

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷
A61K 9/127 A61K 49/18



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 95195094.0

[45]授权公告日 2003 年 1 月 8 日

[11]授权公告号 CN 1098068C

[22]申请日 1995.7.26 [21]申请号 95195094.0

[30]优先权

[32]1994.9.16 [33]US [31]08/307,305

[86]国际申请 PCT/US95/09392 1995.7.26

[87]国际公布 WO96/08234 英 1996.3.21

[85]进入国家阶段日期 1997.3.14

[73]专利权人 ImaRx 药物公司

地址 美国亚利桑那州

[72]发明人 艾文·C·安格尔

特里·O·马斯安纳格

大卫·耶柔赫尔

[56]参考文献

US4544545A 1985.10.1 A61K49/00

US5219538A 1993.6.15 A61K9/127

WO9004384A 1990.5.3

审查员 张 伟

[74]专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任
公司

代理人 丁业平

权利要求书 3 页 说明书 32 页 附图 3 页

[54]发明名称 装有用于诊断和治疗的多相组合物的
容器

[57]摘要

本发明公开了装有类脂水悬浮液相和与含水稳定化相基本上分离的气相的容器,该容器可用于诊断显影如超声和核磁共振显影以及可用于治疗应用。

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

5 1. 一种密封的容器，其内容物为含有类脂的水悬浮液相和含有基本上不溶性气体的液面上气相，其中在使用前震摇所述容器后该容器产生用作造影剂的气体填充的脂质体。

10 2. 权利要求 1 的密封的容器，其中所述基本上不溶性气体选自六氟化硫、全氟丙烷、全氟丁烷、全氟环丁烷、全氟甲烷、全氟乙烷和全氟戊烷。

3. 权利要求 2 的密封的容器，其中所述基本上不溶性气体选自全氟丙烷和全氟丁烷。

15 4. 权利要求 3 的密封的容器，其中所述的基本上不溶性气体是全氟丙烷。

5. 权利要求 1 的密封的容器，其中还含有选自空气、氧气、二氧化碳和氮气的可溶性气体。

20 6. 权利要求 1 的密封的容器，其中所述的类脂包括选自二棕榈酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酸、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺的磷脂。

25 7. 权利要求 1 的密封的容器，其中所述的水悬浮液相还包含靶向配体。

8. 权利要求 7 的密封的容器，其中所述的靶向配体是聚乙二醇。

9. 权利要求 1 的密封的容器，其中所述的水悬浮液相包含二棕榈酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酸、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺-PEG5000。

30 10. 权利要求 9 的密封的容器，其中所述的水悬浮液相包含选自

二棕榈酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酸、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺-PEG5000，其摩尔百分比为 82%：10%：8%。

5 11. 权利要求 1 的密封的容器，其中所述的水悬浮液相还含有悬浮剂。

12. 权利要求 1 的密封的容器，其中所述的水悬浮液相还含有粘度调节剂。

10 13. 权利要求 12 的密封的容器，其中所述的粘度调节剂选自甘油、丙二醇和聚乙烯醇。

14. 权利要求 1 的密封的容器，其中所述的水悬浮液相还含有治疗或诊断剂。

15 15. 权利要求 14 的密封的容器，其中所述的诊断剂是核磁共振显影造影增强剂。

20 16. 权利要求 15 的密封的容器，其中所述的核磁共振显影造影增强剂是顺磁离子。

17. 权利要求 1 的密封的容器，其中所述的容器是无菌的。

25 18. 气体填充的脂质体，其包含基本上不溶性气体和可溶性气体。

19. 权利要求 18 的气体填充的脂质体，其中所述的基本上不溶性气体选自六氟化硫、全氟丙烷、全氟丁烷、全氟环丁烷、全氟甲烷、全氟乙烷和全氟戊烷。

30 20. 权利要求 19 的气体填充的脂质体，其中所述基本上不溶性气体选自全氟丙烷和全氟丁烷。

21. 权利要求 20 的气体填充的脂质体，其中所述的基本上不溶性气体是全氟丙烷。

5 22. 权利要求 18-21 中任一项所述的气体填充的脂质体，其中所述的可溶性气体选自选自空气、氧气、二氧化碳和氮气。

23. 权利要求 18-21 中任一项所述的气体填充的脂质体，其中所述的脂质体包括一层类脂单层。

10

24. 权利要求 18-21 中任一项所述的气体填充的脂质体，其中所述的脂质体包括一层类脂双层。

15

25. 权利要求 18-21 中任一项所述的气体填充的脂质体，其中所述的脂质体包括两层以上的类脂层。

装有益于诊断和治疗的多相组合物的容器

5 本申请是1993年11月30日申请的序号为No. 159,687的美国申请的部分后续申请，而No. 159,687又是1993年6月11日申请的序号为No. 076,239的美国申请的部分后续申请，而No. 076,239又是1991年6月18日申请的序号为No. 717,084和No. 716,899的美国申请的部分后续申请，而No. 717,084和No. 716,899又都是1990年8月20日申请的序号为No. 569,828的美国申请的部分后续申请，而No. 569,828又是1989年12月22日申请的序号为No. 455,707的美国申请的部分后续申请。

15 本申请也是1993年11月30日申请的序号为No. 160,232的美国申请的部分后续申请，而No. 160,232又是1993年6月11日申请的序号为No. 076,250的美国申请的部分后续申请，而No. 076,250又是1991年6月18日申请的序号为No. 717,084和No. 716,899的两个美国申请的部分后续申请，而No. 717,084和No. 716,899又都是1990年8月20日申请的序号为No. 569,828的美国申请的部分后续申请，而No. 569,828又是1989年12月22日申请的序号为No. 455,707的美国申请的部分后续申请。

20 本申请还是1994年3月11日申请的序号为No. 212,533的美国申请的部分后续申请，而No. 212,533又是1993年6月11日申请的序号为No. 076,239和No. 076,250的两个美国申请的部分后续申请。No. 076,239和No. 076,250的两个美国申请的来龙去脉如上文所列。

25 本申请在此要求这些申请的优先权，并且这些申请均以其全文所公开的内容引入本文作参考。

30

本发明的背景

35 超声是一种比其它诊断方法有许多优越性的诊断显影技术。与核医学和X射线等显影技术不同，超声不使患者遭受电离辐射的有害影响。而且，相对来讲超声不贵并且可进行便携式检查。

在超声显影中，声音是通过转换器被传递到患者或动物体内的。当声波通过体内传播时，它们会碰到组织和流体的界面。取决于体内的组织和流体的声学性质，超声波部分地或全部地被反射或吸收。当声波被界面反射时，它们被转换器内的接收器探测并被加工以形成影像。体内的组织和流体的声学性质，决定了所得影像的对比度。

核磁共振显影（MRI）是相对新颖的显影技术，与X射线不同，它不利用电离辐射。同计算机化X射线断层照相术一样，MRI能产生身体的横断面影像，然而，MRI还有可在任何扫描平面（即，轴向的、头顶的、前后向的或正交的）产生影像的优点。

MRI利用磁场、高频能量和磁场梯度来产生身体的影像。组织间的对比或信号强度的差异大体反映了组织的T1和T2松弛值和质子密度（有效地反映了自由水的含量）。

近几年在诊断超声和MRI技术方面已经取得了进展。然后，尽管已在各方面进行了技术改进，超声和MRI在许多方面还仍不完美，尤其是在肝脏、脾脏、肾脏、心脏和脉管系统的显影和疾病的探查（包括血流的测量）方面。对这些区域的探测能力以及进行所述测量的能力，依赖于组织或流体与其周围组织或流体间的声学性质（超声）或T1和T2的信号强度（MRI）差异。因此，人们一直在寻求使组织或流体与其周围组织或流体间差异增加以及改善超声或核磁共振显影和疾病检查的造影剂。

本发明通过提供装有类脂水悬浮液相和与该类脂水悬浮液相基本分离的气相的便利容器来解决这些以及其它的问题，在使用前振荡所述的便利容器，产生用于诸如超声或核磁共振显影以及其它用途的极佳的气体填充的脂质体造影剂。因造影剂是在使用之前刚刚制备的，则可避免其储藏有效期稳定性的问题。

本发明概述

本发明提供一种容器，容器内装有（i）类脂水悬浮液相和（ii）与该类脂水悬浮液相基本分离的气相。在使用前，可以振荡容器的内容物，由此产生气体填充的脂质体组合物，该组合物是用于例如超声或核

磁共振显影以及治疗应用的具极佳均一性的造影剂。

根据本发明刚好在使用前才制备造影剂的能力避免了现有技术中的许多造影剂遇到的储藏有效期稳定性的问题。本发明的自给装置使灭

5

下面对本发明的这些和其它的方面及优点进行更详细地讨论。

附图的简要说明

10

图 1 是装有类脂水悬浮液和与之基本分离的液面上气体的容器的侧切视图。

图 2 是振荡装置图，它可用于振荡图 1 的容器，由此混合类脂水悬浮液和气体，并产生用于超声或核磁共振显影的造影剂。

15

图 3 是用图 1 所示的容器和图 2 所示的振荡装置产生的气体填充的脂质体的显微照片。

本发明的详细描述

20

本发明的容器装有类脂水悬浮液相和基本分离的气相。在使用前，可振荡容器及其内容物，使类脂和气相混合，导致气体填充脂质体的形成，该脂质体包裹了气体。所得的气体填充的脂质体提供了用于诊断显影、尤其是用于超声或核磁共振显影的极佳的强造影剂。

25

许多类脂可用于所述的类脂水悬浮液相。根据需要，类脂可以悬饱和的或不饱和的，可以是直链的或支链形的。这样的类脂可以包括，例如，含有宽范围碳原子数、优选在大约 12 个碳原子和大约 22 个碳原子之间的脂肪酸分子。也可使用由类异戊二烯单元、异戊烯基、和 / 或甾醇部分（例如胆甾醇、胆甾醇硫酸酯、及其类似物）组成的烃类。如果需要，类脂也可以带有聚合物链如两亲聚合物聚乙二醇（PEG）或聚乙烯吡咯烷酮（PVP）或其衍生物（用于体内靶向），或带电荷氨基酸如聚赖氨酸或聚精氨酸（用于结合带负电荷的化合物）或糖类（用于体内靶向）例如记载于 No. 4,310,505 的美国专利中的糖类、或糖脂（用于体内靶向）、或抗体及其它的肽及蛋白质（用于体内靶向）等等。可将靶向或结合化合物简单地加入到类脂水悬浮液相中，或者将其特异性地

30

35

脂,以便它们自己也能与其它化合物如药物、遗传物质、或其它治疗剂结合。

适当的类脂和特别适当的类脂类别的例子包括:磷脂酰胆碱类,如二油酰磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC)、和二硬脂酰磷脂酰胆碱;磷脂酰乙醇胺类,如二棕榈酰磷脂酰乙醇胺 (DPPE)、二油酰磷脂酰乙醇胺和 N-琥珀酰-二油酰磷脂酰乙醇胺;磷脂酰丝氨酸类;磷脂酰甘油类;鞘脂类;糖脂类 (glycolipids) 如神经节苷脂 GM1;糖脂类 (glucolipids);硫苷脂类;糖鞘脂类;磷脂酸类如二棕榈酰磷脂酸 (DPPA);棕榈酸类;硬脂酸类;花生四烯酸类;月桂酸类;肉豆蔻酸类;月桂烯酸类;抹香鲸酸类;9-十四碳烯酸类;9-十六碳烯酸类;6-十八碳烯酸类;油脂酸类;异月桂酸类;异肉豆蔻酸类;异棕榈酸类;异硬脂酸类;胆甾醇和胆甾醇的衍生物如胆甾醇半琥珀酸酯、胆甾醇硫酸酯、和胆甾醇- (4'-三甲氨基)-丁酸酯;聚氧乙烯脂肪酸酯类;聚氧乙烯脂肪酸醇类;聚氧乙烯脂肪酸醇醚;聚氧乙烯化的山梨糖醇酐脂肪酸酯;甘油聚氧乙烯乙二醇羟基硬脂酸酯;甘油聚氧乙烯乙二醇蓖麻醇酸酯;乙氧基化的大豆甾醇类;乙氧基化的蓖麻油;聚氧乙烯-聚氧丙烯脂肪聚合物类;聚氧乙烯脂肪酸硬脂酸酯类;12-(((7'-二乙氨基香豆素-3-基)-羰基)-甲氨基)-十八烷酸;N-[12-(((7'-二乙氨基-香豆素-3-基)-羰基)-甲基-氨基)十八烷酰基]-2-氨基-棕榈酸;1,2-二棕榈酰基-Sn-甘油;1,2-二棕榈酰基-Sn-3-琥珀酰甘油;1,3-二棕榈酰基-2-琥珀酰基-甘油;和1-十六烷基-2-棕榈酰基-甘油磷酰乙醇胺和棕榈酰基高半胱氨酸;月桂基三甲基溴化铵 (月桂基=十二烷基);鲸腊基三甲基溴化铵 (鲸腊基=十六烷基);肉豆蔻基三甲基溴化铵 (肉豆蔻基=十四烷基);烷基二甲基苄基氯化铵,如其中的烷基为 C₁₂、C₁₄ 或 C₁₆ 烷基;苄基二甲基十二烷基溴化铵;苄基二甲基十二烷基氯化铵;苄基二甲基十六烷基溴化铵;苄基二甲基十六烷基氯化铵;苄基二甲基十四烷基溴化铵;苄基二甲基十四烷基氯化铵;鲸腊基二甲基乙基溴化铵;鲸腊基二甲基乙基氯化铵;溴化鲸腊基吡啶翁;氯化鲸腊基吡啶翁;N-[1-(2,3-二油酰氧基)-丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵 (DOTMA);1,2-二油酰氧基-3-(三甲氨基)丙烷 (DOTAP);和1,2-二油酰基-e-(4'-三甲氨基)-丁酰基-Sn-甘油 (DOTB)。

一旦本领域的技术人员掌握了本发明公开的内容,对于他们来讲,

显然上面所列的类脂仅是示例性的并且也可使用其它的类脂、脂肪酸、和衍生物以及它们的混合物，而且这些额外的化合物也将落入本文所用的术语类脂的范围之内。正如熟练的技术人员会认识到的，所述的类脂和/或其混合物，可通过振荡容器形成脂质体（也就是具有内部空腔的脂质球），所述脂质体在其内部空腔包裹了来自气相的气体。该脂质体可由单层类脂层（类脂单层）组成，也可由两层类脂层（类脂双层）或两层以上的类脂层（类脂多层）组成。

一般说来，类脂优选以其凝胶状态存在，也就是说，在低于类脂物质的凝胶态向液晶态转变的相变温度（ T_m ）下存在，尤其是在振荡期间。各种不同类脂的凝胶态向液晶态转变的相变温度是已知的。用已熟知的技术也可容易地将这些温度计算出来。下表1摘自 Derek Marsh 的“CRC Handbook of Lipid Bilayers”（CRC 类脂双层手册），139 页，CRC 出版，Boca Raton，佛罗里达州（1990）。表1显示了例如，各种有代表性的饱和胆碱磷酸类脂的主链相变温度。

表 1

饱和的二脂酰基-Sn-甘油基-（3）-胆碱磷酸类:主链熔解转变

脂酰基键中的碳	主相变温度℃
1,2-（12:0）	-1.0
1,2-（13:0）	13.7
1,2-（14:0）	23.5
1,2-（15:0）	34.5
1,2-（16:0）	41.4
1,2-（17:0）	48.2
1,2-（18:0）	55.1
1,2-（19:0）	61.8
1,2-（20:0）	64.5
1,2-（21:0）	71.1
1,2-（22:0）	74.0
1,2-（23:0）	79.5
1,2-（24:0）	80.1

20

在本发明的优选实施方案中，含水类脂相还包含聚合物，优选两亲

聚合物，并优选与类脂直接结合（即，化学连接）的聚合物。两亲化合物优选为聚乙二醇或其衍生物。最优选的组合是与聚乙二醇（PEG）、特别是平均分子量为约 5000 的 PEG 结合的二棕榈酰磷脂酰乙醇胺（DPPE）（DPPE-PEG5000）。PEG 或其它聚合物可以通过共价键如酰胺键、氨基甲酸酯键或胺键与 DPPE 或其它类脂结合。另外，酯键、醚键、硫酯键、硫代酰胺键或二硫键（硫酯键）可用于 PEG 或其它聚合物而使聚合物与，例如，胆甾醇或其它磷脂类结合起来。特别优选的类脂组合是 DPPC、DPPE-PEG5000 和 DPPA，尤其是以 DPPC:DPPE-PEG5000:DPPA=约 82%:8%:10%（摩尔百分比）的组合。

为制备含水相，可以将类脂与水（优选蒸馏水）、正常（生理）盐水、磷酸盐缓冲液或其它水溶液混合，这一点对于本领域的技术人员是显然的。

许多不同的气体可以用于本发明的气相。优选的气体是基本上不溶于类脂水悬浮液相的。“基本上不溶于”，是指气体在 20℃和 1 个大气压下其在水中的溶解度维持在等于或小于 18 毫升气体/千克水。如此说来，基本上不溶的气体具有的溶解度小于氮气的溶解度。溶解度在 20℃和 1 个大气压下优选等于或小于 15 毫升气体/千克水，更优选等于或小于 10 毫升气体/千克水。在前面所述的温度和压力下，一类优选的气体的溶解度为约 0.001—约 18 毫升气体/千克水，或为约 0.01—约 15 毫升气体/千克水，或为约 0.1—约 10 毫升气体/千克水，或为约 1—约 8 毫升气体/千克水，或为约 2—约 6 毫升气体/千克水。例如，在 20℃和 1 个大气压下，全氟代烃和氟化气体六氟化硫的溶解度小于 10 毫升气体/千克水，因此它们是优选的。不是基本上不溶的气体，如本文所定义的，是指可溶解的气体。

其它合适的基本上不溶或可溶的气体包括（但不限于）：六氟丙酮、异丙基乙炔、丙二烯、四氟丙二烯、三氟化硼、1,2—丁二烯、1,2—丁二烯、1,2,3—三氯丁二烯、2—氟—1,3—丁二烯、2—甲基—1,3—丁二烯、六氟—1,3—丁二烯、丁二炔、1—氟丁烷、2—甲基丁烷、十氟丁烷（全氟丁烷）、十氟异丁烷（全氟异丁烷）、1—丁烯、2—丁烯、2—甲基—1—丁烯、3—甲基—1—丁烯、全氟—1—丁烯、全氟—2—丁烯、4—苯基—3—丁烯—2—酮、2—甲基—1—丁烯—3—炔、硝酸丁酯、1—丁炔、2—丁炔、2—氯—1,1,1,4,4,4—六氟—1—丁炔、3—甲基—1—丁炔、全氟—2—丁炔、2—溴—丁醛、

硫化羰、丁烯腈、环丁烷、甲基环丁烷、八氟环丁烷（全氟环丁烷）、
 全氟异丁烷、3-氯环戊烯、环丙烷、1,2-二甲基环丙烷、1,1-二
 甲基环丙烷、乙基环丙烷、甲基环丙烷、联二炔、3-乙基-3-甲基
 二氮丙啶、1,1,1-三氟重氮乙烷、二甲胺、六氟二甲胺、二甲基乙基
 5 胺、双-（二甲基膦）胺、2,3-二甲基-2-降冰片烷、全氟二甲胺、
 氯化二甲基氧 翁、1,3-二氧戊环-2-酮、1,1,1,2-四氟乙烷、
 1,1,1-三氟乙烷、1,1,1,2,2-四氟乙烷、1,1,1-三氟乙烷、1,1,2,2-
 四氟乙烷、1,1,2-三氯-1,2,2-三氟乙烷、1,1-二氯乙烷、1,1-
 二氯-1,2,2,2-四氟乙烷、1,2-二氟乙烷、1-氯-1,1,2,2,2-五氟
 10 乙烷、2-氯-1,1-二氟乙烷、1-氯-1,1,2,2,2-五氟乙烷、2-
 氯-1,1-二氟乙烷、1-氯-1,1,2,2-四氟乙烷、2-氯-1,1-二
 氟乙烷、氯乙烷、氯五氟乙烷、二氯三氟乙烷、氟乙烷、硝基五氟乙烷、
 亚硝基五氟-乙烷、全氟乙烷、全氟乙胺、乙基乙烯基醚、1, 1-二
 氯乙烯、1, 1-二氯-1, 2-二氟-乙烯、1, 2-二氟乙烯、甲烷、
 15 三氟甲烷磺酰氯、三氟甲烷磺酰氟、（五氟硫代）三氟甲烷、溴代-二
 氟代-亚硝基-甲烷、溴代-氟代-甲烷、溴代-氯代-氟代-甲烷、
 溴代-三氟代-甲烷、氯代-二氟代-硝基-甲烷、氯代-二硝基-甲
 烷、氯代-氟代-甲烷、氯代-三氟代-甲烷、氯代-二氟代-甲烷、
 二溴代-二氟代-甲烷、二氯代-二氟代-甲烷、二氯代-氟代-甲
 20 烷、二氟代-甲烷、二氟代-碘代-甲烷、二硅甲烷、氟代-甲烷、碘
 甲烷-碘代-三氟代-甲烷、硝基-三氟代-甲烷、亚硝基-三氟代-
 甲烷、四氟代-甲烷、三氯代-氟代-甲烷、三氟代-甲烷、三氟甲烷
 亚磺酰氯、2-甲基丁烷、甲醚、甲基异丙基醚、乳酸甲酯、亚硝酸甲
 酯、二甲硫、甲基乙烯基醚、新戊烷、氮气（ N_2 ）、氧化氮、1,2,3-
 25 十九烷三羧酸-2-羟基三甲基酯、1-壬烯-3-炔、氧气（ O_2 ）、
 氧 17（ $^{17}O_2$ ）、1,4-戊二烯、正-戊烷、十二氟戊烷（全氟戊烷）、
 十四氟己烷（全氟己烷）、全氟异戊烷、全氟新戊烷、4-氨基-4-
 甲基-2-戊酮、1-戊烯、2-戊烯（顺式）、2-戊烯（反式）、
 3-溴-1-戊烯、全氟代-1-戊烯、四氯代-苯二甲酸、2,3,6-三
 30 甲基-嘧啶、丙烷、1,1,1,2,2,3-六氟-丙烷、1,2-环氧-丙烷、
 2,2-二氟丙烷、2-氨基-丙烷、2-氯-丙烷、七氟代-1-硝基-
 丙烷、七氟代-1-亚硝基-丙烷、全氟丙烷、丙烯、1,1,1,2,3,3-六
 氟-2,3-二氯-丙烷、1-氯-丙烯、氯丙烯（反式）、2-氯-丙
 烯、3-氟-丙烯、全氟代-丙烯、丙炔、3,3,3-三氟丙炔、3-氟-
 35 苯乙烯、六氟化硫、十氟化二硫（ S_2F_{10} ）、2,4-二氨基-甲苯、三氟
 乙腈、三氟甲基过氧化物、二（三氟甲基）硫、六氟化钨、乙烯基乙炔、

5 乙烯基醚、氟气、氦气、氩气、氙气（特别是富含铷的超极化的氙气）、二氧化碳、氮气、和空气。优选氟化的气体（即，含有一个或多个氟分子的气体如六氟化硫）、碳氟化物气体（即，是氟化的碳或气体的氟化气体）、全氟化碳气体（即，被完全氟化的碳氟化物气体如全氟丙烷和全氟丁烷）。

10 虽然从理论上来讲，任何气体都可用于本发明的气相，但可对特定的气体加以选择，以使所得造影剂的所需特征最佳，并满足特定诊断应用的要求。已经发现，例如，某些气体在振摇后形成比其它气体更稳定的气体填充的脂质体，从而这些气体是优选的。还发现，某些气体在诊断显影如超声或 MRI 时产生较好的显影结果。

15 作为提高气体填充的脂质体稳定性的例子，人们发现二氧化碳 < 氧气 < 空气 < 氮气 < 氟气 = 氩气 < 全氟化碳气体。由于这些以及其它方面的原因，氟化的气体、尤其是全氟化碳气体是优选的。

20 另外，虽然在一些情况下，可溶性气体可起到与本发明的气相同样适当的作用，但是基本上不溶的气体倾向于比具有较高溶解度的气体产生更大的稳定性，特别是在通过振荡产生造影剂的时候。而且，根据本发明，在振荡前很容易使这些不溶性气体形成的气相基本上与含水类脂相保持分离。因此，如上文所定义的基本上不溶的气体是优选的。

25 超声显影的质量和超声显影的持续时间也与气体在含水环境中的溶解度有关。一般说来，气体的溶解度降低，可使超声得到持续时间较长、分辨率较高的图像。

30 另外，已普遍观察到振荡产生的气体填充的脂质体的大小与气体在含水环境中的溶解度有关，气体的溶解度较大导致产生较大的气体填充的脂质体。人们也相信脂质体的大小会受到气体与脂质体的内壁间的相互作用的影响。具体地讲，人们相信介面上的相互作用影响张力，结果使内部气体作用在脂质体的类脂内壁上的外向力受到影响。张力的减弱使脂质体变得较小，它是通过减小内部气体产生的力，从而使含水环境在脂质体的外面的力引起气体填充的脂质体收缩。

35 由于 Henry's 公式通常适用于在直至大约 1 个大气压下对微溶的气体的计算，可用该公式估算气体在含水溶剂中的溶解度（Daniels，

F.和 Alberty, R.A., *Physical Chemistry* (物理化学), 第三版, Wiley & Sons 公司, 纽约, 1966). 例如, 空气在 25 °C 时的溶解度为 18.68 ml/kg 水, 氮气在 25 °C 的溶解度为约 18.8 mlkg⁻¹。另一方面, 六氟化硫在 25 °C 的溶解度为约 5.4 mlkg⁻¹。

5

总之, 由于稳定性、不溶解性、和所得脂质体的大小方面的原因, 优选氟化的气体、氟化碳气体、以及全氟化碳气体。尤其优选的是氟化的气体六氟化硫、以及全氟化碳气体全氟丙烷、全氟丁烷、全氟环丁烷、全氟甲烷、全氟乙烷、和全氟戊烷, 特别优选的是全氟丙烷和全氟丁烷。

10

应注意到具有少于 5 个碳原子的全氟化碳在室温下是气体。例如, 全氟戊烷在直到约 27 °C 时还是液体。在该温度以上, 它将占据容器的液面上空间。然而, 已证明即使在室温下也可用全氟戊烷来填充空间液面上 (也就是管形瓶内类脂悬浮液相上面的空间)。通过选择计算出的填充液面上空间的液体全氟戊烷的限定值并在低温下 (例如在 -20 °C) 将液体加入到容器中, 然后对容器抽真空 (有效地除去液面上空间的空气) 并使容器密封, 全氟戊烷将在低于其在 1 个大气压下的沸点的温度下进行液相到气相的转变。因此, 在室温下它将以气体占据液面上的部分或全部空间。正如本领域的技术人员所能认识到的, 人们可以通过运用通常的“拇指规则”估测法来估计出液相向气相转变温度的降低。具体地讲, 压力每降低一半, 沸点将下降约 10 °C。另外, 人们可用建立在基于 Boyle (玻义耳) 定律的理想气体定律上的关系, 计算出作为降低的压力函数的温度的降低。另一个用全氟戊烷填充液面上空间的方法是, 先对液面上空间抽真空, 然后在 27 °C 以上用全氟戊烷填充液面上空间。当然, 该方法不仅限于全氟戊烷、它适用于所有的全氟化碳气体以及一般的气体, 条件是气体的沸点是已知的。

15

20

25

30

35

如果需要, 两种或更多的不同气体可以一起用来填充液面上空间。气体的混合物在所得的气体填充的脂质体的多种应用方面 (如超声显影、MR 显影等应用) 有许多优点。还发现将少量的基本不溶的气体与可溶的气体混合提供了比该混合所预期的稳定性更大的稳定性。例如, 可以将少量的 (例如, 通常至少为约 1 摩尔 %) 全氟化碳气体与空气、氮气、氧气、二氧化碳或其它更易溶的气体混合。振荡后产生的气体填充的脂质体造影剂比空气、氮气、氧气、二氧化碳或其它溶解性更强的气体本身更稳定。

另外，气体混合物的使用可用于弥补气体填充的脂质体大小的增大，否则要被注射到体内的含有纯全氟化碳气体的脂质体将会在体内发生增大。已经发现，一些全氟化碳气体可以吸收或吸入其它气体如氧气。因此，如果静脉注射全氟化碳气体时，它可以吸收溶解于循环血液中的氧气或其它可溶性气体。然后，作为该吸收的结果，所得的气泡可在体内长大。掌握了这些现象的知识，人们可以将全氟化碳气体与可溶性气体如空气、氮气、氧气、二氧化碳预混合，因而使全氟化碳的吸收或吸入性质饱和。结果，这将防止甚至根除气体填充的脂质体在血流中膨胀的可能性。如果脂质体能膨胀到大于 $10\ \mu\text{m}$ 的大小，将其施用于血液中则可能发生危险的栓塞事件，基于这一事实，防止或根除气体填充的脂质体在血流中膨胀的可能性是重要的。通过用比全氟化碳气体更易溶的气体与全氟化碳气体一起填充液面上空间，在注射到体内后，气体填充的脂气体将一般不发生所述增大。因此，作为本发明的结果，脂质体膨胀产生栓塞事件的问题可通过产生根除了或有效地阻止了所述膨胀的脂质体而得以克服。

因此，根据本发明，如果需要，可将基本上不溶的气体与可溶的气体混合来有效地产生高效而稳定的气体填充的脂质体。

下表 2 列出了以不同比例的基本不溶的气体全氟丙烷（PFP）和空气作为液面上空间气体所制备的气体填充的脂质体样品的分析结果。以 3300 RPM 振荡 60 秒，将气体与含水类脂相混合。用光学颗粒大小测定仪（Optical Partical Sizer（Particle Sizing System，Santa Barbara，CA））分析气体填充的脂质体大小和总数。每次分析用 5 微升的样品，每次测定用 4 个样品。

如表 2 所示，即使仅 20% 的气体是 PFP（基本上不溶的气体）而 80% 的气体是空气（可溶性气体的混合物）时，也产生了比仅用空气（0% 的 PFP）时多 100 倍的脂质体。而且，当仅使用空气时（0% 的 PFP），脂质体更不稳定并且大多数的脂质体的大小在 10 微米以上。20%PFP 和 80% 空气的脂质体，看来与 80%PFP 和 20% 空气的脂质体以及其它含中间浓度的 PFP 的样品同样地稳定，而且 20%PFP 和 80% 空气所产生的气体填充的脂质体与 80%PFP 和 20% 空气所产生的脂质体大约同样多。

表 2
全氟丙烷的比例对气泡大小和数目的影响

气体 %PFP	数量加权 均数	体积加权 均数	估算的 颗粒数	小于 10 μm 的颗粒的百分数	估算的每毫升 中的颗粒数	大于 10 μm 的颗粒的百分数
80%						
平均数	2.37	28.76	5.45E+05	98.94	1.10E+09	1.05
STDev	0.07	0.82	4.67E+04	0.08	8.20E+07	0.07
CV	3%	3%	9%	0%	7%	7%
60%						
平均数	2.14	20.75	5.87E+05	99.36	1.15E+09	0.64
STDev	0.02	5.93	7.08E+04	0.10	1.27E+08	0.09
CV	1%	29%	12%	0%	11%	14%
50%						
平均数	2.13	30.35	5.23E+05	99.29	1.07E+09	0.68
STDev	0.07	12.15	1.49E+04		4.37E+07	0.10
CV	3%	40%	3%	0.11 0%	4%	15%
20%						
平均数	2.00	13.64	5.35E+05	99.61	1.07E+09	0.41
STDev	0.04	6.79	2.26E+04	0.06	3.92E+07	0.07
CV	2%	50%	4%	0%	4%	16%
0%						
平均数	2.30	93.28	5.03E+03	98.23	1.00E+07	1.93
STDev	0.21	66.05	4.96E+02	0.26	8.60E+05	0.36
CV	9%	71%	10%	0%	9%	19%

5 在表 2 中，STDev=标准偏差，CV=偏离系数，E + 表示一定幂的指数，例如，5.45E+05=5.45 $\times 10^5$ 。

简言之，已经发现稳定脂质体仅需少量的相对不溶的气体（如 PFP），而绝大部分的气体是可溶性气体。虽然按下式：

10
$$(\text{气体 A 的溶解度}) \times (\text{气体 A 的摩尔百分数}) + (\text{气体 B 的溶解度}) \times (\text{气体 B 的摩尔百分数})$$

计算的两种或两种以上的混合气体的有效溶解度与可溶性气体的溶解度仅有微小的差异，但仅加入少量的不溶性气体，仍有大量的气体填充的脂质体存在并且气体填充的脂质体的稳定性高。

5

虽然不受任何操作理论的束缚，人们相信基本上不溶的气体对于膜的稳定作用是重要的。事实上，人们相信基本上不溶的气体（如 PFP）起到了脂质膜的屏障作用，可能有效地在膜的内表面形成层，阻止了可溶性气体（如空气、氮气等等）的向外逸出。这一发现既令人惊奇又十分有用，因为这使人们可仅用少量的基本上不溶的气体（如全氟化碳或其它氟化气体）和主要是生物相容性更好的（潜在毒性更小的）气体（如空气或氮气）来占据脂质体的大部分体积。

10

正如本领域的技术人员将认识到的，基本上不溶的气体 and 可溶气体在任何混合物中的量可在很宽的范围内变化。然而，基本上不溶的气体通常占气体总量的至少约 0.01%，优选占至少约 0.1%，更优选占至少约 1%，并最优选占至少约 10%。基本上不溶的气体的适当范围的变化取决于各种不同的因素如另外使用的可溶气体、类脂的类型、具体的应用等等。示例性的范围包括约 0.01-99%、优选约 1-95%、更优选约 10-90%、并最优选约 30-85% 的基本上不溶的气体。

15

20

对于诊断超声显影以外的其它用途如诊断核磁共振显影（MRI），虽然也可使用其它气体，但优选使用顺磁气体如强顺磁气体氧 17 气体（ $^{17}\text{O}_2$ ）、氦、氙（特别是富含铷的超极化氙气）或氧气（虽然氧气的顺磁性还不强）来填充液面上空间。氧 17 气体（ $^{17}\text{O}_2$ ）、氦气、富含铷的超极化氙气或氧气最优选与基本上不溶的气体如全氟化碳气体混合。顺磁气体在本领域是已知的，适当的顺磁气体对于本领域的技术人员来讲是显然的。不管是单独使用还是与其它气体联合使用，对于 MRI 应用来讲最优选的气体是 $^{17}\text{O}_2$ 。

25

30

通过使用混合气体， $^{17}\text{O}_2$ 或其它顺磁气体提供了最佳对比度并且全氟化碳稳定了振荡后被裹进气体中的 $^{17}\text{O}_2$ 。在不加入全氟化碳气体的情况下，如 $^{17}\text{O}_2$ 样的气体通常效果较差，因为它在静脉注射后由于它的溶解性而从类脂包被中扩散出来。另外， $^{17}\text{O}_2$ 气体很昂贵。将全氟化碳气体与 $^{17}\text{O}_2$ 联合使用大大增加了产物的功效、并通过更有效地利用昂贵

35

的 $^{17}\text{O}_2$ 气体而使费用降低。其它具有所需顺磁性质的气体如氦气可同样地与全氟化碳气体混合。

5 如下面的表 3 所示，在 MR 显影中可使用各种不同的气体。表 3 示出了气体填充的脂质体中的不同气体的 R_2 ($1/T_2$ /毫摩尔/升·秒 $^{-1}$)。如表 3 所示，不同气体填充的脂质体的应力松弛性差异极大， R_2 松弛值越高表明作为 MR 显影剂的脂质体越有效。在所示的气体中，空气具有最高的 R_2 值。人们相信，空气的值最高是由于空气中氧气的顺磁效应。然而纯氧气却不那么有效，可能是由于氧气的溶解度较高和氧气进入脂质体周围含水环境中达到平衡而引起的。对于空气，氮气（空气的大约 80% 是氮气）有助于稳定脂质体中的氧气。氮气在水中的溶解性比空气小得多。如上所述，可将 PFP 或其它全氟化碳气体与磁活性较强的气体如空气、氧气、 $^{17}\text{O}_2$ 或富含铷的超极化的氦气混合。这样，可制备出稳定的磁活性高的气体填充的脂质体。

15

表 3
大小分布和松弛性

气体	数量权重分布 (μm)	体积权重分布 (μm)	R_1
氮气	6.96 ± 0.63	31.08 ± 7.42	474.6 ± 59.9
六氟化硫	4.31 ± 0.13	44.25 ± 1.23	319.3 ± 42.5
氦气 (Rb)	7.02 ± 1.19	160.90 ± 92.46	191.2 ± 30.8
氦气	8.14 ± 0.49	41.45 ± 13.02	55.29 ± 41.3
空气	6.05 ± 1.05	23.28 ± 0.41	1510.4 ± 0.41
全氟丙烷	4.24 ± 0.72	49.88 ± 11.11	785 ± 31.8
氧气	7.26 ± 0.98	30.99 ± 3.90	732.4 ± 73.9
氦气	7.92 ± 0.71	26.20 ± 1.03	595.1 ± 97.2
全氟丁烷	5.88 ± 0.36	51.25 ± 3.97	580.1 ± 45.5

20 按需要，可在环境压力下、减压或加压下将气体填充到容器的液面上空间。

在本发明的容器中，气相与类脂的含水悬浮液相是基本上分离的。术语“基本上分离的”是脂在振荡前，与含水类脂相混合的气体少于约

50%。与含水类脂相混合的气体优选少于约 40%、更优选少于约 30%、还更优选少于约 20%、并最优选少于约 10%。使气相与含水类脂相基本上保持分离状态，直到使用的时候，使用时振荡容器，气相与含水类脂相混合形成气体填充的脂质体的水悬浮液。这种方式产生了用于超声或核磁共振显影的极佳的造影剂。而且，因造影剂是在使用之前刚刚制备的，减少了贮藏有效期稳定性的问题。

可以以各种方式进行振荡，所述方式包括机械和/或手动振荡，以及通过其它装置如超声（声波）进行振荡。机械和/或手动振荡是优选的。例如可通过振摇、搅拌、涡旋、振动等来进行振荡。可优选使用如图 2 所示的振荡装置。具体地讲，图 2 示出了机械振荡装置 10。用开--关按钮 11 可启动和停止振荡。振荡装置 10 还包含旋钮 12，该旋钮用于变速（RPM）的调节。向顺时针方向旋转旋钮 12，振荡速度（以 RPM 表示）增加。反之，向反时针方反旋转旋钮 12，振荡速度减小。通过将本发明的容器置于振荡装置 10 的调节架 13 之中可使容器中的内容物得到振荡。该调节架 13 起到了振荡装置 10 的振荡器的作用。为保证容器被牢固地置于调节架中以便振荡，使用了螺钉 14。

本发明的容器可以采用各种不同的方式。如果需要，它可以是如图 1 所示的容器 1，该容器 1 具有主体 2 和帽 3，该容器内装有彼此基本上分离的液面上气体 4 和类脂的水悬浮液相 5。另外，容器也可以采用预填注射器的形式，如果需要，注射器中可以填有一种或多种填料。在本发明中，注射器用含水相和预先选择的液面上气体填充。通常使注射器的长轴垂直于振摇方向将它们置于振摇装置中。振摇之后，在注射器里产生了气体填充的脂质体，备用。无论容器是如图 1 所示形式的容器、注射器还是其它类型的容器，容器及其内容物优选是灭菌的。

可用各种不同的材料如玻璃、硼硅酸盐玻璃、硅酸盐玻璃、聚乙烯、聚丙烯、聚四氟乙烯、聚丙烯酸酯类、聚苯烯或其它塑料来制造本发明的容器（包括注射器）。优选的容器（包括注射器）在填充气体前，是不透气的或是被不透气的外层屏障包裹的。当然，这是为了维持预先选择气体在容器中的整体性。具有气密性能的注射器材料的例子可包括（但无论如何不限于）玻璃硅酸酯或硼硅酸酯，适于二氧化硅融熔的注射器或钥（Luer）-锁型注射器、镶特氟隆的或特氟隆包被的柱塞。

本领域的技术人员应认识到，一旦掌握了本文公开的实质，可以向

5 本发明的类脂含水悬浮液相中加入各种添加剂以稳定该相，或在振荡时稳定气体填充的脂质体。如需要，可将这些添加剂在振荡前加入到类脂含水相中，或在振荡及制备气体填充的脂质体之后加入到组合物中。当然，这类添加剂的使用依赖于所得气体填充的脂质体的具体应用，这一点对本技术领域的技术人员而言是显然的。

10 可以获得许多可用于本发明的稳定剂，包括 xanthan 树胶、阿拉伯树胶、琼脂、琼脂糖、藻酸、藻酸盐、藻酸钠、角叉莱胶、葡聚糖、糊精、明胶、瓜尔树胶、黄耆胶、刺槐豆（胶）、黄耆糖胶、刺梧桐树胶、阿拉伯树胶、果胶、酪蛋白、膨润土、未纯化的膨润土、纯化的膨润土、膨润土糊、胶态膨润土、纤维素、微晶纤维素微、甲基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钙、羧甲基纤维素钠、羧甲基纤维素钠 12、及其它天然的或修饰的天然纤维素、吐温、carbomer 934P、硅酸镁铝、单硬脂酸铝、聚环
15 氧乙烷、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯酮、聚乙二醇、丙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、地氧化硅、胶态的二氧化硅、

20 而且，还可使用全氟辛基溴（PFOB）、全氟辛基碘、全氟三丙基胺、和全氟三丁基胺之类的化合物作为类脂相的稳定剂。具有多于 5 个碳原子的全氟化碳通常在体温下为液态，而亦优选这样的全氟化碳作为稳定剂。合适的全氟化碳包括全氟己烷、全氟庚烷、全氟辛烷、全氟癸烷和十二氟代萘。此外，也可使用全氟化的类脂或部分氟化的类脂以帮助稳定。本发明所描述的类脂的全氟化的或部分氟化的各种类似物均可使用，这一点对本领域的技术人员而言是显然的。由于烃类脂具有相对的疏水性质，这类全氟化的或部分氟化的类脂具有稳定的优点。全氟化的或部分氟化的类脂的例子是 F_6C_{11} 磷脂酰胆碱（PC）和 F_8C_5PC 。例如，
25 这些类似物在 Santaella 等的 Federation of European Biochemical Societies（FEBS）（《欧洲生化联合会》），336 卷，第 3 期，418-484 页（1993）中有描述，该文献公开的内容以其全部引入本文作参考。

30 为有助于稳定化的目的，也可使用各种生物相容性的油如花生油、Canola 油、橄榄油、红花油、玉米油、杏仁油、棉籽油、桃仁油、芝麻油、大豆油、矿物油、矿物轻油、油酸乙酯、十四烷基醇、肉豆蔻酸异丙酯、棕榈酸异丙酯、辛基十二烷基醇、丙二醇、甘油、角鲨烯或其它公
35 知可被消化的油。这些物质也可包括卵磷脂、神经鞘磷脂、胆甾醇、胆甾醇硫酸酯和甘油三酯、

稳定化作用也可通过加入各种粘度改性剂（即粘度调节剂）来实现，这些粘度改性剂起本发明的稳定剂的作用。这类化合物包括（但无论如何不限于）1)糖类及其磷酸化和磺化的衍生物；2)分子量范围在400到8000的聚醚类；3)二和三羟基链烷烃和分子量范围在800到8000之间的它们的聚合物。脂质体也可与乳化剂和/或稳定剂结合使用，所述乳化剂和/或稳定剂包括（但无论如何不限于）阿拉伯树胶、胆甾醇、二乙醇胺、单硬脂酸甘油酯、羊毛脂醇、卵磷脂、甘油-酯和甘油二酯、单乙醇胺、油酸、油醇、poloxamer、硬脂酸-50-聚氧乙烯酯、聚炔氧基-35-蓖麻油、聚炔氧基-10-油基醚、聚炔氧基-20-鲸蜡硬脂基（cetostearyl）醚、硬脂酸-40-聚炔氧基酯、吐温20、吐温40、吐温60、吐温80、丙二醇二乙酸酯、丙二醇单硬脂酸酯、月桂基硫酸钠、硬脂酸钠、脱水山梨醇单月桂酸酯、脱水山梨醇酯单油酸酯、脱水山梨醇单棕榈酸酯、脱水山梨醇单硬脂酸酯、硬脂酸、三乙醇胺、乳化腊、Pluronic F61、Pluronic F64和、Pluronic F68。

可加入的其它试剂包括滋补剂如多元醇（如甘油、丙二醇、聚乙烯醇、聚乙二醇、葡萄糖、甘露糖醇、山梨糖醇、氯化钠等）。

如需要，配方中也可包括抗菌剂和/或防腐剂。这类试剂包括苯甲酸钠、所有的季铵盐、叠氮化钠、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、山梨酸、山梨酸钾、山梨酸钠、抗坏血酸基棕榈酸酯（ascorbylpalmitate）、丁基化的羟基苯甲醚、丁化羟基甲苯、氯丁醇、脱氢乙酸、乙二胺四乙酸（EDTA）、单硫甘油、苯甲酸钾、偏亚硫酸氢钾、山梨酸钾、亚硫酸氢钠钾、二氧化硫和有机汞盐。

如果需要，可用渗透剂来控制渗透性。合适的有渗透活性的材料包括生理上相容的化合物如单糖、二糖、糖醇、氨基酸及各种合成的化合物。适当的单糖或糖醇包括，例如，赤藓糖、苏糖、核糖、阿拉伯糖、木糖、来苏糖、阿洛糖、阿卓糖、葡萄糖、甘露糖、艾杜糖、半乳糖、塔罗糖、海藻糖、核酮糖、果糖、山梨糖醇、甘露糖醇和景天庚酮糖，其中优选的单糖是果糖、甘露糖、木糖、阿拉伯糖、甘露醇和山梨糖醇。适当的二糖包括，例如，乳糖、蔗糖、麦芽糖和纤维二糖。适当的氨基酸包括，例如，甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸和组氨酸。合成的化合物包括，例如，甘油、丙二醇、聚丙二醇、乙二醇、聚乙二醇、和

聚乙烯基吡咯烷酮。对于本领域的技术人员而言，其它适当的具渗透活性的各种材料是熟知的，这些材料也涵盖在本文所用的术语“渗透活性剂”的范围之内。

5 也可各种不同的目的和用途加入如上面所讨论的那些各种聚合物。

10 本领域的技术人员应认识到，依据具体的最终用途，按需要或目的，可将大范围量的添加剂（如上面所述的悬浮剂）加入到本发明的类脂水悬浮液相中。所述的添加剂量虽然可更高或更低，但通常占所得造影剂配方的 0.01%（体积） - 95%（体积）。一般讲来，悬浮剂的量一般为至少约 0.5%（体积），优选为至少约 1%（体积）、更优选为至少约 10%（体积）。悬浮剂的存在量通常少于约 50%（体积）、优选少于约 40%（体积）、更优选少于约 30%（体积）。例如，悬浮剂的量一般
15 为 20%（体积）。而且，一般地，为达到通常优选的渗透性范围，使用的具渗透活性的材料的量为少于约 25 g/l，优选少于约 20 g/l，更优选少于约 15 g/l，还更优选少于约 10 g/l，而在某些情况不使用具渗透活性的材料。具渗透活性的材料的最优选的范围一般是约 0.002 g/l 至 10 g/l。添加剂的这些及其它合适的范围，对于掌握了本发明的本领域的技
20 术人员而言是显然的。

25 通过将所需的治疗或诊断试剂简单地加入到类脂水悬浮液相中，也可将各种不同的治疗和 / 或诊断试剂掺入到所述类脂相中。一旦本领域的技术人员掌握了公开的内容，适当的治疗和诊断试剂及其适当的量对于他们而言是显而易见的。这些试剂可被掺入到类脂膜内或膜上，或被包裹于所得脂质体中。

30 为进一步改善用于 MRI 的所得的气体填充脂质体的磁效应，例如，可加入一种或多种 MRI 造增强剂如顺磁或超顺磁造影增强剂。有用的 MRI 造影增强剂包括顺磁离子如过渡金属元素（包括铁（ Fe^{+3} ）、铜（ Cu^{+2} ）、和锰（ Mn^{+2} ））、镧系元素如钆（ Gd^{+3} ）和镝（ Dy^{+3} ）、氧化氮、氧化铁（ Fe_3O_4 ）、硫化铁和顺磁粒子如锰（ Mn^{+2} ）取代的羟基磷灰石。而且，铬（ Cr^{+3} ）、镍（ Ni^{+2} ）、钴（ Co^{+2} ）和铕（ Eu^{+2} ）是其它可以使用的顺磁离子的例子。也可使用其它造影增强剂如氧化氮
35 自由基或任何其它带有未成对自旋电子、有顺磁性的原子。虽然在脂质体制备后加入造影增强剂也是可行的，但理想的是在振荡前将之加入到

类脂水悬浮液相中，这样可使造影增强剂在振荡后掺入到所得的气体填充的脂质体的表面之中或之上。所得的气体填充的脂质体具有大大提高了的松弛性，是核磁共振显影的极为有效的造影剂。例如，当在含水类脂相中使用了磷脂酰胆碱或磷脂酰丝氨酸时，锰（ Mn^{+2} ）将掺入到类脂的头部基团上。如果需要，可用例如在 Unger 等的美国专利 No.5,312,617 中所述的脂溶性化合物螯合该金属，Unger 的专利 No. 5,312,617 以其全文公开的内容引入本文作参考。因为所述的脂溶性化合物易于掺入到脂质体膜中，它们非常有用。为使氧化铁和其它颗粒掺入到脂质体膜之中或之上的效果达到最佳，它们通常应较小，优选小于约 1 μm ，更优选小于约 200 nm，最优选小于约 100 nm。为改善掺入情况，可使用由脂肪族化合物或亲脂化合物包被的氧化铁，因为脂肪族或亲脂化合物本身易于掺入到泡沫表面的类脂层中。

在类脂的水悬浮液相中含有可引起不能自发地产生凝胶的类脂聚合物和金属产生凝胶作用或增强凝胶作用的组分，也在本发明的范围之内。可使用一胶凝剂如多价金属阳离子、糖和多元醇。用作凝胶剂的多价金属阳离子包括钙、锌、锰、铁和镁。有用的糖包括单糖如葡萄糖、半乳糖、果糖、阿拉伯糖、阿洛糖和阿卓糖；二糖如麦芽糖、蔗糖、纤维二糖和乳糖；和多糖如淀粉。糖优选简单的糖，即单糖或二糖。可用于本发明的多元醇胶凝剂包括，例如，缩水甘油、肌醇、甘露糖醇、山梨糖醇、季戊四醇、galacitol 和聚乙烯醇。用于本发明的胶凝剂最优选蔗糖和/或钙。本领域的技术人员一旦掌握了本文公开的内容，对他们而言可用于本发明各种配方的具体的胶凝剂是显而易见的。可将类脂如磷脂酸与钙盐或镁盐以及聚合物如藻酸、透明质酸或羧甲基纤维素混合，用以稳定类脂。据推测，在类脂/聚合物系统内二价阳离子在类脂和聚合物之间形成金属键，稳定气体填充的脂质体。可类似地制备含有脱乙酰几丁质(或基于几丁质的物质)、聚赖氨酸、聚乙烯亚胺和藻酸(或其衍生物)或透明质酸的混合物的悬浮液。

已经发现振荡的速率、含水类脂相中类脂的量、以及密闭容器的大小均会影响任何气体填充的脂质体的最终大小。另外，已经发现这类试剂的比例对于气体填充的脂质体的大小分布也很重要。当与振摇速率、管形瓶大小和类脂浓度一起考虑时，人们相信气体填充的脂质体介面与含水环境间的表面张力是决定气体填充的脂质体最终大小的另一个决定因素。

在装有含水相和液面上气体的无菌容器中,已经发现了怎样进行简单方便的变化以改变振摇后脂质体的大小,从而获得具有所需大小分布的脂质体产品。此外,还可进行过滤以进一步细化振摇后的造影剂的大小分布。下文回顾了怎样改变本发明的组分以调整脂质体的大小。

5

首先,已经发现含水相中不同的材料对于控制所得气体填充的脂质体的大小是重要的。表4列出了通过振摇装有含水相和液面上的氮气的无菌容器而产生的脂质体的大小。在所有的情况下,脂质体的大小均由 Particle Sizing System 770 型不可见光颗粒大小测定仪(Particle Sizing Systems, Santa Barbara, CA)测定。如数据所示,在含水相中的类脂的比率影响所得的气体填充的脂质体的大小分布。具体地讲,下表4列出了类脂组合物对脂质体平均大小的影响。

10

表 4

15

类脂组合物对脂质体平均大小的影响

类脂组合物*	脂质体平均大小
77.5 : 15 : 7.5	5.26 μm
77.5 : 20 : 2.5	7.33 μm
82 : 10 : 8	6.02 μm

*二棕榈酰磷脂酰胆碱: 二棕榈酰磷脂酸: 二棕榈酰磷脂酰乙醇胺-PEG5000 的比率, 以 mole%表示。

20

表5显示了脂质体平均大小对特定类脂组合物混合物的浓度的依赖。如表5所示,类脂总浓度的变化对于影响振摇后的脂质体大小也是重要的。在这些试验中,三种不同类脂组分的比率保持恒定,而在含水相中类脂的浓度在 $0.5\text{--}50\text{ mg ml}^{-1}$ 之间变化。所用的气体是氮气。当含水相中的类脂浓度为 1.0 mg ml^{-1} 时,用液面上的全氟丁烷产生了用于超声诊断的最佳大小的气泡。

25

表 5
类脂浓度对脂质体平均大小的影响

类脂浓度*	脂质体平均大小
1 mg ml ⁻¹	1.8 μ m
3 mg ml ⁻¹	4.0 μ m
5 mg ml ⁻¹	7.2 μ m

5 *对于所有的样品，类脂的浓度均基于 mole%，二棕榈酰磷脂酰胆碱:二棕榈酰磷脂酸、二棕榈酰乙醇胺-PEG5000 的比率为 82: 10: 8。所用的气体为氮气。

10 脂质体的大小除了依赖于稳定化介质(即类脂)的浓度外，还依赖于液面上气体的组成。例如，已经发现当使用氮气时，1.0 mg ml⁻¹ 的类脂浓度产生的气体填充的脂质体的直径大小与使用全氟丁烷时 5.0 mg m⁻¹ 的类脂浓度产生的大小大体相等。然而，已经发现较高的浓度可导致分布更偏向于形成较大的气体填充的脂质体。这种现象反映了在类脂浓度较高时，气体填充的脂质体的稳定性增加了。因此，人们相信较高的类脂浓度或者由于起到含水相中稳定剂的作用而有助于稳定性的提高，或者在气体周围产生更多的薄层，使它们更稳定，并因此使较高比例的较大的脂质体存在下来。另外还发现，也可用液面上气体体积的大小来影响气体填充的脂质体的大小。相对于含水相的体积而言，较大的液面上空间含有成比例地更多的气体，较大的液面上空间通常比较小的液面上空间产生的脂质体大。

15

20

25 振荡速度对于产生适当大小的脂质体来讲是重要的。已经发现在 100-10,000 转/分(RPMs)的振荡速度可用于制备脂质体，然而，在快速地和可重复地产生特定大小的脂质体方面仍有最佳值。本文所用的术语“一转”是指一次前后、上下、一边到另一边、环状的运动，该运动开始于和终止于(即返回到)原点。表 3 显示由 82%(摩尔)的二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、10%(摩尔)的二棕榈酰磷脂酸(DPPA)和 8%(摩尔)的二棕榈酰磷脂酰乙醇胺-PEG5000(DPPE-PEG5000)组成的含水相和含全氟丙烷的液面上气体产生的脂质体的大小。将制剂在 Wig-L-Bug[™](Crescent Dental Mfg., Lyons, Ill.)上振摇 2 分钟。用装有含水类脂相和液面上气体的 2ml 的琥珀色管形瓶(Wheaton Industries, Millville, NJ; 实际体积为 3.7 ml)，将本发明的多相容器置于 Wig-L-Bug[™] 之上，

30

以 Co-Palmer Model 08210 Pistol Grip 转速表(Code-Palmer, Nile, III.)测速度。表 6 列出了结果, 并表明了振荡速度对所得的脂质体平均大小的影响。

5

表 6

振荡速率对脂质体平均大小的影响

速度(RPM)	脂质体的平均大小
1500	3.4 μ m
2800	3.3 μ m
3300	2.9 μ m

10

确实, 已经发现存在着产生所需大小的脂质体的最佳振荡速度。在最佳速度时, 气体填充的脂质体的形成非常快, 在不到 5 分钟内、甚至在一两分钟内、更甚至在 30 秒或更少的时间内形成。注意到振摇的方法和动作对于形成适当大小的脂质体是十分重要的。具体地讲, 已经发现当振摇的往复动作以弧形进行时, 形成最佳大小的脂质体。动作的弧度优选为 2° - 20° 。动作的弧度范围更优选为 4° - 10° 。动作的弧度范围还更优选为 5° - 8° 。动作的弧度范围最优选为 6° - 7° 。在本发明的另一实施方案中, 已经发现 RPM 的值优选在约 500-约 10, 000 之间, 更优选在约 1000-约 5000 之间, 并最优选在约 2500-约 4000 之间。

15

20

本发明的另一个重要的发现是振荡液体物质时获得的液面上气体的体积的大小、形状、和数量对于形成最佳大小的气体填充的脂质体亦是至关重要的。例如, 本发明发现当使用实际体积为 3.7 ml 的管形瓶(Wheaton 300 硼硅玻璃, Wheaton Industries, Millville, NJ, 称为 2ml 大小, 直径 $\times$ 高=15mm $\times$ 32mm)时, 含气体的液面上空间的体积优选占管形瓶总体积的约 10%-约 60%。虽然根据具体的环境和应用目的, 更多或更少的气体也许更为合适, 但管形瓶内含气体的液面上空间通常占该管形瓶总体积的约 10%至约 80%。液面上空间更优选占总体积的约 30%至约 70%。含气体的液面上空间的体积通常最优选占管形瓶总体积的约 60%。

25

30

因此, 从上面对本发明的讨论中可以清楚地看出最佳大小的产生依赖于各种因素, 包括振荡的强度及动作、管形瓶的大小、形状以及实际的填充体积。

虽然可以使用各种不同的振荡装置来制备气体填充的脂质体,例如使用涂料混合器、桌面振摇器和涡旋机,但振摇的几何形状和速度对于使气体填充的脂质体的形成最佳化是重要的。 Wig-L-Bug[™]是最优选的振荡装置。

无菌容器的大小、容器的几何形状以及容器相对于振摇装置的定向,在决定气体填充的脂质体的大小方面是重要的。当无菌容器的重量超过一定值时,振摇装置(如, Wig-L-Bug[™])通常振摇得较慢。标准的 Wig-L-Bug[™]对 2 ml 管形瓶(实际体积为 3.7 ml)比 10 ml 的管形瓶振摇得快。该试验使用 10 ml 透明的管形瓶(Wheaton Industries, Millville, New Jersey)和 2 ml(实际体积为 3.7 ml)琥珀色管形瓶(Wheaton Industries, Millville, New Jersey)。再次 Code-Palmer Pistol Grip 转速计(Code-Palmer, Nile, Ill.)测振摇速率。结果列于表 7。

表 7 显示了电动振荡器的振摇速率对进行振摇所用的管形瓶大小的依赖关系。

表 7
管形瓶大小对 Wig-L-Bug[™] 振摇速率的影响

管形瓶大小	测得的速率
2 ml 管形瓶	3250
10 ml 管形瓶	2950

一般说来,以无菌容器来实践本发明,所述容器中已有含水相存在。然而对于选定的应用,可将稳定介质以干燥的或冻干的状态贮存于容器中。在此情况下,含水的溶液(如,无菌磷酸盐缓冲液)是在振摇前才加入到无菌容器中的。这样一来,在含水相中再水化的稳定介质再次在摇过程中与液面上气体相互作用,从而产生上述的气体填充的脂质体。干燥的或冻干的悬浮介质的再水化必然进一步使产物变得复杂,这一般是人们所不希望的,但对于进一步延长某些制剂的贮藏期却是有用的。例如,某些治疗剂如环磷酰胺、多肽和遗传物质(如 DNA)长期在含水环境中贮存可能会被水解。将预先冻干的样品在振摇前再水化形成含水相和液面上空间,可以制备含有化合物的气体填充的脂质体,否则这些化合物不可能会有足够长的贮藏期。

上文列出了决定气体填充的脂质体大小的各种参数。脂质体大小在使产物的功效最大和毒性最小方面是重要的。另外，脂质体应尽可能地柔韧，以使功效最大并使对组织的副作用如在肺中的滞留时间最小。本发明可产生具有极薄的柔韧膜的所需大小的脂质体。因为脂质体的膜是极薄并有柔韧性的(例如只需 1mg ml^{-1} 的类脂以稳定该膜)，已经发现可使用较大直径的气体填充的脂质体而不产生肺动脉高血压。例如，对猪给予 5 倍于诊断显影所需剂量的剂量，而没有任何肺动脉高血压的征兆。相反，很低剂量的较小直径的白蛋白包被的空气泡在这些动物中引起严重的肺动脉高血压。因为本发明的脂质体是十分柔韧和可改变形状的，它们易于在肺毛细血管内滑过。另外，用于本发明类脂(例如带有聚乙二醇的类脂)的包被技术使肺部的副作用减小并同时使产品在体内、体外的稳定性和功效提高。

由于当频率使气体填充的脂质体在 Rayleigh 散射范围时，其反向散射或超声效应与半径的 6 次方成正比，用作普通超声造影剂的气体填充的脂质体的大小应尽可能地大(在不引起栓塞效应的情况下)。对于 MRI，也优选较大的本发明的脂质体。本发明的制备和应用潜在的毒性效应较低的较大脂质体的能力，使其相对于其它产品的效能增加了。

影响超声对比的另外的参数是脂质体膜的弹性。弹性越大，对比效果越强。因为本脂质体是由超薄的类脂膜包被的，其弹性与裸气的弹性十分相近，而且反射性和对比效果是最大的。

本发明的振荡步骤易于在无菌容器内从含水相和液面上气体中产生脂质体。本发明足以产生用于超声或核磁共振显影的具有极需性质的脂质体。然而对于选定的应用，可用滤器来产生大小分布更为均匀的具有所需直径的脂质体。例如，为了使用气体填充的脂质体的谐振现象在体内测量对超声的压力，使脂质体的直径非常固定地限定在极窄的大小范围是有用的。这一点可通过将脂质体(通过振摇装有含水相和液面上气体的容器而产生)注射通过特定大小的滤器容易地完成。所得的脂质体不大于极接近于滤膜上滤孔大小的近似值。如上所述，对于许多超声或 MRI 应用，需要使气体填充的脂质体尽可能地大。然而对于某些应用，需要更小的气体填充的脂质体。例如，在靶向肿瘤或其它疾病组织时，必须使气体填充的脂质体离开血管而进入组织间隙中。更小的气体填充的脂质体可用于这些应用。可通过改变含水相中的化合物(改变组

成和浓度)及改变液面上气体(气体组成及液面上体积),或者通过使之注射通过滤器来很大程度地产生这些较小的气体填充的脂质体(例如,最好直径在 $1\ \mu\text{m}$ 以下)。将脂质体注射通过例如 $0.22\ \mu\text{m}$ 的滤器,可产生大小基本上均匀的极小的气体填充的脂质体。所得的纳米大小的气体填充的脂质体可具有用于靶向的性质。

上述类脂悬浮液的实例也可用高压灭菌器使之灭菌,而悬浮液的体积无可察觉的变化。可用高压灭菌器和/或通过无菌过滤在振荡步骤之前或之后,或通过本领域的技术人员已知的其它方式对造影剂进行灭菌。

在容器中装入了含水相和预先选择的液面上气体后,密闭的瓶子可无限期地贮存。不会有颗粒沉淀出来,不会有气体填充的脂质体爆发出来,在气体填充的脂质体、颗粒、胶体或乳剂之间也不会有非定向的相互作用。装有含水相和液面上气体的容器的贮存期依赖于含水相中所含化合物的稳定性。长的贮存期及可消毒性这些性质使本发明比现有技术有明显的优越性。本文已经述及了稳定性的问题,如超声造影剂领域中普遍存在的聚集和颗粒沉淀现象。

已经发现通过振荡本发明的多相容器产生的气体填充的脂质体,具有作为诊断显影如超声或核磁共振显影的造影剂的极好的实用性。该脂质体通常可用于患者的显影、和/或特异地诊断患者的患病组织的存在。通过对患者施用本发明的气体填充的脂质体,然后用超声或核磁共振对患者扫描以获得患者体内区域和/或该区域内的任何患病组织的可见图像,来进行显影过程。术语“患者区域”是指整个患者、或患者的特定区域或部分区域。脂质体造影剂可用于产生脉管系统、心脏、肝脏和脾的图像,以及胃肠腔区域或其它体腔的显影,或以对本领域的技术人员而言显而易见的其它方式用于,例如,组织鉴定、郁血显影等等。在本发明的实践中可以使用各种不同类型的超声或核磁共振显影装置,装置的具体类型或型号对于本发明的方法而言是不重要的。

正如本领域的技术人员可以认识到的,亦可用本发明的气体填充的脂质体向患者传递各种治疗剂以进行各种疾病或病痛的治疗。

而且,可用磁活性的脂质体通过 MRI 估测压力。脂质体使体积感受性增加,并因此使 T_2 松弛增加,但更使 T_2^* 松弛增加。因为静电场梯度效应主要由自旋回旋试验(根据 180° 射频再聚焦脉冲进行)补偿,当

静电场效应未被补偿时, 脂质体对 T_2 的效应不如对 T_2^* 加权脉冲序列的效应显著。压力的增加导致脂质体的损失或脂质体的破裂(对于更易溶的气体而言), 并导致脂质体直径的减小。因此, $1/T_2$ 随着压力的增加而减小。而压力释放后, 剩下的一些脂质体再度膨胀, $1/T_2$ 再次略微增高。随着压力的变化, 由约 80% PFP 和 20% 空气组成的脂质体的稳定性提高, $1/T_2$ 略有下降, 所述压力在压力释放后返回到基线上(也就是说, 脂质体是稳定的, 但略微显示出 $1/T_2$ 压力效应)。当得到了梯度回波图像并测定了信号强度时, 这些效应更为显著。随着压力的增加, 信号强度增加($1/T_2^*$ 随着压力的增加而减小)。因为试验进行得相对较快(进行梯度回波图像显影所花的时间比测 T_2 所花时间的十分之一还少)。暴露于压力的期间少得多, 并且在压力释放后, 氮气填充的脂质体几乎返回到基线(即, 脂质体几乎没有损失)。因此, 压力返回到环境压力时, 对梯度回波的信号强度几乎降回到基线。对于通过 MRI 进行的压力测量, 可以将脂质体设计成或者随着压力的增加而破裂, 或者是稳定的, 但随着压力的增加脂质体的直径减小。因为在 MRI 中脂质体的半径影响 $1/T_2^*$, 可用该关系通过 MRI 估测压力。

正如本领域的技术人员所能认识到的, 以各种方式如通过静脉内或动脉内注射、口服或直肠对患者进行气体填充的脂质体的给药。给药的剂量和给药的具体方式将取决于年龄、体重和具体的哺乳动物以及要被扫描或治疗的区域、所使用的具体的造影剂或治疗剂。一般, 起始剂量较低, 逐渐增加直到达到所需的对比增强或治疗效果。患者可以是任何类型的哺乳动物, 但人是最优选的。

意欲以下列实施例来描述本发明是怎样被利用的以及本发明的一些超凡的用途。这些实施例仅是示例性的, 并不应看成是对所附权利要求的限制。

实施例

实施例 1

氮气填充的脂质体的形成

在 2 只 20ml 的管形瓶中, 以含有正常(生理)盐水: 丙二醇: 甘油(8: 1: 1, 体积比)的 6 ml 稀释液制备气体填充的类脂双层。向该瓶中加入摩尔百分比为 82: 10: 8(mole%)的二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC): 二棕

桐酰磷脂酸(DPPA): 二棕榈酰磷脂酰乙醇胺-PEG5000(DPPE-PEG5000)的混合物, 使其终浓度为 5mg ml^{-1} 。然后用气密的可维持压力的隔膜帽使样品密封。然后用氮气(99.98%, Arizona Welding Co., Tucson, AZ)对它们至少清扫(Purged and evacuated)3次。接着将样品在 Barnstead C57835 型蒸气灭菌锅(Barnstead/Thermolyne Corporation, Dubuque, Iowa)中于 $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 分钟, 或者使之通过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 的 Nuclepore 滤器 (Costar, Pleasanton, CA)进行无菌过滤一到三次。然后将样品从高压锅中取出, 使之冷却至接近于环境温度。接着使样品在 Wig-L-Bug 涡旋机(Crescent Dental Mfg.Co., Lyons, IL)上涡旋 2 分钟。所得的混合物显示有明显的气体填充的双层(看起来象泡沫)形成。在 Patide Sizing Systems 770 型不可见光探测仪 (Partile Sizing Systems, Santa Barbara, CA)上、在装有校准目镜的 Reichert-Jung150 型光学显微镜 (Cambridge Instruments, Buffalo, NY)上、和在 Coulter Model(Coulter Industries, Luton Beds, England)上, 以三种方法测量气体填充的类脂双层的大小。样品的数量加权平均大小为 $5\text{--}7\text{ }\mu\text{m}$, 其中有至少 95% 的颗粒小于 $10\text{ }\mu\text{m}$ 。

实施例 2

全氟戊烷气体填充的脂质体的形成

在 2 只 20 ml 的管形瓶中, 以含有正常(生理)盐水: 丙二醇: 甘油 (8: 1: 1, 体积比)的 6 ml 的稀释液制备气体填充的类脂双层。向该瓶中加入摩尔百分比为 82: 10: 8(mole%)的二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC): 二棕榈酰磷脂酸 (DPPA): 二棕榈酰磷脂酰乙醇胺-PEG5000(DPPE-PEG5000)的混合物, 使终浓度在 1mg ml^{-1} 至 5mg ml^{-1} 之间变化。向该混合物中加入 $50\text{ }\mu\text{l}$ ($30.1\text{ }\mu\text{mole}$)的全氟戊烷(PFC, Gainesville, FL)。在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下制备样品, 并用气密的和可维持压力的隔膜帽密封样品。接着将样品在 Barnstead C57835 型蒸气灭菌锅 (Barnstead/Thermolyne Corporation, Dubuque, Iowa)中于 $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 分钟。然后从高压锅中取出样品, 并使之冷却至接近 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。接着使样品在 Wig-L-BugTM 涡旋机(Crescent Dental Mfg.Co., Lyons, IL)上涡旋 2 分钟。所得的混合物显示有明显的气体填充的双层(看起来象泡沫)形成。记录泡沫的体积和高度, 将一份样品置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻箱(Kenmore Brand, Sears-Roebuck, Chicago, IL)中。3 个小时后取出样品, 此时注意到原始体积的近 90%保留下来。将样品在冷冻箱中放置过夜(约 17 个小时), 取出, 此时发现原始体积的 50%保留了下来。余下的管形

瓶用作对照,使之保存于 30 °C 的温箱中达同样的时间。发现没有发生体积损失,这表明冷却使气体填充的双层内的气体收缩,因此气体的体积减小了。最后,将冷样品置于 30 °C 的温箱中,发现过了大约 45 分钟之后,有 20%的原始泡沫体积得以恢复。这表明压缩的气体再次挥发使气体填充的脂质体的大小膨胀这一事实。

实施例 3

全氟丙烷气体填充的脂质体的形成

除了所用的气体是全氟丙烷(99.99%, Alcon Surgical, Fort Worth, TX)和所用的管形瓶的大小为 2 ml 琥珀色管形瓶(实际体积为 3.7 ml)(Wheaton, Millville, NJ)外,采用与实施例 1 中所用的相同的步骤。管形瓶中装有 1.5 ml 的类脂/稀释剂载体混合物。用与实施例 1 中的方法相同的方法测大小,然而这次产生的大小为 4-6 μm ,而多 95% 颗粒小于 10 μm 。

实施例 4

全氟丁烷气体填充的脂质体的形成

除了所用的气体是全氟丁烷(97+%, Flura Corporation, Nashville, TN)和所用的管形瓶的大小为 2 ml 琥珀色管形瓶(实际体积为 3.7 ml)(Wheaton, Millville, NJ)外,采用与实施例 1 中所用的相同的步骤。管形瓶中装有 1.5ml 的类脂/稀释剂载体混合物。用与实施例 1 中的方法相同的方法测大小,然而这次产生的大小为 4-6 μm ,而多于 95%的颗粒小于 10 μm 。

实施例 5

全氟环丁烷气体填充的脂质体的形成

除了所用的气体是全氟环丁烷(99.8%, Pfaltz & Bauer, Waterbury, Connecticut)和所用的管形瓶的大小为 2 ml 琥珀色管形瓶(实际体积为 3.7 ml)(Wheaton, Millville, NJ)外,采用与实施例 1 中所用的相同的步骤。管形瓶中装有 1.5 ml 的类脂/稀释剂载体混合物。用与实施例 1 中的方法相同的方法测大小,然而这次产生的大小为 4-6 μm ,而多于 95%的颗粒小于 10 μm 。

实施例 6

六氟化硫气体填充的脂质体的形成

除了所用的气体是六氟化硫(99.99%, Alcon Surgical, Fort Worth, TX)和所用的管形瓶的大小为 2 ml 琥珀色管形瓶(实际体积为 3.7 ml)(Wheaton, Millville, NJ)外, 采用与实施例 1 中所用的相同的步骤。管形瓶中装有 1.5 ml 的类脂/稀释剂载体混合物。用与实施例 1 中的方法相同的方法测大小, 然而这次产生的大小为 4-6 μm , 而多于 95% 的颗粒小于 10 μm .

实施例 7

使用体外声频衰减试验全氟丁烷气体
填充的脂质体在压力下的稳定性

如实施例 4 所述, 形成全氟丁烷气体填充的类脂双层。将类脂浓度在 1mg ml^{-1} - 5mg ml^{-1} 间变化的样品分成 200 μl 的等份, 用生理盐水作稀释剂进行 10, 000: 1 的稀释。开始用磁力搅拌器混合样品, 以产生均匀性, 然后关闭。使用不锈钢盘作为极好的反射器, 将之安置于离转换器的起点约 25cm 之处。所用的转换器是 5.0MHz 宽谱带非聚焦浸没式转换器(Panametries, Waltham MA)。所有的数据均经 488.2GPIB 板(National Instruments, Austin, TX)传递, 并由 Gateway 2000 80486 处理器处理。

在对气体填充的类脂双层取样之前, 基线对照仅在生理盐水中进行测量。在对照条件建立之后, 立即将 200 μl 的等份加入到盐水溶液中, 并使数据在环境温度下(20°C)积累 90 秒。声波的衰减在 90 秒内保持恒定(参见图 4), 衰减率为 $2.0 \pm 0.5\text{dB cm}^{-1}$ 。将样品的压力升高到 120 mmHg, 得到了第二个样品, 并记录下衰减。如同在环境温度试验中一样, 衰减保持恒定, 在 90 秒的试验期间几乎没有变化, 然而衰减率约为 0.9dB cm^{-1} 。然后在 37°C 的恒温条件下对另一样品进行测定。在 90 秒的期间内, 衰减再交保持恒定, 且衰减率约为 0.9dB cm^{-1} 。终样品在 37°C 、120 mmHg 的压力下进行测量。此次衰减在 90 秒内以线性的方式从 0.9dB cm^{-1} 随时间衰减到 0.4dB cm^{-1} 。这证明了该配方较氮气填充的类脂双层的稳定性有所增高。

实施例 8

使用体外声频衰减试验氮气填充的脂质体在压力下的稳定性

除了气体填充的类脂双层含有如实施例 1 中所描述的氮气外, 进行
5 如实施例 7 同样的试验。在环境温度(20 °C)和人体温(37 °C)下稳定衰减, 衰减率很明显, 然而当稀释的内容暴露于 120 mmHg 压力时, 衰减立即下降到接近于基线对照值。这证明与全氟丁烷填充的类脂双层相比, 在压力下氮气填充的类脂双层缺乏稳定性。

10

实施例 9

类脂的浓度对全氟环丁烷气体填充的 脂质体的数量加权平均大小的影响

15

除了 3 种不同的类脂配方浓度外, 如实施例 5 所述制备全氟环丁烷
气体填充的类脂双层。配方内含有稀释剂, 所述稀释剂含有正常(生理)
盐水: 丙二醇: 甘油(8 : 1 : 1, 体积比)。向其中加入二棕榈酰磷脂
酰胆碱(DPPC): 二棕榈酰磷脂酸(DPPA): 二棕榈酰磷脂酰乙醇胺-
PEG5000(DPPE-PEG5000)为 82 : 10 : 8(mole%)摩尔比的混合物, 使
20 之终浓度在 1mg ml^{-1} - 5mg ml^{-1} 之间变化。样品在 2 ml 管形瓶(实际体积
=3.7 ml)(Wheaton Industries, Millville, NJ)内制备, 以 Particle Sizing
Systems Model 770 不可见光大小测定系统测大小。下表列出了结果。

表 9 以全氟环丁烷为例, 表明了类脂浓度对全氟化碳气体填充的类脂双层平均大小的影响。

表 9
类脂浓度对全氟环丁烷气体填充的脂质体的影响

类脂浓度	数量加权平均大小
1.0mg ml ⁻¹	3.1 μ m
3.0mg ml ⁻¹	3.8 μ m
5.0mg ml ⁻¹	4.7 μ m

5

实施例 10

使用基本上不溶的气体填充的
脂质体显示血液动力学改变的缺乏

用全氟丙烷(PFP)、全氟环丁烷(PFCB)、全氟丁烷(PFB)和六氟化硫(SHF), 以 1mg ml⁻¹ 和 3mg ml⁻¹ 类脂的总类脂浓度制备含有如实施例 3、4、5 和 6 中所述的含有类脂混合物的气体填充的类脂双层样品。用装有 5 兆赫兹转换器的 5200s 型 Acoustic Imaging 超声仪, 在重量为约 28 kg 的 Mongrel 狗中进行显影。该动物以戊巴比妥钠镇定, 用室内空气进行换气, 并监测其肺动脉血压、系统动脉血压和脉搏次数。在短轴位置对心脏进行显影, 使动物接受剂量为每千克 5 ml 的 PFP、PFCB、PFB 和 SHF 丸剂, 每种均测验 1mg ml⁻¹ 和 3mg ml⁻¹ 的类脂浓度。每次注射应间隔至少 15 分钟, 以清除任何残留的造影剂。在所有的全氟化碳填充的脂质体(PFP、PFCB 和 PFB) 中, 1mg ml⁻¹ 的类脂显示心肌灌注增加, 但 PFB 比其它的类脂的作用更强。PFP 在 3mg ml⁻¹ 时作用提高。SHF 填充的脂质体在类脂为 1mg/ml 时, 不显洋心肌灌注增强, 但当类脂为 3mg/ml 时, 却显示明显的心肌增强。

在另一只狗身上基本上重复上述试验并得到了相同的结果。

25

用全氟丙烷填充的脂质体在另一只狗身上进行了血液动力学研究。该动物按接受高至 300 微升/千克(即, 高于显影剂量的 50 倍)的多剂快速丸。尽管是多剂量, 该动物在血液动力学参数方面绝对未显示出任何变化, 表明该药物有高度的血液动力学安全性。

30

实施例 11

基于 Balb/c 小鼠的毒性试验确定治疗比

用重约 20-25 克的 Balb/c 小鼠进行毒性试验。通过快速胶丸测定包裹有全氟丙烷(PFP)、全氟环丁烷(PFCB)、全氟丁烷(PFB)、和六氟化硫(SHF)的类脂浓度为 1mg ml^{-1} 的脂质体的 LD_{50} 。PFCB、PFB 和 PFP 各样品的 LD_{50} 均大于 12ml/kg ，而对于 SHF 气体填充的类脂双层，大于 30 mgkg^{-1} ，这表明可用于超声诊断的这些产品的治疗指数分别大于 2400：和 6000：1。

实施例 12

全氟戊烷气体填充的脂质体用作超声造影剂

10

给新西兰白兔肌肉注射 1cc kg^{-1} 的 Rabbit Mix(8：5：2，体积比，甲苯噻嗪(20mg ml^{-1})：氯胺酮(10mg ml^{-1})：乙酰丙嗪(100mg ml^{-1})使之麻醉。兔子在 Acoustic Imaging Model 5200 诊断超声仪及 Acoustic Imaging Model 5200s 诊断彩色多普勒仪(Acoustic Imaging, Phoenix, AZ)上显像。用 23G 蝶形导管通过耳缘静脉对兔子进行注射。在 5-10 秒钟内对兔子给予剂量为 0.01cc kg^{-1} - 0.1cc kg^{-1} 的全氟戊烷填充的类脂双层在 20 分钟到超过 1 小时的时间范围内，用 7.5MHz 的转换器在长轴方向上显示出心脏的全部四个室和心肌的鲜艳图像。然后将转换器移到肝区，在此处观察到了肝静脉、肝门静脉以及肝窦的对比鲜明图像。然后将转换器移到肾脏，显示出髓质区和皮质区的明显差别以及肾动脉的图像。然后用彩色多普勒仪替换超声诊断转换器，观察到了动物体的所有血管化组织的持久鲜明的对比。

20

实施例 13

25

不同的全氟丙烷和空气浓度对气体填充的脂质体的数目和大小的影响

将 2 ml 管形瓶(实际体积为 3.7 ml)(Whenton Industries, Millville, NJ)内的溶于生理盐水：甘油：丙二醇为 8：1：1(重量比)的类脂溶液(每毫升 1 毫克，PPPC：DPPA：DPPE-PEG-5000 为 82：10：8mole%)的样品置于容积为 4 立方英尺的改进了的 Edwards Model SO4 冻干器上，并进行减压。对管形瓶的液面上空间充以 80%PFP 和 20%空气、60%PFP 和 40%空气、50%PFP 和 50%空气、20%PFP 和 80%空气、或 100%空气。不同样品的液面上空间内的气体百分含量用带有 Hewlett Packard ChemTM 软件的 1050L 型惠普气相色谱仪进行的气相色谱证实。检测的方式是火焰电离检测。然后用 Wig-L-BugTM 使样品以 3，

30

35

300RPM 振摇 60 秒, 如前所述用光学颗粒大小测定法测定质脂体的大小和数目。所得结果列于表 2。

5 本文所引用的每篇专利和文献公开的内容均以其全部引入本文作参考。

对于本领域的技术人员而言, 从前面的描述中, 除了本文所述和所示的那些外, 显然可对本发明进行各种改进。这些改进也将落入所附权利要求的范围之内。

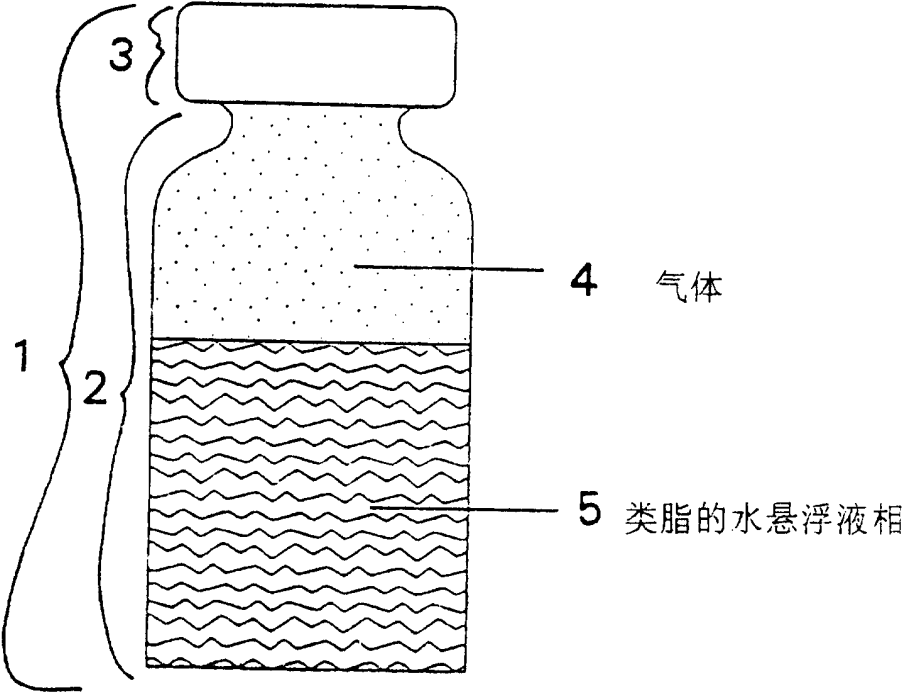


图 1

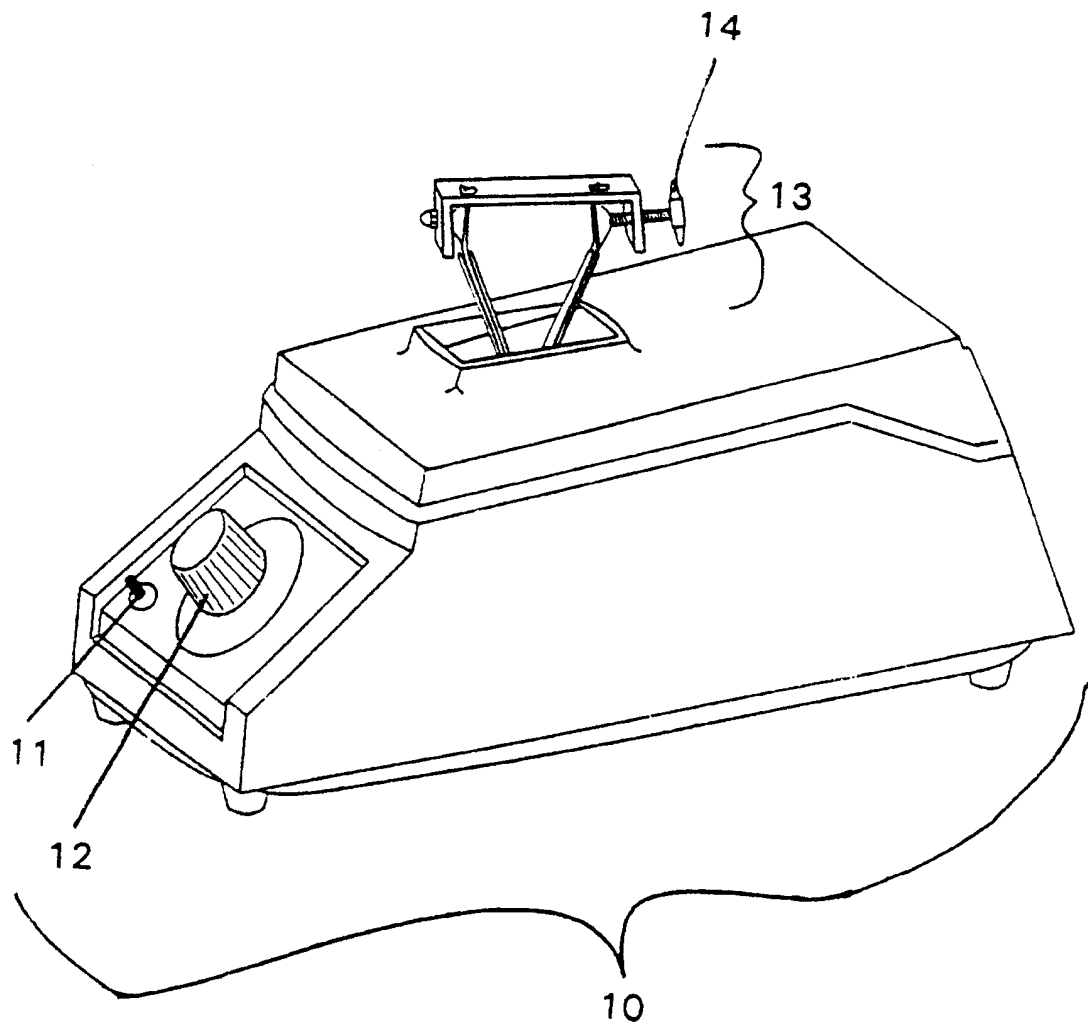


图 2

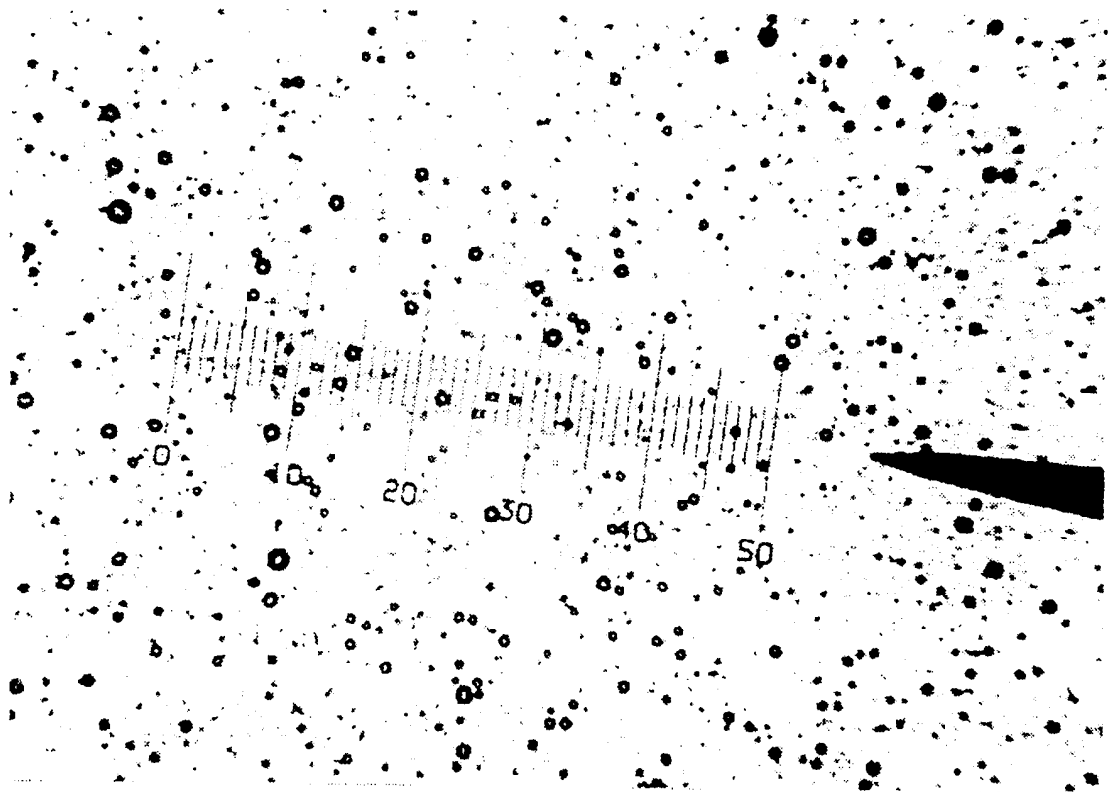


图 3