



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 92115180.2

[51] Int.Cl⁵

A61K 49/00

[43] 公开日 1993年7月7日

[22] 申请日 92.12.4

[30] 优先权

[32] 91.12.4 [33] US [31] 803,293

[71] 申请人 施特灵温思罗普有限公司

地址 美国纽约州

[72] 发明人 J·尤德森

S·E·包尔

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 卢新华

说明书页数: 9

附图页数:

[54] 发明名称 用于超声造影的造影剂

[57] 摘要

本发明公开一种颗粒及其制备方法,所述颗粒的平均直径小于大约12微米,此颗粒含由人体血清白蛋白包封的脂肪酸芯体。这些材料用作超声造影的造影剂,其散射强度相当于或大于由分散的微气泡而涂到的造影剂的散射强度。但是,与以分散的微气泡为基础的造影剂相比,不论是储存或是在体内使用,本发明的造影试剂均稳定得多。

04 ^

权 利 要 求 书

1. 一种诊断造影剂，含平均直径不大于1.2微米的颗粒，所述颗粒含有由人体血清白蛋白包封的一种或多种脂肪酸芯体。

2. 根据权利要求1的造影剂，所述颗粒平均直径在0.1~1.2微米范围内。

3. 根据权利要求2的造影剂，所述颗粒平均直径在0.1~10微米范围内。

4. 根据权利要求3的造影剂，所述颗粒平均直径在0.1~8微米范围内。

5. 根据权利要求1的造影剂，所述脂肪酸具有6~18个碳原子。

6. 根据权利要求5的造影剂，所述脂肪酸为饱和的。

7. 根据权利要求5的造影剂，所述脂肪酸为直链的。

8. 根据权利要求2的造影剂，所述脂肪酸为不饱和的。

9. 根据权利要求5的造影剂，所述脂肪酸有一支链。

10. 根据权利要求1的造影剂，其进一步包括能与脂肪酸相容的辅助剂。

11. 根据权利要求10的造影剂，所述辅助剂为选自生理能接受的油类和表面活性剂。

12. 根据权利要求11的造影剂，所述辅助剂为胆固醇。

13. 根据权利要求10的造影剂，所述辅助剂的重量含量以脂肪酸的总重量计算为0~50%。

14. 根据权利要求1的造影剂，所述人体血清白蛋白与脂肪酸

的重量比为 10 : 1 ~ 1 : 1。

15. 根据权利要求 14 的造影剂，所述比例为 4 : 1。

16. 一种制备诊断造影剂的方法，所述造影剂含平均直径不大于 1.2 微米的颗粒，所述颗粒含有由人体血清白蛋白包封的一种或多种脂肪酸芯体，该方法包括形成包封有人体血清白蛋白的脂肪酸的细颗粒悬浮液和加热所得悬浮液以凝结人体血清白蛋白。

17. 根据权利要求 16 的方法，所述悬浮液被加热到 90 °C 以上。

18. 根据权利要求 17 的方法，所述悬浮液被加热至少 45 分钟。

19. 根据权利要求 18 的方法，所述悬浮液被加热至少一小时。
~ 600 RPM 范围内。

20. 根据权利要求 16 的方法，所述悬浮液的搅拌速度在 60 ~ 600 RPM 范围内。

21. 根据权利要求 16 的方法，所包括的步骤为 (a) 通过将一种脂肪酸溶解在一种溶剂中制备一种脂肪酸溶液；(b) 将所述脂肪酸溶液与人体血清白蛋白溶液混合以形成由人体血清白蛋白的包封的脂肪酸细颗粒悬浮液；及 (c) 在快速搅拌的同时加热所得悬浮液至 90 °C 以上以凝结人体血清白蛋白。

22. 根据权利要求 16 的方法，所包括的步骤为 (a) 酸化脂肪酸的盐溶液以形成脂肪酸乳状液；(b) 加入人体血清白蛋白；和 (c) 加热凝结人体血清白蛋白。

23. 根据权利要求 22 的方法，将气体在步骤 (b) 之前通入脂肪酸溶液以产生气泡。

2 4 . 根据权利要求 2 3 的方法, 所述气体含氧气。

2 5 . 根据权利要求 2 4 的方法, 所述气体通入起泡持续至少 8 小时。

2 6 . 根据权利要求 2 5 的方法, 所述气体通入起泡持续至少 2 4 小时。

2 7 . 根据权利要求 2 6 的方法, 所述气体通入起泡持续 6 天。

用于超声造影的造影剂

本发明是关于诊断造影领域。更详细地，本发明是关于用于改善采用被称为超声造影的诊断造影技术时所得的影像。

利用超声检查人和动物内部器官是前些时期引入的诊断方法，它是基于兆赫范围（1 MHz以上）内的超声波在不同类型组织之间的内表面上反射。所产生的回波因此被放大并显示出来。对比介质超声心动描记术是这种结合中特别重要的，它被用在M型和二维超声心动描记术中的心脏病诊断。

超声造影包括了超声能量通过一种物质转变，这种物质具有部分定向超声波射线被反射（散射）并被设在需造影区域表面上的探测器接收的声学性能。散射射线的强度在很大程度上取决于散射中心的尺寸以及散射中心和周围介质之间的密度和可压缩性的不同。通过散射超声射线转变成显示在屏幕上的电信号而得到的最后造影的锐度和清晰度经常不足。因而人们在设计生物适应性造影剂(Contrast agents)上作了大量的努力，当将这些造影剂注入到血流中时，它们将使散射射线的强度增加，从而使所得造影的锐度和清晰度增加，提高了观察血液由心脏输送到其它器官流动的能力。

用于超声心回波描记术的许多对比介质已有描述，如不稳定过氧化氢、用二氧化碳浓缩的不稳定氯化钠溶液，由明胶包封的微气泡以及以其它方式稳定的微气泡。见美国专利4,572,203、4,718,433、4,

774,958 和 4,844,882。到目前为止，这类造影剂都是由稳定（或不稳定）微气泡组成。

分子生物系统（Molecular Biosystems）销售的 ALBUNEX 是由微气泡组成的，这种气泡是通过使人体血清蛋白（HSA）溶液经声波处理而制备的。在欧洲，正在研究中的其它体系包括 ECHOVIST 和 LEVOVIST，这些造影剂中含有含大量捕集的空气气泡的半乳糖颗粒悬浮液。所有这些含气泡的体系当受压时都有不稳定缺陷，该压力大约为心脏收缩的血压，即 130 mmHg 或更大。Meltzer 及其同事研究发现，在 120 mmHg 时，HSA 微气泡的寿命为 10 秒钟；ECHOVIST 的活性在 1~2 分钟内会失去一半。压力升高，该速度会剧烈增加。见 Meltzer, R. S. 等人, *Advances in Echocardiography Conference*, 10/4-5/90, Chicago, IL。

因此需要一种对血流压力有抵抗力的超声造影剂。这种材料能使人们观察到先前已不能接近含上述造影剂的气泡的组织 and 器官，例如，在将造影剂注入远距离末梢静脉或动脉后，观察血液通过心脏、肝及其它器官的灌注情景。造影剂还必须含有生物适应性材料，而且应具有一定的粒度分布以使该试剂能容易地通过肺的毛细床。

我们发现，制备由人体血清白蛋白（HSA）和脂肪酸组成的、对血流压力具有很大稳定性的颗粒是可能的。这些颗粒散射超声射线的水平与已有的微气泡材料相似或更高。更详细地，本发明提供了一些含由人体血清白蛋白包封的脂肪酸芯的超声造影剂（imaging agents）。

另一方面，本发明提供了一种制备超声造影剂的方法，该方法包括（a）通过将脂肪酸在一种溶剂中溶解而制备脂肪酸溶液；（b）将脂肪酸溶液与 HSA 溶液混合，从而形成具有 HSA 涂层的细颗粒

脂肪酸悬浮液；和（c）加热所得悬浮液至高于90℃，并同时迅速搅拌以使HSA凝结。加热使白蛋白分子交联成稳定的网络并分离出可能使用过的任何低沸点（有机）溶剂。尽管通常选择与水混溶的有机溶剂，但使用不与水混溶的溶剂也是有可能的。

在本发明可选择的方法中，脂肪酸悬浮液是通过酸化脂肪酸的盐溶液以形成脂肪酸乳浊液而制备的，所述盐典型地为钠盐。在加热使HSA凝结之后再加入HSA。在本方法中，避免了使用脂肪酸的溶剂。

本发明的造影剂的平均直径必须在0.1到1.2微米的范围内，其中0.1到1.0微米为优选，0.1到0.8微米为更加优选。

用于形成本发明造影剂的脂肪酸是选自具有6到18个碳原子的脂肪酸。它可以是饱和的 $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}]$ ，其中n为4到16的整数]或是不饱和的，可以是直链或是支链的。在体温（37℃）时为液体为优选。脂肪酸的混合物也是适宜的。尽管这类混合物可以包括在37℃时通常是固体的脂肪酸，以及在37℃时通常是液体的脂肪酸，但是混合物在37℃时为液体为优选。

用于制备本发明造影剂的适宜脂肪酸例子包括己酸、十四烷酸、油酸、硬脂酸、辛酸、异硬脂酸、棕榈酸和月桂酸。

根据脂肪酸的重量计算，本发明造影剂的脂肪酸部分可含高达50%重量的与生理相适应的辅助剂，在37℃时辅助剂为液体为优选。这些辅助剂可包括油（如胆固醇），以及表面活性剂。它们可具有增加回波产生力（echogenicity）、控制颗粒尺寸等的作用。

另外，HSA可以是经过改性的，如为了预防免疫响应或增加造影剂在器官中的停留时间，可在HSA中加入聚亚烷基二醇。

在本发明的造影剂颗粒中，H S A 部分与脂肪酸部分的重量比例大约为 10 : 1 到 1 : 1，其中 6 : 1 到 3 : 1 为优选，大约 4 : 1 为更优选。

在本发明的一种方法中，发明的造影剂是通过在 H S A 溶液中沉积脂肪酸，然后加热使 H S A 凝结而制备的。在此过程中应充分搅拌以保证得到可接受的粒度分布。在本发明优选的一个实施例中，沉积是通过在使用声波处理机提供所需搅拌的同时向 H S A 溶液中注入脂肪酸溶液而完成的。尽管可使用任意合适的搅拌速度，我们优先选择 60 到 600 RPM 的速度范围。我们还发现，回波产生力的增加程度随着搅拌速度的增加而增加。

在本发明一种可选择的方法中，发明的造影剂是这样制备的，即首先产生一种脂肪酸水悬浮液，如将酸的钠盐溶液酸化，然后将 HSA 与悬浮液混合，再加热使 H S A 凝结。

在这种方法的一个优选实施例中，为了提高所得颗粒的回波产生力，在将脂肪酸悬浮液与 H S A 混合之前在该悬浮液中通入气体以产生气泡。尽管其它生理上可接受的气体可被采用，优选的该气体为氧气。在该实施例中，气体通入悬浮液产生气泡的时间至少为 8 小时，更优选为至少 24 小时。在一个实验（见实施例 6）中，结果发现，向悬浮液中通 6 天的产生气泡的氧气能大大地增强回波产生力。

优选地，沉积后的加热步骤是渐进进行的，持续至少大约 45 分钟，至少一小时为优选。

实际上，造影剂通常是以本发明的颗粒在一种生理能接受的液体中的悬浮液形成注入到受体上去的，该悬浮液一般含 0.1 ~ 3%（重量 / 体积）的固体，0.1 ~ 2% 为优选，大约 1.5% 为更加

优选。

实施例 1 制备由 H S A 和十四烷酸组成的超声造影剂

将 3.5 ml 含 7% 十四烷酸的四氢呋喃溶液注入到 25 ml 含 2% 人体血清白蛋白的溶液中，此时溶液用加热系统 W P 3 7 5 声波处理机搅拌。将所得悬浮液经 3 分钟的声波处理，处理后温度为 51℃（此温度远低于 H S A 的凝结温度）。然后，在搅拌（大约 60 RPM）的同时将悬浮液加热到大约 95℃。该加热步骤所耗费的总时间大约为 55 分钟。此时，悬浮液基本上不含四氢呋喃并呈半透明外观。颗粒平均直径大约为 6 微米。我们利用 7 Mhz 射线检验了这种悬浮液的一个样品，此悬浮液的散射（回波产生力）水平大约为 1.1 mV（毫伏），结果很好。这至少比水的散射水平多一个数量级。

实施例 2 使用高搅拌速度

根据实施例 1 中描述的方法重复制备 H S A / 十四烷酸造影剂，其造影剂的回波产生力水平为 1.9 MV。在同样的制备中，搅拌速度提高一个数量级（从大约 60 RPM 提高到 600 RPM）。这包括搅起大量空气泡沫。大的捕集的空气气泡通过静置悬浮液 24 小时而被消除，即通过使大的气泡升至液面，然后，要测试的样品由容器的底部取出。采用这种方法制备的造影剂的回波产生力水平为 5.7 mV。正如上面所指出的，应该注意，这个测量结果不应是大的捕集的气泡的功效。在颗粒直径放大 3000 倍的显微镜中观看，没有发现气泡的存在。在此放大倍数时，人们能够分辨直径大于 0.2 微米的气泡。颗粒的直径范围为大约 1 ~ 1.2 微米。在室内条件下存放一个月，其回波产生力水平实际上相同。（5.4 mV）。

为了对比，在大约 600 RPM 条件下迅速搅拌 2% 的 H S A 溶液。

超初，其回波产生力值也很高（超过 50 mV）（搅拌后立即测量）。但是，散射强度随时间很快下降，以致于一会儿之后，所获得的信号仅仅高于背景（大约 2 MV）。

实施例 3 利用不同的脂肪酸制备 H S A / 脂肪酸造影剂

根据实施例 1 中描述的方法，使用下列脂肪酸制备 H S A 悬浮液：棕榈酸、油酸、月桂酸和硬脂酸。所有这些都显示出了很高（大于 30 mV）的回波产生力。

实施例 4 使用不与水混溶的有机溶剂

根据实施例 1 中描述的方法制备 H S A / 十四烷酸悬浮液，但使用正己烷代替四氢呋喃。这样，当将正己烷溶液与 H S A 混合时会形成水包油型乳状液。随后的加热分离出正己烷并留下悬浮在 H S A 中的脂肪酸。用这种方法制备的浓度为含约 1.9% 固体的悬浮液显示出与使用四氢呋喃时所得的悬浮液回波产生力基本相同（27 mV）。

实施例 5 可供选择的制备方法（不使用有机溶剂）

采用 0.1 N HCl 滴定 50 ml 0.5% 油酸钠的水溶液样品，使最终 pH 值为 3.5。由于生成了一种油酸悬浮液，所以溶液变得非常混浊。光学显微术测量的粒径在 0.1 微米范围内。

将 30% 人体血清白蛋白的水溶液加入到此乳状液中以使最后的白蛋白浓度为 2.0%。然后将混合液在中等搅拌速度条件下加热 60 分钟以使最后温度为 94 °C。与水相比（1.2 mV），测量上述溶液的回波产生力为 15.9 mV。

实施例 6 使用氧化以提高回波产生力

根据实施例 5 中描述的方法制备油酸乳状液，在六天时间内将纯氧气通入乳状液。如上所述，将人体血清白蛋白加入，并在中等搅拌

速度下加热此混合液 30 分钟，该时间结束时，温度为 94 °C。与水相比（1.2 mV），测量上述溶液的回波产生力为 9.3 mV。

尽管不打算与本发明的任何理论相联系，但却注意到氧气容易被油酸吸收。可以想象，在加热过程中，溶解的氧气被油酸的表面吸收，此时氧气被包封油酸的白蛋白捕集（由于在高于其凝结温度下加热）。这些气泡被假定成很小（在 3000 倍条件下不可见）而且在造影剂中显然非常稳定。可以想象其它气体如氩气、氮气、二氧化碳、氦气以及氧化亚氮也具有同样的作用。

因此，下面的结论也是可能的，即使没有本实施例的氧气增强技术，本发明的造影剂颗粒的回波产生力很大的原因是由于有被包封的氧气微气泡，这种氧气微气泡可能被捕集在脂肪酸和 HSA 之间的表面上。

实施例 7 稀释作用

根据实施例 6 的方法制备了一种悬浮液。其平均粒径为 8 微米。固体含量为 2.5% 时的回波产生力为 3.5 mV。通过加入水将溶液浓度稀释成原始浓度的一半并测量其回波产生力。重复稀释直至溶液浓度为原始浓度的 1/32。此系列实验的数据如下：

<u>浓度</u>	<u>回波产生力 (Mv)</u>
2.5%	3.5
1.25%	8.7
0.625%	7.8
0.31%	2.7
0.155%	1.7
0.078%	7.5

数据表明，当浓度降至小于 0.1% 时，该系统保持很好的散射水平。

实施例 8 加热前在油酸和 H S A 悬浮液中加入少量油酸钠的作用

根据实施例 6 描述的方法制备了一种悬浮液。其颗粒尺寸为 6 ~ 10 微米。固体含量为 2.0% 时的回波产生力为 20 mV。另一种悬浮液是通过加热前加入少量油酸钠（与 H S A 的重量比为 2%）而制备的。在固体含量及颗粒尺寸相同时，由此方法制备的悬浮液的回波产生力为 36 mV。

实施例 9 压力作用

将按实施例 2 描述的方法制备的 H S A / 棕榈酸颗粒悬浮液的一个样品在 160 mmHg 压力下作用 30 分钟。结果表明在压力作用前后的回波产生力变化很小（两种情况下均为 70 mV）。这表明了这些造影剂对压力变化的稳定性。

实施例 10 稀释脂肪酸的作用

根据实施例 1 中描述的方法制备了一系列悬浮液，但其中部分脂肪酸（这里采用十四烷酸）被胆固醇代替，以保证胆固醇与十四烷酸的比例为 1 : 1、2 : 1 和 1 : 2。只有十四烷酸含量高的样品显示出高的散射水平。也就是说，不是脂肪酸的油类（如胆固醇）不能使 H S A 具有足够的增加稳定的回波产生颗粒的能力。相反地，它们用作稀释剂，并且只能允许占很小的比例。

实施例 11 代替脂肪酸醇的作用（比较实施例）

根据实施例 1 描述的方法制备悬浮液，但采用十四烷醇代替十四烷酸。这种醇也称为 1-十四烷醇。其散射水平比由十四烷酸得到的悬浮液低得多，这表明，在本发明的实际使用中不能使用脂肪醇代替

脂肪酸。

实施例 1 2 采用葡聚糖代替 H S A

根据实施例 1 描述的方法制备悬浮液，只是采用葡聚糖聚合物代替 HSA。生成了很好的十四烷酸悬浮液，但其回波产生力很小 (2.8mV)。这就表明在本发明的实际使用中只能采用 H S A。

实施例 1 3 采用非脂肪酸对比

根据实施例 1 的方法进行对比实验，只是不采用脂肪酸。结果没有观察到散射射线。这再一次证明本发明使用脂肪酸的必要。

实施例 1 4 心脏左侧造影的论证

将按实施例 1 描述的方法制备的悬浮液注入兔子的右心室，可以观察到左心脏造影，这就表明该造影剂经过肺的毛细床、肺移至左心室。另外，采用同样的注射方法可以观察到很好的肝充满。当通过耳静脉注射时，也能得到很好的左心脏造影。这些实验是在马萨诸塞总医院 (Massachusetts General Hospital) 药学和造影研究中心 (Center for Pharmaceutical and Imaging Research) 采用 7.5 Mhz 射线和 Acuson 造影机进行的。

当然，可在不背离本发明的范围和实质前提下进行改变和修正。