化琥珀胆碱、氯化筒箭毒碱或维库溴铵；镇静剂如异戊巴比妥、异戊巴比妥钠、阿普比妥、仲丁巴比妥钠、水合氯醛、乙氯维诺、己炔蚁胺、盐酸氟安定、格鲁米特、盐酸甲氧异丁胺、甲乙呱酮、盐酸咪达唑仑、副醛 (paraldehyde)、戊巴比妥、司可巴比妥钠、他布比妥、替马西洋或三唑仑；局部麻醉剂如布比卡因、氯普鲁卡因、依替卡因、利多卡因、甲哌卡因、普鲁卡因或丁卡因；全身性麻醉剂如氟哌利多、依托咪酯、枸橼酸芬太尼与氟哌利多、盐酸氯胺酮、美索比妥钠或硫喷妥和可药用盐 (如酸加成盐如盐酸盐或氢溴酸盐，或者碱盐如钠、钙或镁盐) 或其衍生物 (如乙酸盐)；和放射性化学物质，如含 β 发射体的化学物质。特别重要的是抗血栓形成药如维生素 K 拮抗剂、肝素和具有肝素样活性的药物如抗凝血酶 III, dalteparin 和依诺肝素；血小板凝集抑制剂如噻氯匹定、

阿司匹林、双嘧达莫、伊洛前列素和 abciximab; 和溶栓酶如链激酶和纤溶酶原激活物。治疗药物的其它例子包括遗传物质例如核酸、天然或合成的 RNA 和 DNA, 包括重组 RNA 和 DNA。将编码特定蛋白质的 DNA 用于治疗许多不同的疾病。例如肿瘤坏死因子或白细胞介素-2 可治疗晚期癌症; 胸苷激酶可治疗卵巢癌或脑肿瘤; 白细胞介素-2 可治疗成神经细胞瘤、恶性黑素瘤或肾癌; 白细胞介素-4 可治疗癌症。

本发明的造影剂制剂可用作载体, 用于除超声波以外的成像模式如 X 射线、光成像、磁共振, 更优选闪烁成像剂的造影-提高部分。可利用分散气相的可控生长将所述造影剂定位在个体体内的所需区域, 例如, 利用超声照射靶器官或组织以诱导所述造影剂的所需的可控生长和暂时滞留, 然后用适宜的非超声成像形式成像。

本发明造影剂制剂还可用作治疗活性物质的载体, 所述治疗活性物质不需从所述制剂中释放即可表现出其治疗效果。所述制剂例如可掺入放射性原子或离子如 β -发射体, 所述放射性原子或离子在分散气相生长以及所述造影剂暂时滞留在靶位点后, 表现出定位发射辐射的作用。应理解, 优选应将所述造影剂设计成在所需的治疗辐射剂量被施用前, 不会发生分散气体的随后收缩以及分散气体停止滞留。

另外, 本发明的造影剂制剂本身还可有治疗特性。因此, 例如可将分散气体导向引起肿瘤的毛细管并可通过阻断所述毛细管而作为细胞毒性剂起作用。因此, 可以通过应用定位的超声波能来获得可控的和定位栓塞; 这本身或与其它治疗方法结合都是很重要的。在高温治疗中, 分散气体在毛细管中的浓度还可以增加超声波能的吸收; 这可用于例如治疗肝肿瘤。在所述应用中, 用相对高能量(例如 5W)聚焦的超声波束(如 1.5MHz)照射是适宜的。

应理解, 本发明包括含有其中分散有气体的含水介质以及含有可扩散组分作为主要物质组分的组合物的制剂及其用于非成像剂目的的用途。

下列非限制性实施例用来说明本发明。

实施例 1-制剂

a) 全氟丁烷气体分散液

将 2%丙二醇纯水 (20ml) 溶液中的氢化磷脂酰丝氨酸 (100mg) 加热至 80℃ 并保持 5 分钟, 然后使所得分散液冷却至室温过夜。以每份 1ml 转移至 2ml 小瓶中, 将每份上方的液面上空间用全氟丁烷气体冲洗, 然后将小瓶用用于牙科材料的 Espe CapMix® 混合器振荡 45 秒, 得到乳白色微泡分散液, 用 Coulter Counter 测得其体积平均直径为 5.0μm (所有 Coulter Counter 测定均用装有 50μm 孔径、测定范围为 1-30μm 的仪器在室温下进行; 用 Isoton II 作为电解质)。

b) 冷冻干燥的全氟丁烷气体分散液的分散液

将实施例 1(a) 的乳白色分散液样品通过离心并除去次层清液 (infranant) 洗涤 3 次, 然后向其中加入等体积 10% 的蔗糖溶液。将得到的分散液冷冻干燥, 然后重新分散在蒸馏水中, 得到乳白色微泡分散液, 用 Coulter Counter 测得其体积平均直径为 3.5μm。

c) 2-甲基丁烷乳液

将氢化磷脂酰丝氨酸 (100mg) 在纯净水 (20ml) 中加热至 80℃ 并保持 5 分钟, 然后使所得分散液冷却至 0℃ 过夜。将 1ml 分散液转移至 2ml 小瓶中, 向其中加入 200μl 2-甲基丁烷 (沸点 28℃)。然后将小瓶用 CapMix® 振荡 45 秒钟得到可扩散组分的乳液, 不用时将其于 0℃ 保存。用 Coulter Counter 测得乳液液滴的体积平均直径为 1.9μm。

d) 全氟戊烷乳液

重复实施例 1(c) 的过程但用全氟戊烷 (沸点 29℃) 代替 2-甲基丁烷。不用时, 将得到的可扩散组分的乳液于 0℃ 保存。

e) 2-氯-1, 1, 2-三氟乙基二氟甲基醚乳液

重复实施例 1(c) 的过程但用 2-氯-1, 1, 2-三氟乙基二氟甲基醚

(沸点 55-57℃)代替 2-甲基丁烷。不用时,将得到的可扩散组分的乳液于 0℃ 保存。

f) 2-溴-2-氯-1,1,1-三氟乙烷乳液

重复实施例 1(c)的过程但用 2-溴-2-氯-1,1,1-三氟乙烷(沸点 49℃)代替 2-甲基丁烷。不用时,将得到的可扩散组分的乳液于 0℃ 保存。

g) 1-氯-2,2,2-三氟乙基二氟甲基醚乳液

重复实施例 1(c)的过程但用 1-氯-2,2,2-三氟乙基二氟甲基醚(沸点 49℃)代替 2-甲基丁烷。不用时,将得到的可扩散组分的乳液于 0℃ 保存。

h) 含气体聚合物/人血清白蛋白颗粒的分散液

将根据 WO-A-9607434 的实施例 3(a)制备的人血清白蛋白包衣的含气体聚合物(从亚乙基二(16-羟基十六烷酯)和己二酰二氯制得)颗粒(100mg)在研钵中压碎并通过在实验室振荡器上振荡 24 小时将其分散在 0.9%氯化钠水溶液(10ml)中。

i) 含气体聚合物/明胶颗粒的分散液

将根据 WO-A-9607434 的实施例 3(a)制备的明胶包衣的含气体聚合物(从亚乙基二(16-羟基十六烷酯)和己二酰二氯制得)颗粒(100mg)在研钵中压碎并通过在实验室振荡器上振荡 24 小时将其分散在 0.9%氯化钠水溶液(10ml)中。

j) 2-甲基丁烷乳液

重复实施例 1(c)的过程但将乳液在临用前稀释 10 倍,不用时在冰浴中保存。

k) 全氟戊烷乳液

重复实施例 1(d)的过程但将乳液在临用前稀释 10 倍, 不用时在冰浴中保存。

l) 全氟戊烷乳液

将氢化磷脂酰丝氨酸(100mg)在纯净水(20ml)中加热至 80℃并保持 5 分钟, 然后使所得分散液冷却至 0℃过夜。将 1ml 分散液转移至 2ml 小瓶中, 向其中加入 100μl 全氟正戊烷(沸点 29℃)。然后将小瓶用 CapMix®振荡 75 秒钟得到可扩散组分的乳液, 不用时将其于 0℃保存。用 Coulter Counter 测得乳液液滴的体积平均直径为 2.9μm。

m) 全氟丁烷乳液

重复实施例 1(1)的过程但用全氟丁烷(沸点-2℃)代替全氟戊烷。不用时, 将得到的可扩散组分的乳液于 0℃保存。

n) 通过声处理制备的全氟戊烷乳液

将氢化磷脂酰丝氨酸(500mg)在纯净水(100ml)中加热至 80℃并保持 5 分钟, 然后使所得分散液冷却至室温过夜。将 10ml 分散液转移至 30ml 小瓶中, 向其中加入全氟戊烷(1ml)。将得到的混合物声处理 2 分钟得到可扩散组分的分散液, 其中液滴的平均直径<1μm。

o) 全氟戊烷乳液

重复实施例 1(1)的过程但将全氟戊烷的体积减少至 60μl。不用时, 将得到的可扩散组分的乳液于 0℃保存。

p) 全氟戊烷乳液

重复实施例 1(1)的过程但将全氟戊烷的体积减少至 20μl。不用时, 将得到的可扩散组分的乳液于 0℃保存。

q) 全氟戊烷：全氟-4-甲基戊-2-烯(1: 1)乳液

重复实施例 1(1)的过程但将全氟戊烷用 50 μ l 全氟戊烷(沸点 29 $^{\circ}$ C)和 50 μ l 全氟-4-甲基戊-2-烯(沸点 49 $^{\circ}$ C)的混合物代替。不用时, 将得到的可扩散组分的乳液于 0 $^{\circ}$ C 保存。用 Coulter Counter 测得乳液液滴的体积平均直径为 2.8 μ m。

r) 全氟戊烷：1H, 1H, 2H-七氟戊-1-烯(1: 1)乳液

重复实施例 1(1)的过程但将全氟戊烷用 50 μ l 全氟戊烷(沸点 29 $^{\circ}$ C)和 50 μ l 1H, 1H, 2H-七氟戊-1-烯(沸点 30-31 $^{\circ}$ C)的混合物代替。不用时, 将得到的可扩散组分的乳液于 0 $^{\circ}$ C 保存。

s) 通过二硬脂酰基磷脂酰胆碱：二硬脂酰基磷脂酰丝氨酸(1: 1)稳定化的全氟戊烷乳液

重复实施例 1(1)的过程但将氢化磷脂酰丝氨酸用二硬脂酰基磷脂酰胆碱(50mg)和二硬脂酰基磷脂酰丝氨酸钠盐(50mg)的混合物代替。不用时, 将得到的可扩散组分的乳液于 0 $^{\circ}$ C 保存。

t) 通过二硬脂酰基磷脂酰胆碱：二硬脂酰基磷脂酰丝氨酸(3: 1)稳定化的全氟戊烷乳液

重复实施例 1(1)的过程但将氢化磷脂酰丝氨酸用二硬脂酰基磷脂酰胆碱(75mg)和二硬脂酰基磷脂酰丝氨酸钠盐(25mg)的混合物代替。不用时, 将得到的可扩散组分的乳液于 0 $^{\circ}$ C 保存。

u) 通过二硬脂酰基磷脂酰胆碱：二硬脂酰基磷脂酰甘油(3: 1)稳定化的全氟戊烷乳液

重复实施例 1(1)的过程但将氢化磷脂酰丝氨酸用二硬脂酰基磷脂酰胆碱(75mg)和二硬脂酰基磷脂酰甘油钠盐(25mg)的混合物代替。不用时, 将得到的可扩散组分的乳液于 0 $^{\circ}$ C 保存。

v) 通过氢化磷脂酰胆碱：氢化磷脂酰丝氨酸(11: 1)稳定化的全氟戊烷乳液

重复实施例 1(1)的过程但将氢化磷脂酰丝氨酸用 100mg 氢化磷脂酰胆碱和氢化磷脂酰丝氨酸(11: 1)的混合物代替。不用时，将得到的可扩散组分的乳液于 0℃ 保存。

w) 通过二硬脂酰基磷脂酰胆碱：二硬脂酰基磷脂酰丝氨酸(3: 1)稳定化的全氟-4-甲基戊-2-烯乳液

重复实施例 1(1)的过程但将氢化磷脂酰丝氨酸用二硬脂酰基磷脂酰胆碱(75mg)和二硬脂酰基磷脂酰丝氨酸钠盐(25mg)的混合物代替并将全氟戊烷用全氟-4-甲基戊-2-烯代替。不用时，将得到的可扩散组分的乳液于 0℃ 保存。

x) 通过二硬脂酰基磷脂酰胆碱：二硬脂酰基磷脂酰丝氨酸(3: 1)稳定化的全氟戊烷：全氟-4-甲基戊-2-烯(1: 1)乳液

重复实施例 1(w)的过程但将全氟-4-甲基戊-2-烯用 50μl 全氟戊烷和 50μl 全氟-4-甲基戊-2-烯的混合物代替。不用时，将得到的可扩散组分的乳液于 0℃ 保存。

y) 通过二硬脂酰基磷脂酰胆碱：二硬脂酰基磷脂酰甘油(3: 1)稳定化的全氟戊烷：全氟-4-甲基戊-2-烯(1: 1)乳液

重复实施例 1(x)的过程但将二硬脂酰基磷脂酰丝氨酸钠盐用二硬脂酰基磷脂酰甘油钠盐代替。不用时，将得到的可扩散组分的乳液于 0℃ 保存。

z) 全氟萘烷：全氟丁烷乳液

将氢化磷脂酰丝氨酸(100mg)在含水甘油(5.11%)/丙二醇(1.5%)(20ml)中加热至 80℃ 并保持 5 分钟，然后使所得分散液冷却至 0℃ 过夜。将 1ml 分散液转移至 2ml 小瓶中，向其中加入 100μl 用全氟丁烷

(沸点 -2°C)饱和的全氟萘烷(沸点 $141-143^{\circ}\text{C}$)。然后将小瓶用 CapMix®振荡 60 秒得到可扩散组分的乳液，不用时将其于 0°C 保存。

aa) 全氟萘烷：全氟丙烷乳液

重复实施例 1(z)的过程但将用全氟丁烷饱和的全氟萘烷用全氟丙烷(沸点 -39°C)饱和的全氟萘烷代替。不用时，将得到的可扩散组分的乳液于 0°C 保存。

ab) 全氟萘烷：六氟化硫乳液

重复实施例 1(z)的过程但将用全氟丁烷饱和的全氟萘烷用六氟化硫(沸点 -64°C)饱和的全氟萘烷代替。不用时，将得到的可扩散组分的乳液于 0°C 保存。

ac) 用 Fluorad FC-170C 稳定化的全氟戊烷乳液

将 1ml Fluorad FC-170C(200mg)在纯净水(20ml)中的分散液转移至 2ml 小瓶中，向其中加入 $100\mu\text{l}$ 全氟正戊烷。然后将小瓶用 CapMix®振荡 75 秒得到可扩散组分的乳液，不用时将其于 0°C 保存。

ad) 用 Pluronic F68: Fluorad FC-170C 稳定化的全氟戊烷乳液

将 $100\mu\text{l}$ 10%的 Pluronic F68 溶液加入到 $200\mu\text{l}$ 1% Fluorad FC-170C 和 $700\mu\text{l}$ 纯净水中。将得到的混合物转移至 2ml 小瓶中，向其中加入 $100\mu\text{l}$ 全氟正戊烷。然后将小瓶用 CapMix®振荡 75 秒钟得到可扩散组分的乳液，不用时将其于 0°C 保存。将该乳液的样品转移至有螺旋盖的塑料小瓶(2.8ml)内并将其在水浴中声处理 2 分钟(脉冲声处理：每秒 1 次)。用 Coulter Counter 测得超声乳液液滴的体积平均直径为 $0.99\mu\text{m}$ 。

ae) 通过均化作用制备的用 Pluronic F68: Fluorad FC-170C 稳定化的全氟戊烷乳液

将 1ml 10%的 Pluronic F68 溶液加入到 2ml 1% Fluorad FC-170C 和 7ml 纯净水中, 然后向得到的混合物中加入 1ml 全氟正戊烷。将由此得到的分散液通过转子/定子均化器以 23000rpm 均化 2 分钟。将得到的乳液转移至有螺旋盖的塑料小瓶(10ml)内并将其在水浴中声处理 2 分钟(脉冲声处理: 每秒 1 次)。

af) 全氟戊烷乳液

将氢化磷脂酰丝氨酸(250mg)在纯净水(100ml)中加热至 80℃ 并保持 5 分钟, 然后使所得分散液冷却至 0℃ 过夜。将 1ml 分散液转移至 2ml 小瓶中, 向其中加入 100μl 全氟戊烷。然后将小瓶用 CapMix® 振荡 75 秒钟得到可扩散组分的乳液, 不用时将其于 0℃ 保存。

ag) 冷冻干燥的全氟丁烷气体分散液的分散液

将实施例 1(a)的乳白色分散液样品通过离心并除去次层清液洗涤 3 次, 然后向其中加入等体积 10%的蔗糖溶液。将得到的分散液冷冻干燥, 然后重新分散在蒸馏水中, 得到乳白色微泡分散液, 用 Coulter Counter 测得其体积平均直径为 2.6μm。

ah) 全氟丙烷气体分散液

重复实施例 1(a)的过程但用全氟丙烷气体代替全氟丁烷气体。用 Coulter Counter 测得所得乳白色微泡分散液的体积平均直径为 2.6μm。

ai) 全氟戊烷乳液

将氢化磷脂酰丝氨酸(100mg)在纯净水(100ml)中加热至 80℃ 并保持 5 分钟, 然后使所得分散液冷却至 0℃ 过夜。将 1ml 分散液转移至 2ml 小瓶中, 向其中加入 100μl 全氟戊烷。然后将小瓶用 CapMix® 振荡 75 秒钟得到可扩散组分的乳液, 不用时将其于 0℃ 保存。

aj) 通过振荡制备的用 Brij 58: Fluorad FC-170C 稳定化的全氟戊烷乳液

将 Brij 58(400mg)加入到 0.1% Fluorad FC-170C 溶液(10ml)中并室温搅拌 1 小时。将 1ml 所得溶液转移至 2ml 小瓶中, 向其中加入 100 μ l 全氟戊烷。然后将小瓶用 CapMix®振荡 75 秒钟得到可扩散组分的乳液, 不用时将其于 0℃ 保存。

ak) 通过声处理制备的用 Brij 58: Fluorad FC-170C 稳定化的全氟戊烷乳液

将 Brij 58(400mg)加入到 0.1% Fluorad FC-170C 溶液(10ml)中并室温搅拌 1 小时。然后加入 1ml 全氟戊烷并将所得混合物声处理 2 分钟得到小滴可分散组分的乳液。不用时将该溶液于 0℃ 保存。

al) 全氟-4-甲基戊-2-烯乳液

重复实施例 1(1)的过程但将全氟戊烷用全氟-4-甲基戊-2-烯(沸点 49℃)代替。不用时, 将由此得到的可扩散组分的乳液于 0℃ 保存。

am) 1H, 1H, 2H-七氟戊-1-烯乳液

重复实施例 1(1)的过程但将全氟戊烷用 1H, 1H, 2H-七氟戊-1-烯(沸点 30-31℃)代替。不用时, 将由此得到的可扩散组分的乳液于 0℃ 保存。

an) 全氟环戊烯乳液

重复实施例 1(1)的过程但将全氟戊烷用全氟环戊烯(沸点 27℃)代替。不用时, 将由此得到的可扩散组分的乳液于 0℃ 保存。

ao) 全氟二甲基环丁烷乳液

重复实施例 1(1)的过程但将全氟戊烷用全氟二甲基环丁烷(1, 2-和 1, 3-异构体的混合物, 沸点 45℃)代替。不用时, 将由此得到的可

扩散组分的乳液于 0℃ 保存。

ap) 共沸全氟己烷：正戊烷混合物的乳液

将 4.71g (0.014mol) 全氟正己烷(沸点 59℃) (Fluorochem Ltd.) 和 0.89g (0.012mol) 正戊烷(沸点 36℃) (Fluka AG) 在小瓶中混合得到沸点为 35℃ 的共沸混合物。在另一个小瓶中，将氢化磷脂酰丝氨酸 (100mg) 在纯净水 (20ml) 中加热至 80℃ 并保持 5 分钟，然后使所得分散液冷却至室温。将 1ml 磷脂分散液转移至 2ml 小瓶中，向其中加入 100μl 共沸混合物。然后将小瓶用 CapMix® 振荡 45 秒钟得到可扩散组分的乳液，不用时将其于室温保存。

aq) 全氟二甲基环丁烷乳液

重复实施例 1(1) 的过程但将全氟戊烷用全氟二甲基环丁烷 (>97% 1,1-异构体，其余为 1,2-和 1,3-异构体) 代替。不用时，将由此得到的可扩散组分的乳液于 0℃ 保存。

ar) 全氟己烷乳液

重复实施例 1(1) 的过程但将全氟戊烷用全氟己烷(沸点 57℃) 代替。不用时，将由此得到的可扩散组分的乳液于 0℃ 保存。

as) 用氟化表面活性剂稳定化的全氟二甲基环丁烷乳液

重复实施例 1(aq) 的过程但将氢化磷脂酰丝氨酸用全氟化的二硬脂酰基磷脂酰胆碱 (5mg/ml) 或全氟化的二硬脂酰基磷脂酰胆碱和氢化磷脂酰丝氨酸的混合物 (3:1, 总类脂浓度 5mg/ml) 代替。不用时，将由此得到的可扩散组分的乳液于 0℃ 保存。

at) 2,2,3,3,3-五氟丙基甲基醚乳液

重复实施例 1(1) 的过程但将全氟戊烷用 2,2,3,3,3-五氟丙基甲基醚(沸点 46℃) 代替。不用时，将由此得到的可扩散组分的乳液于 0

℃保存。

au) 2H, 3H-十氟戊烷乳液

重复实施例 1(1)的过程但将全氟戊烷用 2H, 3H-十氟戊烷(沸点 54℃)代替。不用时, 将由此得到的可扩散组分的乳液于 0℃保存。

av) 通过溶血磷脂酰胆碱稳定化的全氟二甲基环丁烷乳液

重复实施例 1(aq)的过程但将氢化磷脂酰丝氨酸用溶血磷脂酰胆碱代替。不用时, 将由此得到的可扩散组分的乳液于 0℃保存。

aw) 通过氢化磷脂酰丝氨酸: 溶血磷脂酰胆碱(1: 1)稳定化的全氟二甲基环丁烷乳液

重复实施例 1(aq)的过程但将氢化磷脂酰丝氨酸用氢化磷脂酰丝氨酸: 溶血磷脂酰胆碱(1: 1)的混合物代替。不用时, 将由此得到的可扩散组分的乳液于 0℃保存。

ax) 通过基于聚乙二醇 10000 的表面活性剂稳定化的全氟二甲基环丁烷乳液

重复实施例 1(aq)的过程但将氢化磷脂酰丝氨酸分散液用 α -(16-十六烷酰氧基-十六烷酰基)- ω -甲氧基聚乙二醇 10000 的水溶液(10mg/ml)代替。不用时, 将由此得到的可扩散组分的乳液于 0℃保存。

ay) 通过基于聚乙二醇 10000 的表面活性剂稳定化的全氟二甲基环丁烷乳液

重复实施例 1(aq)的过程但将氢化磷脂酰丝氨酸分散液用 α -(16-十六烷酰氧基-十六烷酰基)- ω -甲氧基聚乙二醇 10000 的水溶液(20mg/ml)代替。不用时, 将由此得到的可扩散组分的乳液于 0℃保存。

az) 由磷脂酰丝氨酸和 RGDC-Mal-聚乙二醇 2000-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺包封的全氟丁烷填充的微泡

向小瓶内的磷脂酰丝氨酸(4.5mg)和 Mal-聚乙二醇 2000-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(0.5mg)的混合物中加入 1.4%丙二醇/2.4%甘油的水溶液(1ml)。将该分散液加热至 80℃并保持 5 分钟,冷却至室温然后用全氟丁烷气体冲洗。将小瓶用 CapMix®振荡 45 秒钟,然后置于滚子台上。离心后,将次层清液用 RGDC 在 pH 7.5 的磷酸钠缓冲液中的溶液交换,然后将小瓶置于滚子台上数小时。

ba) 由磷脂酰丝氨酸和二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 包封的全氟丁烷填充的微泡

向含有磷脂酰丝氨酸和二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000(比例 10:1)的小瓶中加入 2%丙二醇的水溶液使类脂的浓度达到 5mg/ml。将该分散液加热至 80℃并保持 5 分钟,冷却至室温然后将液面上空间用全氟丁烷气体冲洗。将小瓶用 CapMix®振荡 45 秒钟,然后置于滚子台上。通过离心并除去次层清液进行洗涤后,加入等体积含 10%蔗糖的水。将得到的分散液冷冻干燥,然后加水使其重新分散得到乳白色微泡分散液。

bb) 由磷脂酰丝氨酸和二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 5000 包封的全氟丁烷填充的微泡

向含有磷脂酰丝氨酸和二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 5000(比例 10:1)的小瓶中加入 2%丙二醇的水溶液使类脂的浓度达到 5mg/ml。将该分散液加热至 80℃并保持 5 分钟,冷却至室温然后将液面上空间用全氟丁烷气体冲洗。将小瓶用 CapMix®振荡 45 秒钟,然后置于滚子台上。通过离心并除去次层清液进行洗涤后,加入等体积含 10%聚乙二醇的水。将得到的分散液冷冻干燥,然后重新分散得到乳白色微泡分散液。

bc) 由磷脂酰丝氨酸和二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 包封的全氟丁烷填充的微泡

向含有磷脂酰丝氨酸和二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 (比例 10: 1) 的小瓶中加入 2% 丙二醇的水溶液使类脂的浓度达到 5mg/ml。将该分散液加热至 80℃ 并保持 5 分钟, 冷却至室温然后将液面上空间用全氟丁烷气体冲洗。将小瓶用 CapMix® 振荡 45 秒钟, 然后置于滚子台上。通过离心并除去次层清液进行洗涤后, 加入等体积的水得到乳白色微泡分散液。

bd) 由磷脂酰丝氨酸和二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 5000 包封的全氟丁烷填充的微泡

向含有磷脂酰丝氨酸和二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 5000 (比例 10: 1) 的小瓶中加入 2% 丙二醇的水溶液使类脂的浓度达到 5mg/ml。将该分散液加热至 80℃ 并保持 5 分钟, 冷却至室温然后将液面上空间用全氟丁烷气体冲洗。将小瓶用 CapMix® 振荡 45 秒钟, 然后置于滚子台上。通过离心并除去次层清液进行洗涤后, 加入等体积的水得到乳白色微泡分散液。

be) 通过磷脂酰丝氨酸和二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 稳定化的全氟二甲基环丁烷乳液

重复实施例 1(aq) 的过程但将氢化磷脂酰丝氨酸用磷脂酰丝氨酸和二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 (比例 10: 1) 的混合物代替。不用时, 将由此得到的可扩散组分的乳液于 0℃ 保存。

bf) 通过磷脂酰丝氨酸和二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 5000 稳定化的全氟二甲基环丁烷乳液

重复实施例 1(aq) 的过程但将氢化磷脂酰丝氨酸用磷脂酰丝氨酸和二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 5000 (比例 10: 1) 的混合物代

替。不用时，将由此得到的可扩散组分的乳液于 0℃ 保存。

bg) 重新分散在乳液中的冷冻干燥的全氟丁烷填充的微泡

将按照实施例 1(bp)描述制备的乳白色分散液样品通过离心并除去次层清液洗涤 3 次，然后向其中加入等体积 10%的蔗糖溶液。将得到的分散液冷冻干燥，然后在临用前重新分散在按照实施例 1(aq)的描述制备的乳液中。

bh) 抗生物素蛋白化的 (avidinylated) 全氟二甲基环丁烷乳液液滴

将二硬脂酰基磷脂酰丝氨酸(4.5mg)和生物素-二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(0.5mg)加入到干净的小瓶中并加入 1.0ml 2%丙二醇的溶液。加热至 80℃后将该混合物冷却至室温。加入 100μl 全氟二甲基环丁烷并将小瓶用 CapMix®振荡 75 秒钟得到可扩散组分的乳液。将稀释的乳液样品(100μl 乳液稀释到 1ml 水中)与过量的抗生物素蛋白一起保温并置于滚子台上。然后将稀释的乳液用水充分洗涤并通过离心进行浓缩。

bi) 1H-十三氟己烷乳液

重复实施例 1(1)的过程但将全氟戊烷用 1H-十三氟己烷(沸点 71℃)代替。不用时，将由此得到的可扩散组分的乳液于 0℃ 保存。

bj) 全氟庚烷乳液

重复实施例 1(1)的过程但将全氟戊烷用全氟庚烷(沸点 80-85℃)代替。不用时，将由此得到的可扩散组分的乳液于 0℃ 保存。

bk) 含有磷脂酰丝氨酸和荧光抗生蛋白链菌素的全氟二甲基环丁烷乳液

将二硬脂酰基磷脂酰丝氨酸(4.5mg)和生物素-二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(0.5mg)加入到干净的小瓶中并加入 1.0ml 2%丙二醇的溶液。加

热至 80℃ 后将该混合物冷却至室温。加入 100 μ l 全氟二甲基环丁烷并将小瓶用 CapMix® 振荡 75 秒钟得到可扩散组分的乳液。将稀释的乳液样品 (100 μ l 乳液稀释到 1ml 水中) 与过量的荧光抗生蛋白链菌素一起保温并置于滚子台上。然后将稀释的乳液用水充分洗涤并通过离心进行浓缩。

b1) 冷冻干燥的全氟丁烷气体分散液的分散液

将按照实施例 1(a) 的描述制备的乳白色分散液样品通过离心并除去次层清液洗涤 3 次, 然后加入等体积 10% 的蔗糖溶液。将得到的分散液冷冻干燥并在临用前重新分散在蒸馏水中。

bm) 通过无菌磷脂酰丝氨酸稳定化的全氟二甲基环丁烷乳液

重复实施例 1(aq) 的过程但将氢化磷脂酰丝氨酸用无菌的氢化磷脂酰丝氨酸溶液代替。不用时, 将由此得到的可扩散组分的乳液于 0℃ 保存。

bn) 全氟丙烷气体分散液

重复实施例 1(a) 的过程但将全氟丁烷气体用全氟丙烷气体代替。

bo) 分散的 Echovist

将 Echovist 颗粒 (Schering AG) (0.25g) 分散在按照实施例 1(aq) 的描述制备的乳液 (1.15ml) 中。

bp) 全氟丁烷气体分散液

将氢化磷脂酰丝氨酸 (500mg) 加入到 1.5% 丙二醇/5.11% 甘油的水溶液 (100ml) 中并加热至 80℃ 保持 5 分钟, 然后将得到的分散液冷却至室温。将每份 1ml 转移至 2ml 的小瓶中并将液面上空间用全氟丁烷气体冲洗, 将小瓶用 CapMix® 振荡 45 秒钟, 然后将小瓶置于滚子台上。

bq) 制备生物素化的 (biotinylated) 全氟丁烷微泡

将二硬脂酰基磷脂酰丝氨酸(4.5mg)和生物素-二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(0.5mg)加入到干净的小瓶中并加入 1.0ml 1.4%丙二醇/2.4%甘油的溶液。加热至 78℃后将该混合物冷却至室温,将液面上空间用全氟丁烷气体冲洗。将小瓶用 CapMix®混合器振荡 45 秒钟,然后置于滚子台上 16 小时。将得到的微泡用去离子水充分洗涤。

br) 气凝胶

向“刮刀边缘(spatula edge)”热解的间苯二酚-甲醛气凝胶颗粒(由 Dr. Pekala 提供, Lawrence Livermore National Laboratory)中加入 300μl 水、1 滴 pH9 的缓冲液和 5-10 滴 1% Pluronic F68。气凝胶颗粒迅速沉积,但并不聚集。

bs) 小泡

将内径 8mm 且约 20cm 长的橡胶管垂直置于支架上,将底端用盖子盖上并向其中填充根据实施例 1(a)制备的微泡分散液(所不同的是用 Ystral®转子定子均化器来制备微泡分散液)。2 小时后,将连接有导管的注射器插入到橡胶管的靠近底端处,收集 1ml 尺寸分级的微泡分散液馏份。Coulter 计数器分析表明由此得到的微泡分散液的平均直径为 1.2μm。

bt) 通过 5%白蛋白: 5%葡萄糖稳定化的全氟丁烷气体分散液

将 20%人血清用纯净水稀释至 5%。将 5ml 稀释的白蛋白样品进一步用 5%葡萄糖(15ml)稀释并将得到的混合物转移至小瓶中。将液面上空间用全氟丁烷气体冲洗并将小瓶声处理 80 秒钟,得到乳白色微泡分散液。

bu) Buckminsterfullerene C₆₀ 分散液

将 Buckminsterfullerene C₆₀ 加入到 2ml 小瓶内的 2.5%人血清白蛋白(1ml)中并将其用 CapMix® 振荡 75 秒。

bv) 六氟化硫气体分散液

按照 WO-A-9409829 实施例 5 的描述制备二硬脂酰基磷脂酰胆碱: 二棕榈酰基磷脂酰甘油(10: 1)稳定化的微泡。于是, 将 50mg 二硬脂酰基磷脂酰胆碱、5mg 二棕榈酰基磷脂酰甘油和 2.2g 聚乙二醇 4000 溶解在 22ml 60℃ 的叔丁醇中, 然后将该溶液迅速冷却至 -77℃ 并冷冻干燥过夜。将 100mg 得到的粉末置于小瓶中, 将液面上空间抽空并用六氟化硫填充。在临用前加入 1ml 纯净水得到微泡分散液。

bw) 2-甲基丁烷乳液

将氢化磷脂酰丝氨酸(100mg)在纯净水(20ml)中加热至 80℃ 并保持 5 分钟, 然后使所得分散液在冰箱中冷却过夜。将 1ml 分散液转移至 2ml 小瓶中, 向其中加入 100μl 2-甲基丁烷。将小瓶用 CapMix® 振荡 75 秒钟得到可扩散组分的乳液, 不用时将其于 0℃ 保存。

bx) 冷冻干燥的全氟丁烷气体在碳酸氢钠水溶液中的分散液

将实施例 1(a) 的乳白色分散液样品通过离心并除去次层清液洗涤 3 次, 然后加入等体积 10% 的蔗糖溶液。将得到的分散液冷冻干燥, 然后重新分散在 0.1M 碳酸氢钠溶液中。

by) 全氟丁烷气体分散液

按照实施例 1(a) 制备全氟丁烷气体分散液。将分散液通过离心并除去次层清液用纯净水洗涤 3 次, 得到乳白色微泡分散液。

bz) 含氧化铁颗粒的全氟丁烷气体分散液

向 1ml 实施例 1(by) 制备的全氟丁烷气体分散液中加入 1ml 纯净水。用氢氧化铵将 pH 调至 11.2, 然后将分散液于 60℃ 加热 5 分钟。

加入未包衣的氧化铁颗粒(0.3ml, 4.8mg Fe/ml)并将分散液放置5分钟。用盐酸将pH调至5.9得到棕色分散液,一段时间后形成含有棕色颗粒的顶层和透明无色的次层清液,无沉淀。

ca) 含氧化铁颗粒的全氟丁烷气体分散液

向1ml 实施例1(by)制备的全氟丁烷气体分散液中于pH 7加入0.3ml 未包衣的氧化铁颗粒(4.8mg Fe/ml),得到棕色分散液,该分散液在放置时形成含有棕色微泡的顶层和透明无色的次层清液,无沉淀。

cb) [比较]

向1ml 氢化磷脂酰丝氨酸的纯净水溶液(5mg/ml)中加入0.3ml 未包衣的氧化铁颗粒(4.8mg Fe/ml)得到棕色分散液,该分散液在放置后形成棕色沉淀。

cc) 含有用油酸包衣的氧化铁颗粒的全氟丁烷气体分散液

将1.3mmol $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.259g)和2.6mmol $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.703g)溶于10ml 纯净水中并加入1.5ml 氢氧化铵。将得到的氧化铁颗粒用纯净水(25ml)洗涤5次。向颗粒中加入稀氢氧化铵并将该悬浮液加热至80℃。加入油酸(0.15g),将该分散液室温下放置5分钟。加入纯净水(10ml)并用盐酸调至pH 5.4。将分散液声处理15分钟,然后除去次层清液并将颗粒悬浮在2-甲基丁烷(5ml)中,得到细的黑色分散液。

将25mg 二硬脂酰基磷脂酰胆碱和2.5mg 二肉豆蔻酰基磷脂酰甘油于60℃下溶于11ml 叔丁醇并向其中加入0.1ml 上述的氧化铁颗粒和1.1g 聚乙二醇4000。将该分散液于60℃加热10分钟,迅速冷却至-77℃并冷冻干燥。将100mg 冷冻干燥物加入2ml 小瓶中,然后将其抽真空并用全氟丁烷气体冲洗两次。然后将冷冻干燥物分散在1ml 纯净水中,通过离心并除去次层清液和沉淀用纯净水洗涤两次。放置后,

生成的分散液具有浅灰色和飘浮的顶层。

实施例 2-通过显微镜检查/肉眼观察对微泡生长进行体外表征

a) 将一滴约 4℃ 的实施例 1(a) 的全氟丁烷气体分散液用一滴约 4℃ 的用空气过度饱和的纯净水在冷却至约 4℃ 的显微镜物镜上稀释并在 400 倍的放大率下观察。所观察微泡的尺寸为 2-5 μm 。然后将温度升至约 40℃，此刻观察到微泡尺寸明显增加，较大的微泡其尺寸增长最大。约 5 分钟后，微泡的数量明显减少。

b) [比较] 将一滴在冰浴中冷却至约 0℃ 的实施例 1(c) 的 2-甲基丁烷乳液置于冷却至约 0℃ 的显微镜物镜上并在 400 倍的放大率下观察。所观察的乳液的油相液滴的尺寸为 2-6 μm 。然后将温度升至约 40℃。未观察到微泡的形成。

c) 将实施例 1(a) 的全氟丁烷气体分散液样品 (0.5ml) 用纯净水 (50ml) 稀释并冷却至 0℃。将部分该稀释的分散液 (1ml) 与部分实施例 1(c) 的 2-甲基丁烷乳液 (100 μl) 混合。将一滴得到的混合物置于通过加热/冷却台保持在 0℃ 的显微镜物镜上并用一也为 0℃ 的盖玻片覆盖。将物镜的温度用加热/冷却台逐渐升至 40℃。通过显微镜观察到迅速、明显的微泡生长，并通过 Malvern Mastersizer 进行尺寸和分布测定来证实。

d) [比较] 将实施例 1(a) 的全氟丁烷气体分散液样品 (0.5ml) 用纯净水 (50ml) 稀释并在冰浴中冷却至 0℃。将部分该稀释的分散液 (1ml) 与 100 μl 也为 0℃ 的 5mg/ml 氢化磷脂酰丝氨酸在纯净水中的分散液混合。将一滴得到的混合物置于冷却至 0℃ 的显微镜物镜上并于 400 倍放大率下观察。所观察微泡的尺寸为 2-5 μm 。然后将温度升至约 40℃，此刻观察到微泡尺寸的明显增加，但观察的增加不如实施例 2(c) 中观察到的强烈和迅速。

e) 将实施例 1(a)的全氟丁烷气体分散液样品用纯净水稀释(1: 1)并冷却至 0℃。将一滴实施例 1(e)的 2-氯-1, 1, 2-三氟乙基二氟甲基醚乳液加到通过加热/冷却台保持在 0℃的显微镜物镜上的稀释微泡分散液中并用一也为 0℃的盖玻片覆盖。将物镜的温度用加热/冷却台逐渐升至 40℃。通过显微镜观察到迅速、明显的微泡生长。

f) 将实施例 1(a)的全氟丁烷气体分散液样品用纯净水稀释(1: 1)并冷却至 0℃。将一滴实施例 1(f)的 2-溴-2-氯-1, 1, 1-三氟乙烷乳液加到通过加热/冷却台保持在 0℃的显微镜物镜上的稀释微泡分散液中并用一也为 0℃的盖玻片覆盖。将物镜的温度用加热/冷却台逐渐升至 40℃。通过显微镜观察到迅速、明显的微泡生长。

g) 将实施例 1(a)的全氟丁烷气体分散液样品用纯净水稀释(1: 1)并冷却至 0℃。将一滴实施例 1(g)的 1-氯-2, 2, 2-三氟乙基二氟甲基醚乳液加到通过加热/冷却台保持在 0℃的显微镜物镜上的稀释微泡分散液中并用一也为 0℃的盖玻片覆盖。将物镜的温度用加热/冷却台逐渐升至 40℃。通过显微镜观察到迅速、明显的微泡生长。

h) 将一滴实施例 1(h)的聚合物/人血清白蛋白微颗粒分散液和一滴实施例 1(k)的全氟戊烷乳液置于加热至 50℃的显微镜物镜上并在 400 倍的放大率下观察。当液滴混合时观察到微泡的明显生长。

i) 将一滴实施例 1(h)的聚合物/人血清白蛋白微颗粒分散液和一滴实施例 1(j)的 2-甲基丁烷乳液置于加热至 40℃的显微镜物镜上并在 400 倍的放大率下观察。当液滴混合时观察到微泡明显、迅速、剧烈的生长。

j) 将一滴实施例 1(i)的聚合物/明胶微颗粒分散液和一滴实施例 1(k)

的全氟戊烷乳液置于加热至 50℃ 的显微镜物镜上并在 400 倍的放大率下观察。当液滴混合时观察到微泡的明显生长。

k) 将一滴实施例 1(i) 的聚合物/明胶微颗粒分散液和一滴实施例 1(j) 的 2-甲基丁烷乳液置于加热至 40℃ 的显微镜物镜上并在 400 倍的放大率下观察。当液滴混合时观察到微泡明显、迅速、剧烈的生长。

l) [比较] 将一滴实施例 1(k) 的全氟戊烷乳液置于加热至 50℃ 的显微镜物镜上并在 400 倍的放大率下观察。未观察到微泡的形成。

m) [比较] 将一滴实施例 1(j) 的 2-甲基丁烷乳液置于加热至 40℃ 的显微镜物镜上并在 400 倍的放大率下观察。未观察到微泡的形成。

n) [比较] 将一滴实施例 1(h) 的聚合物/人血清白蛋白微颗粒分散液置于加热至 40℃ 的显微镜物镜上并在 400 倍的放大率下观察。未观察到明显改变。

o) [比较] 将一滴实施例 1(i) 的聚合物/明胶微颗粒分散液置于加热至 50℃ 的显微镜物镜上并在 400 倍的放大率下观察。未观察到明显改变。

p) 将一滴根据 US-A-4718433 的描述制备的人血清白蛋白稳定化的空气微泡分散液和一滴实施例 1(j) 的 2-甲基丁烷乳液置于 20℃ 的显微镜物镜上并在 400 倍的放大率下观察。当液滴混合时观察到微泡的明显生长。

q) 将实施例 1(a) 的全氟丁烷气体分散液样品用纯净水稀释(1: 1)并冷却至 0℃。将一滴实施例 1(z) 的全氟萘烷/全氟丁烷乳液加到通过加热/冷却台保持在 0℃ 的显微镜物镜上的稀释微泡分散液中并用一也为

0℃的盖玻片覆盖。将物镜的温度用加热/冷却台逐渐升至 40℃。通过显微镜观察到迅速、明显的微泡生长。

r) 将实施例 1(a)的全氟丁烷气体分散液样品用纯净水稀释(1: 1)并冷却至 0℃。将一滴实施例 1(aa)的全氟萘烷/全氟丙烷乳液加到通过加热/冷却台保持在 0℃的显微镜物镜上的稀释微泡分散液中并用一也为 0℃的盖玻片覆盖。将物镜的温度用加热/冷却台逐渐升至 40℃。通过显微镜观察到迅速、明显的微泡生长。

s) 将实施例 1(a)的全氟丁烷气体分散液样品用纯净水稀释(1: 1)并冷却至 0℃。将一滴实施例 1(ab)的全氟萘烷/六氟化硫乳液加到通过加热/冷却台保持在 0℃的显微镜物镜上的稀释微泡分散液中并用一也为 0℃的盖玻片覆盖。将物镜的温度用加热/冷却台逐渐升至 40℃, 4-5 分钟后观察到微泡尺寸的增加, 但观察到的增加不如实施例 2(q)和 2(r)中观察到的强烈和迅速。

t) 将实施例 1(a)的全氟丁烷气体分散液样品用纯净水稀释(1: 1)并冷却至 0℃。将一滴实施例 1(ad)的 Pluronic F68-稳定化的全氟戊烷乳液加到通过加热/冷却台保持在 0℃的显微镜物镜上的稀释微泡分散液中并用一也为 0℃的盖玻片覆盖。将物镜的温度用加热/冷却台逐渐升至 40℃。通过显微镜观察到迅速、明显的微泡生长。

u) 将一滴实施例 1(a)的全氟丁烷气体分散液和一滴实施例 1(aj)的 Brij58: Fluorad FC-170C-稳定化的全氟戊烷乳液置于加热至 40℃的显微镜物镜上并在 400 倍的放大率下观察。一段时间后, 观察到微泡的缓慢生长。

v) 将一滴实施例 1(a)的全氟丁烷气体分散液和一滴实施例 1(ak)的 Brij58: Fluorad FC-170C-稳定化的全氟戊烷乳液置于加热至 40℃

的显微镜物镜上并在 400 倍的放大率下观察。一段时间后，观察到微泡的生长。

w) 将一滴实施例 1(a)的全氟丁烷气体分散液和一滴实施例 1(a1)的全氟-4-甲基戊-2-烯乳液置于加热至 40℃的显微镜物镜上并在 400 倍的放大率下观察。一段时间后，观察到微泡的缓慢生长。

x) 将一滴实施例 1(a)的全氟丁烷气体分散液和一滴实施例 1(am)的 1H, 1H, 2H-七氟戊-1-烯乳液置于加热至 40℃的显微镜物镜上并在 400 倍的放大率下观察。当液滴混合时观察到微泡的明显、迅速生长。

y) 将一滴实施例 1(a)的全氟丁烷气体分散液和一滴实施例 1(an)的全氟环戊烯乳液置于加热至 40℃的显微镜物镜上并在 400 倍的放大率下观察。当液滴混合时观察到微泡的明显、迅速且剧烈的生长。

z) 将 400μl 实施例 1(b)的全氟丁烷气体分散液于室温下转移至 2ml 小瓶中，加入 100μl 实施例 1(aq)的共沸乳液。将一滴微泡/乳液混合物置于通过加热/冷却台保持在 20℃的显微镜物镜上。将物镜的温度用加热/冷却台迅速升至 37℃。观察到明显、自发且迅速的微泡生长。

aa) 将一滴按照实施例 1(bq)的描述制备的生物素化的微泡加到一滴置于加热至 60℃的显微镜物镜上的按照实施例 1(bh)的描述制备的乳液中并在 400 倍的放大率下观察。在聚集的乳液液滴中观察到微泡的明显生长和微泡的聚集。

ab) 按照实施例 1(bq)的描述制备的微泡可以通过流动血细胞计数术进行分析，例如，通过采用按照实施例 1(bk)的描述制备的荧光抗生蛋白链菌素乳液来检测抗生蛋白链菌素与生物素化的微泡的结合。

ac) 将一滴按照实施例 1 (bo) 的描述制备的 Echovist 分散液置于显微镜的物镜上并用加热/冷却台保持温度在 37℃。将样品用盖玻片覆盖并置于显微镜下。观察到明显的气泡生长。

ad) 将一滴实施例 1 (br) 的气凝胶分散液置于显微镜的物镜上并用加热/冷却台保持温度在 37℃。将样品用盖玻片覆盖并置于显微镜下。将 1 滴 2-甲基丁烷乳液(上述实施例 1 (c), 所不同的是使用 100μl 2-甲基丁烷而不是 200μl) 加到盖玻片的边缘, 从而使乳液渗透到气凝胶分散液中。将温度升至约 60℃ 时, 在气凝胶颗粒中出现微泡。

ae) [比较] 将一滴实施例 1 (br) 的气凝胶分散液置于显微镜的物镜上并用加热/冷却台保持温度在 20℃。将样品用盖玻片覆盖并置于显微镜下, 然后将温度升至 60℃。未观察到微泡的生长。

af) 将一滴实施例 1 (bs) 的微泡分散液置于显微镜的物镜上。将样品用盖玻片覆盖并置于带有加热/冷却台的显微镜下, 保持样品温度在 20℃。将 1 滴上述实施例 1 (c) 的 2-甲基丁烷乳液加到盖玻片的边缘, 从而使乳液渗透到微泡分散液中。在混合阶段未观察到微泡的生长。然后将温度升至约 40℃, 此刻观察到微泡的明显生长。

ag) [比较] 将一滴实施例 1 (bs) 的微泡分散液置于显微镜的物镜上。将样品用盖玻片覆盖并置于带有加热/冷却台的显微镜下, 保持样品温度在 20℃。当温度升至 40℃ 时, 未观察到微泡的生长。

ah) 室温下, 向显微镜物镜上的 Echovist 颗粒 (Schering AG) 中加入一滴 Echovist 颗粒的溶剂。加入一滴按照实施例 1 (bw) 的描述制备的 2-甲基丁烷乳液并在 100 倍放大率下观察。当液滴混合时, 观察到明显的微泡生长。

ai) 室温下, 将一滴为注射准备的 Levovist[®]和一滴按照实施例 1(bw) 的描述制备的 2-甲基丁烷乳液置于显微镜的物镜上并在 400 倍放大率下观察。当液滴混合时, 观察到明显、迅速、剧烈的微泡生长。

aj) 室温下, 将一滴实施例 1(br)的全氟丁烷气体分散液和一滴按照实施例 1(bw)的描述制备的 2-甲基丁烷乳液置于显微镜的物镜上并在 400 倍放大率下观察。当液滴混合时, 观察到明显、迅速、剧烈的微泡生长。

ak) 40℃下, 将一滴按照实施例 1(by)的描述制备的 2-甲基丁烷乳液加入到一滴置于显微镜的物镜上的实施例 1(bu)的 Buckminsterfullerene C₆₀ 分散液中。当液滴混合时, 观察到明显、迅速、剧烈的微泡生长。

al) 40℃下, 将一滴按照实施例 1(bw)的描述制备的 2-甲基丁烷乳液加入到一滴置于显微镜的物镜上的实施例 1(bv)的六氟化硫气体分散液中。当液滴混合时, 观察到明显、迅速、剧烈的微泡生长。

am) 室温下, 将一滴 0.5M 盐酸加入到一滴置于显微镜的物镜上的实施例 1(bx)的在碳酸氢钠水溶液中的全氟丁烷气体分散液中。当液滴混合时, 观察到迅速、剧烈和短暂的微泡生长。

an) 室温下, 将一滴按照实施例 1(bw)的描述制备的 2-甲基丁烷乳液加入到一滴置于显微镜的物镜上的实施例 1(bz)的含有氧化铁颗粒的全氟丁烷气体分散液中。当液滴混合时, 观察到明显、迅速、剧烈的微泡生长。

ao) 室温下, 将一滴按照实施例 1(bw)的描述制备的 2-甲基丁烷乳液加入到一滴置于显微镜的物镜上的实施例 1(ca)的含有氧化铁颗粒的

全氟丁烷气体分散液中。当液滴混合时，观察到明显、迅速、剧烈的微泡生长。

ap) [比较] 室温下，将一滴按照实施例 1(bw)的描述制备的 2-甲基丁烷乳液加入到一滴置于显微镜的物镜上的实施例 1(cb)的氧化铁颗粒分散液中。未观察到微泡形成。

aq) 室温下，将一滴按照实施例 1(bw)的描述制备的 2-甲基丁烷乳液加入到一滴置于显微镜的物镜上的实施例 1(cc)的含有油酸包衣的氧化铁颗粒的全氟丁烷气体分散液中。当液滴混合时，观察到明显、迅速、剧烈的微泡生长。

ar) 将 1ml 按照实施例 1(bp)的描述制备的微泡分散液用 50ml 水稀释。室温下，将 1 滴稀释的分散液加入到一滴置于显微镜物镜上的苏打水中。当液滴混合时，观察到自发的微泡生长。

as) 连续搅拌下，将 0.4 μ l 按照实施例 1(bq)的描述制备的生物素化的微泡分散液和 0.02ml 按照实施例 1(bh)的描述制备的全氟二甲基环丁烷乳液依次加入到含有 200ml 37℃的 Isoton 的烧杯中。将该混合物保温 20 秒。使 2.5MHz 的脉冲超声波束(10KHz 重复频率，每次脉冲 100 μ J)通过溶液，在黑暗的背景下观察明显的侧光。在光束路径中立即观察到较大气泡的亮纹。

at) 将一滴按照实施例 1(bl)制备的微泡分散液置于显微镜的物镜上。将样品用盖玻片覆盖并置于带有加热/冷却台的显微镜下，保持样品温度在 20℃。将 1 滴按照实施例 1(as)制备的全氟二甲基环丁烷乳液加到盖玻片的边缘，从而使乳液渗透到微泡分散液中。在温度升至约 60℃时，观察到微泡的明显生长。

实施例 3-体外微泡尺寸和分布的表征

a) 使用 Malvern Mastersizer 测量

用装有 45mm 透镜、测量范围为 0.1-80 μ m 的 Malvern Mastersizer 1002 分析与可扩散组分混合后的微泡生长和尺寸分布的改变。将含有 Isoton II (150ml) 的样品池与可以在 9-37 $^{\circ}$ C 的温度范围内操作的恒温浴连接。将实施例 1(a) 的全氟丁烷气体分散液样品 (110 μ l) 加入到样品池中并在平衡后加入一部分实施例 1(c) 的 2-甲基丁烷乳液 (500 μ l)。用泵使 Isoton II 溶液通过 Mastersizer 和恒温浴, 从而每 30 秒通过一次测量池。每 30 秒重复测量一次, 共测量 3 分钟。将 Isoton II 溶液的温度逐渐增加并继续进行测量。还用相同的条件对全氟丁烷气体分散液和 2-甲基丁烷乳液分别进行分析。

对全氟丁烷气体分散液的单独分析表明, 9 $^{\circ}$ C 时, 82% 微泡的尺寸在 9.9 μ m 以下; 当温度增加到 37 $^{\circ}$ C 时, 该比例降低至 31%。温度的改变伴随着 15-80 μ m 尺寸范围内微泡比例的相应增加, 从 8% 至 42%。

将全氟丁烷气体分散液和 2-甲基丁烷乳液于 9 $^{\circ}$ C 下混合后, 观察到微泡尺寸的轻微增加。温度升高至 25 $^{\circ}$ C 导致强烈的微泡生长, 约 81% 的微泡尺寸在 15-80 μ m 的范围内。进一步升高温度导致微泡生长至超出仪器测量范围的尺寸。

将全氟丁烷气体分散液和 2-甲基丁烷乳液在 37 $^{\circ}$ C 混合导致迅速的微泡生长; 30 秒的测量周期后, 97% 的微泡尺寸在 15-80 μ m 的范围内。

b) 使用 Coulter Multisizer 测量

用带有 50mm 孔、测量范围为 1-30 μ m 的 Coulter Multisizer II 分析与可扩散组分混合后的微泡生长和尺寸分布的改变。将各样品的两种组分加入到含有 200ml 预热至 37 $^{\circ}$ C 的 Isoton II 的样品池中并在 37 $^{\circ}$ C 下进行测量。立即测量混合物的尺寸分布, 加入样品 1.5 分钟后再次进行测量。然后将样品池置于超声下 1 分钟, 使用联有脉冲发生器的 2.25MHz 传感器; 能量为 100 μ J。

b) (i) 将实施例 1(ag)的全氟丁烷气体分散液和实施例 1(l)的全氟戊烷乳液混合, 在进行超声波处理后导致迅速、明显的微泡生长。总体积浓度从 3%增加至约 16%。

b) (ii) 将实施例 1(ag)的全氟丁烷气体分散液和实施例 1(m)的全氟丁烷乳液混合导致迅速、明显的微泡生长。总体积浓度从 1%增加至约 6%。

b) (iii) 将实施例 1(ag)的全氟丁烷气体分散液和实施例 1(p)的全氟戊烷乳液混合, 在进行超声波处理后导致迅速、明显的微泡生长。总体积浓度从 1%增加至约 4%。

b) (iv) 将实施例 1(ag)的全氟丁烷气体分散液和实施例 1(af)的全氟戊烷乳液混合, 在进行超声波处理后导致迅速、明显的微泡生长。总体积浓度从 2%增加至约 8%。

b) (v) 将实施例 1(ag)的全氟丁烷气体分散液和实施例 1(q)的全氟戊烷/全氟-4-甲基戊-2-烯乳液混合, 在进行超声波处理后导致迅速、明显的微泡生长。总体积浓度从 2%增加至约 4%。

b) (vi) 将实施例 1(ag)的全氟丁烷气体分散液和实施例 1(r)的全氟戊烷/1H, 1H, 2H-七氟戊-1-烯乳液混合导致迅速、明显的微泡生长。总体积浓度从 2%增加至约 4.5%。

b) (vii) 将实施例 1(ag)的全氟丁烷气体分散液和实施例 1(s)的全氟戊烷乳液混合, 在进行超声波处理后导致迅速、明显的微泡生长。总体积浓度从 2%增加至约 13%。

b) (viii) 将实施例 1(ag)的全氟丁烷气体分散液和实施例 1(t)的

全氟戊烷乳液混合，在进行超声波处理后导致迅速、明显的微泡生长。总体积浓度从 2% 增加至约 13%。

b) (ix) 将实施例 1(ag) 的全氟丁烷气体分散液和实施例 1(u) 的全氟戊烷乳液混合，在进行超声波处理后导致迅速、明显的微泡生长。总体积浓度从 3% 增加至约 15%。

b) (x) 将实施例 1(ag) 的全氟丁烷气体分散液和实施例 1(v) 的全氟戊烷乳液混合，在进行超声波处理后导致迅速、明显的微泡生长。总体积浓度从 3% 增加至约 22%。

b) (xi) 将实施例 1(ag) 的全氟丁烷气体分散液和实施例 1(ai) 的全氟戊烷乳液混合，在进行超声波处理后导致迅速、明显的微泡生长。总体积浓度从 3% 增加至约 8%。

b) (xii) 将实施例 1(ag) 的全氟丁烷气体分散液和实施例 1(x) 的全氟戊烷：全氟-4-甲基戊-2-烯乳液混合，在进行超声波处理后导致迅速、明显的微泡生长。总体积浓度从 2% 增加至约 7.5%。

b) (xiii) 将实施例 1(ag) 的全氟丁烷气体分散液和实施例 1(y) 的全氟戊烷：全氟-4-甲基戊-2-烯乳液混合，在进行超声波处理后导致迅速、明显的微泡生长。总体积浓度从 2.5% 增加至约 7%。

b) (xiv) 将实施例 1(ag) 的全氟丁烷气体分散液和实施例 1(ac) 的全氟戊烷乳液混合导致迅速、明显的微泡生长。微泡尺寸的增加比实施例 3(b) (xv) 中观察到的更剧烈且更迅速。总体积浓度从 3.5% 增加至约 53%。

b) (xv) 将实施例 1(ag) 的全氟丁烷气体分散液和实施例 1(ae) 的全

氟戊烷乳液混合导致迅速、明显的微泡生长。总体积浓度从 7% 增加至约 19%。进行超声波处理导致进一步的微泡生长，表现为总体积浓度增加至约 54.5%。

b) (xvi) 将实施例 1(ah) 的全氟丙烷气体分散液和实施例 1(l) 的全氟戊烷乳液混合导致迅速的微泡生长，但不如实施例 3(b)(i) 中观察到的剧烈。总体积浓度从 3% 增加至约 4.5%。

b) (xvii) 将实施例 1(ag) 的全氟丁烷气体分散液和实施例 1(o) 的全氟戊烷乳液混合，在进行超声波处理后导致迅速、明显的微泡生长。总体积浓度从约 1% 增加至约 8%。

b) (xviii) 按照实施例 1(ar) 的描述制备的全氟己烷乳液样品的液滴总浓度为 8.6(体积)%，液滴尺寸为 2.6 μm 。

b) (xix) 按照实施例 1(at) 的描述制备的 2,2,3,3,3-五氟丙基甲基醚乳液的液滴总浓度为 4.3(体积)%，液滴尺寸为 1.5 μm 。

b) (xx) 按照实施例 1(au) 的描述制备的 2H,3H-十氟戊烷乳液的液滴总浓度为 5.6(体积)%，液滴尺寸为 1.9 μm 。

b) (xxi) 按照实施例 1(bj) 的描述制备的全氟庚烷乳液的液滴总浓度为 8.5(体积)%，液滴尺寸为 2.2 μm 。

c) 使用 Coulter Multisizer(140 μm 孔)测量

用带有 140 μm 孔的 Coulter Multisizer II 分析与可扩散组分乳液混合后的微泡生长和尺寸分布的改变。测量范围为 10-80 μm 。将气泡分散液和乳液液滴加入到含有 200ml 预加热的 Isoton II 的样品池中。测量在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下进行。立即测量混合物的尺寸分布，并在混合 3 分

钟后再次进行测量。然后将样品溶液置于超声下 1 分钟，使用联有脉冲发生器的 2.25MHz 传感器；能量为 100 μ J。在接触超声波 1 分钟和 3 分钟后测量混合物的尺寸分布。

c) (i) 在将 182 μ l 按照实施例 1(am)的描述制备的七氟戊-1-烯乳液加入到 400 μ l 按照实施例 1(b1)的描述制备的全氟丁烷气体分散液中后，微泡的尺寸立即增加，10-80 μ m 尺寸范围内的总体积浓度在 1 分钟内从不明显增加至约 60(体积)%。

c) (ii) 在将 70 μ l 按照实施例 1(av)的描述制备的全氟二甲基环丁烷乳液加入到 330 μ l 按照实施例 1(b1)的描述制备的全氟丁烷气体分散液中后，超声处理后微泡的尺寸明显增加。10-80 μ m 尺寸范围内的总体积浓度在 3 分钟内从不明显增加至约 14(体积)%。

c) (iii) 在将 71 μ l 按照实施例 1(aw)的描述制备的全氟二甲基环丁烷乳液加入到 330 μ l 按照实施例 1(b1)的描述制备的全氟丁烷气体分散液中后，超声处理后微泡的尺寸明显增加。10-80 μ m 尺寸范围内的总体积浓度在 3 分钟内从不明显增加至约 8.6(体积)%。

c) (iv) 在将 105 μ l 按照实施例 1(ax)的描述制备的全氟二甲基环丁烷乳液加入到 300 μ l 按照实施例 1(b1)的描述制备的全氟丁烷气体分散液中后，超声处理后微泡的尺寸增加。10-80 μ m 尺寸范围内的总体积浓度在 3 分钟内从 3.2(体积)%增加至约 4.8(体积)%。

c) (v) 在将 105 μ l 按照实施例 1(ay)的描述制备的全氟二甲基环丁烷乳液加入到 300 μ l 按照实施例 1(b1)的描述制备的全氟丁烷气体分散液中后，超声处理后微泡的尺寸增加。10-80 μ m 尺寸范围内的总体积浓度在 3 分钟内从 1.5(体积)%增加至约 2.2(体积)%。

c) (vi) 将冷冻干燥的全氟丁烷微泡重新分散在实施例 1(bg)所述的

全氟二甲基环丁烷乳液中后，微泡的尺寸立即增加。10-80 μm 尺寸范围内的总体积浓度在 1 分钟内从不明显增加至约 60(体积)%。

c) (vii) 在将 76 μl 按照实施例 1(bi)的描述制备的 1H-十三氟己烷乳液加入到 400 μl 按照实施例 1(b1)的描述制备的全氟丁烷气体分散液中后，微泡的尺寸立即增加，10-80 μm 尺寸范围内的总体积浓度在 3 分钟内从不明显增加至约 20(体积)%。

c) (viii) 在将 63 μl 按照实施例 1(bm)的描述制备的全氟二甲基环丁烷乳液加入到 741 μl 按照实施例 1(b1)的描述制备的全氟丁烷气体分散液中后，微泡的尺寸立即增加，10-80 μm 尺寸范围内的总体积浓度在 3 分钟内从不明显增加至约 2(体积)%。

c) (ix) 在将 67 μl 按照实施例 1(aq)的描述制备的全氟二甲基环丁烷乳液加入到 56 μl 按照实施例 1(bn)的描述制备的全氟丙烷气体分散液中后，在超声处理后微泡的尺寸增加，10-80 μm 尺寸范围内的总体积浓度在 1 分钟内从不明显增加至约 2.7(体积)%。

实施例 4-声衰减的体外测量

a) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ ，将实施例 1(a)的全氟丁烷气体分散液样品(1 μl)悬浮在 Isoton II(55ml)中，然后用脉冲-回声技术，通过中心频率为 3.5MHz 和 5.0MHz 的两宽带传感器以时间为函数测量声衰减。20 秒钟后，将可扩散组分加至悬浮液中，然后再继续测量 120 秒钟。

a) i) 加入 100 μl 实施例 1(c)的 2-甲基丁烷乳液后，衰减立即增加到 4 倍以上；精确的定量不可能，因为所述衰减超过了可由该系统测量的最大值。所述作用持续 50 秒钟，同时衰减谱的形状完全改变，这表明微泡尺寸显著增加。

a) ii) 加入 20 μl 实施例 1(c)的 2-甲基丁烷乳液后，衰减逐渐增加，在 40 秒钟后达到最大值，为初始值的 3-4 倍，然后迅速减小。衰减谱

形状的完全改变也表明微泡尺寸显著增加。

a) iii) 加入 5 μl 实施例 1(c) 的 2-甲基丁烷乳液后, 衰减逐渐增加, 在 30 秒钟后达到最大值, 超过初始值的约 50%, 然后缓慢减小至初始值。衰减谱向较低共振频率偏移表明微泡尺寸有中等的增加。

a) iv) 加入 500 μl 实施例 1(e) 的 2-氯-1, 1, 2-三氟乙基二氟甲醚乳液后, 衰减逐渐增加, 在 20 秒钟后达到最大值, 超过初始值约 50%, 然后缓慢减小至初始值。衰减谱向较低共振频率偏移表明微泡尺寸有中等的增加。

a) v) 加入 500 μl 实施例 1(d) 的全氟戊烷乳液后, 衰减增加较小。衰减谱向较低共振频率偏移表明微泡尺寸有较小的增加。

为了对照, 加入 500 μl 水没有使衰减产生可识别的变化。

b) 在 37 $^{\circ}\text{C}$, 将实施例 1(c) 的 2-甲基丁烷乳液样品 (100 μl) 加至 Isoton II (55ml) 并按上述 (a) 所述测量声衰减。20 秒钟后, 将实施例 1(a) 的全氟丁烷气体分散液样品 (1 μl) 加至悬浮液中, 然后继续测量 120 秒钟。加入气体分散液后, 衰减迅速增加, 在 20 秒钟后达到该系统的最大测量水平, 并在 50 秒钟后开始减小。衰减谱表明存在大微泡。

为了对照, 当用 100 μl 水代替 2-甲基丁烷乳液时, 加入气体分散液后, 衰减迅速增加; 40 秒钟后, 达到稳定水平, 是用 2-甲基丁烷乳液测量值的 1/4。在 120 秒钟的剩余测量期中, 衰减保持在该水平。衰减谱表明存在小微泡。

实施例 5-用全氟丁烷气体分散液进行狗心脏的体内成像(比较)

制备含对应于 2 μl 气体含量的量的实施例 1(b) 的全氟丁烷气体分散液的注射针管, 用插入上肢静脉的导管将所述内含物注射至 20kg 开胸狗中。用中线短轴投影, 用 Vingmed CFM-750 扫描仪完成心脏成像。通过选通动物的 ECG, 调整扫描仪以便在每一收缩期末期都能得到一次图像。在注射数秒钟后, 在右心室中见到亮对比, 在约 4-5 秒钟后, 在左心室出现相似的亮度对比, 但是在心脏后部有瞬时的显著

衰减。以通过扫描仪记录的 cine-loop 数据为基础,完成脱机数字反向散射强度分析。在前左心室心肌的代表性区域中出现持续约 10 秒钟的对比提高的瞬时短暂峰,在左心室对比增加开始 3 秒钟后出现。

实施例 6-用 2-甲基丁烷乳液进行狗心脏的体内成像(比较)

按实施例 5 所述,制备含 1.0ml 实施例 1(c)的 2-甲基丁烷乳液的注射针管,然后将内含物注射至动物中。按实施例 5 所述完成心脏成像。未见到对比效果。

实施例 7-用全氟丁烷气体分散液和 2-甲基丁烷乳液进行狗心脏的体内成像

按实施例 5 和 6 所述,制备注射针管,然后将两针管内的内含物经 Y 形连接管和实施例 5 中所述的导管同时注射至狗中。按实施例 5 所述完成心脏成像。心室的回声增加与实施例 5 的观察结果类似。在左心室心肌中,造影团到达冠状循环 30 秒后,回声强度有单调的增加。在 5 分钟后,在心肌中的对比效果完全消失。

实施例 8-用全氟戊烷乳液进行狗心脏的体内成像(比较)

按实施例 5 所述,制备含 0.5 ml 实施例 1(d)的全氟戊烷乳液的注射针管,然后将内含物注射至动物中。按实施例 5 所述完成心脏成像。在图像的任何区域均未见到回声增加作用。

实施例 9-用全氟丁烷气体分散液和全氟戊烷乳液进行狗心脏的低强度体内成像

按实施例 5 和 8 所述制备注射针管,然后经 Y 形连接管和插入上肢静脉的导管将所述两个针管的内含物同时注射至 20kg 开胸杂种狗中。用中线短轴投影,用 Vingmed CFM-750 扫描仪完成心脏成像。通过将发射功率降至 1(在 0-7 范围内的标准),调整扫描仪以便使声输出达到最小,并通过选通动物的 ECG,在每一收缩期末期仅得到一次

图像。观察到的对比增加如实施例 5 所述，但在心肌中持续时间有所延长。

实施例 10-用全氟丁烷气体分散液和全氟戊烷乳液进行狗心脏的高强度体内成像

除将扫描仪输出调至使暴露于成像组织区的超声波最大外，重复实施例 9 的试验。通过连续的高帧率成像和最大输出功率(在 0-7 范围内的 7)来达到此目的。注射后，在心脏的两个心室均见到强而亮的对比增加。在心肌的所有区域均观察到对比的稳定增加，增加的强度最后在屏上达到最大的白色水平。组织对比持续约 30 秒，尽管血液中的对比效果在注射后 5 分钟内降至基线，出现了几乎没有血液衰减的图像，并且出现完全和极亮的心肌周缘对比增加。尽管进行连续高强度超声波暴露，但在接近传感器的心肌中的对比效果看起来没有减弱。

实施例 11-用全氟丁烷气体分散液和全氟戊烷乳液进行狗心脏的高强度体内成像

重复实施例 10 的过程，不同之处在于所用的全氟戊烷乳液通过冷却纯水(20ml)中的聚乙二醇 10000 甲基醚 16-十六烷酰氧基十六烷酸酯(200mg，按 WO-A-9607434 的实施例 2(k)所述制备)溶液，将 1ml 该溶液部分转移至 2ml 小瓶中，加入全氟戊烷(200 μ l)，用 CapMix® 将小瓶振荡 45 秒钟来制备，不使用时，将乳液贮存在 0℃。观察到的血液和心肌组织的对比增加如实施例 5 所述。

实施例 12-狗肾的体内成像

使用与实施例 9 所述相同的物质和注射过程。用与实施例 10 相同的高输出仪器设置，通过完整的腹壁进行狗左肾的成像。在图像中包括了含供应动脉的所述肾的中心结构。注射 20 秒钟后，在肾实质中观察到对比开始稳定提高，在 1-2 分钟后，达到极亮的强度平台。在注射 4 分钟后，将传感器移至右肾成像。开始，该肾有正常、未提高的

外观。但是，在数分钟后，应用高强度超声波使回声强度略有增加，但未达到在左肾所观察到的水平。

实施例 13-用全氟丁烷气体分散液和减少量的全氟戊烷乳液进行狗心脏的体内成像

重复实施例 10 的过程，不同之处是将全氟戊烷乳液的剂量降至 1/3。心肌对比增加的峰强度与实施例 10 观察到的类似，但是组织对比持续时间从 30 分钟减少至 10 分钟以下。

实施例 14-用全氟丁烷气体分散液和全氟戊烷乳液进行狗心脏的闭胸 (closed-chest) 体内成像

用闭胸的试验重复实施例 10 的过程。心肌对比增加与实施例 10 观察到的类似。

实施例 15-用全氟丁烷气体分散液和全氟戊烷乳液进行狗心脏的彩色 Doppler 体内成像

重复实施例 10 的过程，不同之处是在注射后第一分钟，将扫描仪（彩色 Doppler 模式）应用于左心室以便引发微泡生长。此后，心肌对比增加比实施例 10 观察到的更强。

实施例 16-用全氟丁烷气体分散液和全氟-4-甲基戊-2 烯乳液进行狗心脏的体内成像

将 0.5ml 按实施例 1(ag)制备的等渗重建的全氟丁烷气体分散液和实施例 1(al)的 66 μ l 全氟-4-甲基戊-2 烯乳液按实施例 10 所述注射。在强度方面，所得的心肌对比增加与实施例 10 观察到的类似，但持续时间为 6-8 分钟。

实施例 17-用全氟丁烷气体分散液和全氟戊烷乳液对狗心脏的充血区进行体内成像

将狗的卷曲冠状动脉分枝暂时结扎 2 分钟，此后，按实施例 10 所述注射造影剂。此时充血心肌的对比增加明显比周围正常组织的更强。

实施例 18-用全氟丁烷气体分散液和全氟二甲基环丁烷乳液对狗心脏进行体内成像

将按实施例 1(ag)制备的 0.5ml 等渗重建的全氟丁烷气体分散液和实施例 1(ao)的 66 μ l 全氟二甲基环丁烷乳液按实施例 10 注射。所得的强心肌对比增加与实施例 16 观察到的类似。

实施例 19-用全氟丁烷气体分散液和全氟二甲基环丁烷乳液对狗心脏进行体内成像

将按实施例 1(b1)制备的 0.5ml 等渗重建的全氟丁烷气体分散液和实施例 1(aq)的 66 μ l 全氟二甲基环丁烷乳液按实施例 10 注射。所得的强心肌对比增加与实施例 16 观察到的类似。

实施例 20-体内“颗粒对颗粒”导向 (“particle-to-particle” targeting)

将按实施例 1(bq)制备的 0.02 μ l/kg 全氟丁烷微泡和 0.02 μ l/kg 按实施例 1(bh)所述制备的全氟二甲基环丁烷乳液同时静脉内注射给 20kg 麻醉的杂种狗，同时按实施例 10 所述用超声波进行心脏成像。心肌回声增加与实施例 10 中观察到的类似，不同的是，在左心室血液中的衰减峰很不明显。

实施例 21-用全氟丁烷气体分散液和全氟二甲基环丁烷乳液对兔心脏进行体内成像

制备含对应于 1 μ l 气体含量的量的按实施例 1(b1)制备的全氟丁烷微泡分散液的注射针管和另一含有 105 μ l 按实施例 1(aq)制备的全氟二甲基环丁烷乳液的注射针管。利用插入耳静脉的导管，将两针管

中的内含物同时注射给 5kg 的兔。用开胸的胸骨旁短轴投影，用带有 P5-3 探针的 ATL HDI-3000 扫描仪完成心脏的 B 模式成像。结果与实施例 18 中观察到的类似。

实施例 22-超声处理诱导的药物传递

给 3kg 麻醉的新西兰黑兔静脉内同时注射 0.04ml 按实施例 1(aq) 制备的全氟二甲基环丁烷乳液和按实施例 1(b1) 所述制备的 0.12ml 全氟丁烷气体悬浮液，用带有 P5-3 探针的 ATL HDI-3000 扫描仪对左肾进行成像，将扫描仪调至最大输出功率。在肾实质中观察到显著的气泡生长和积累。然后将 160mg FITC-葡聚糖(分子量 2000000)溶解在 5ml 水中，并静脉内注射，在同一位点再进行 5 分钟的超声成像，此时，将扫描仪换至 Power Doppler 模式，调至最大声输出。然后杀死动物，取出两个肾并用紫外光检测。在存在微泡时，暴露于成像超声波的左肾区域内的小间隙中，观察到为 50-100 μ m 点的数量增加的荧光。与每个所述点有关的是没有血管内荧光的肾单位。

实施例 23-作为气体分散液的 Albunex®

将 0.3ml/kg Albunex®和按实施例 1(aq) 所述制备的 1.5 μ l/kg 全氟二甲基环丁烷乳液静脉内注射给 20kg 麻醉的雄性杂种狗，然后按实施例 10 所述进行超声成像。心肌对比增加与实施例 10 中的一样。

实施例 24-在兔心脏成像中的导向微泡

将按实施例 1(az) 所述制备的 0.1 μ l/kg 微泡静脉内注射给兔，同时用带有 P5-3 探针的 ATL HDI-3000 扫描仪进行兔心脏的超声成像。观察到微弱但持续的心肌回声增加。3 分钟后，注射按实施例 1(aq) 制备的 1.5 μ l/kg 全氟二甲基环丁烷乳液。在声穿透的心肌中观察到回声强度略有增加。

实施例 25-用全氟丁烷气体分散液和全氟二甲基环丁烷乳液进行大鼠

心脏的体内成像

按实施例 19 所述用大鼠完成试验，得到类似的结果。

实施例 26-用全氟丁烷气体分散液和全氟己烷乳液进行狗心脏的体内成像

将按实施例 1(ar)所述制备的 0.1 μ l/kg 全氟己烷乳液和按实施例 1(b1)所述制备的 0.2 μ l/kg 全氟丁烷微泡悬浮液按实施例 10 所述同时注射给狗。心肌对比效果与在实施例 10 中观察到的类似。

实施例 27-用全氟丁烷气体分散液和七氟戊-1-烯乳液进行狗心脏的体内成像

将按实施例 1(b1)所述制备的 0.3 μ l/kg 全氟丁烷微泡悬浮液和按实施例 1(am)所述制备的 0.15ml 七氟戊-1-烯乳液按实施例 10 所述同时注射给狗。观察到相对弱的心肌对比效果，但是该结果比实施例 5 中观察到的结果更强且持续时间更长。

实施例 28-利用消毒的磷脂稳定化的全氟丁烷气体分散液和全氟二甲基环丁烷乳液进行狗心脏的体内成像

将按实施例 1(b1)所述制备的 0.3 μ l/kg 全氟丁烷微泡悬浮液和按实施例 1(bm)所述制备的 0.3 μ l/kg 全氟二甲基环丁烷乳液按实施例 19 所述同时注射给狗。观察到的心肌对比效果与实施例 19 中观察到的类似。

实施例 29-用全氟丙烷气体分散液和全氟二甲基环丁烷乳液进行狗心脏的体内成像

将按实施例 1(bn)所述制备的 0.17ml 全氟丙烷微泡悬浮液和按实施例 1(aq)所述制备的 0.3 μ l/kg 全氟二甲基环丁烷乳液按实施例 19 所述同时注射给狗。观察到的心肌对比效果与实施例 19 中观察到的类似。

实施例 30-用全氟丁烷气体分散液和全氟二甲基环丁烷乳液进行狗胃肠道的体内成像

将按实施例 1(aq)所述制备的 20ml 全氟二甲基环丁烷乳液经胃管给予麻醉的狗。此后，静脉内注射按实施例 1(a)所述制备的少量(0.1-0.2 μ l 气体/kg)全氟丁烷微泡分散液。将超声成像传感器放在腹壁上，微泡在胃壁毛细血管系统中的定位生长提高了对比，同时改善了粘膜轮廓图像。

实施例 31-用全氟丁烷气体分散液和全氟二甲基环丁烷乳液进行狗胃肠道的体内成像

将按实施例 1(a)所述制备的全氟丁烷微泡分散液经胃管给予麻醉的狗。使所述分散液均匀地分布在胃腔内，用超声成像来检测。静脉内注射按实施例 1(aq)所述制备的少量(0.2-1 μ l 全氟化碳/kg)全氟二甲基环丁烷乳液。将超声传感器放在所要检测的区域；微泡在接近粘膜表面的胃液层中生长提高了对比，同时改善了粘膜轮廓图像。

实施例 32-用全氟丁烷气体分散液和全氟二甲基环丁烷乳液进行狗心脏的体内成像并共同施用腺苷

将闭合勒除器放在 22kg 开胸狗的左前下行冠状动脉的主要支管周围，将超声通过时间流量计放在紧靠闭合器的下游，然后调整闭合器，使流量稳定地减少 25%，从约 14ml/分钟降至 10ml/分钟。将分别含有 (i)对应于 4.4 μ l 气体含量的量的按实施例 1(b1)制备的全氟丁烷微泡分散液，(ii)对应于 33 μ l 分散的全氟二甲基环丁烷相的量的按实施例 1(aq)所述制备的全氟二甲基环丁烷乳液，和(iii)溶解于 0.9%盐水中的 3.0mg 腺苷的三个注射器的内容物作为同时注射的药团静脉内注射；10 秒后，将另外 3.0mg 溶解于 0.9%盐水的腺苷在 20 秒内缓慢注射。用带有 P5-3 探针的 ATL HDI-3000 扫描仪进行左心室成像；以最大功率进行连续超声处理 1 分钟以诱导微泡生长，此后，用

B-模式成像检测心肌。在狭窄区(比基线记录亮)和正常区(比基线记录亮得多)之间可观察到灰度水平的明显差异。