

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101123996 B

(45) 授权公告日 2014.07.16

(21) 申请号 200580020169.2

(22) 申请日 2005.01.12

(30) 优先权数据

10/830,190 2004.04.21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2006.12.18

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2005/000876 2005.01.12

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2005/107820 EN 2005.11.17

(73) 专利权人 奇迹治疗公司

地址 美国德克萨斯州

(72) 发明人 A·安纳普拉加达

R·V·贝拉姆康达 E·霍夫曼

C·维亚拉克什米

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

72001

代理人 刘冬 李炳爱

(51) Int. Cl.

A61K 51/00 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书17页 附图11页

(54) 发明名称

用于增强成像对比度的组合物和方法

(57) 摘要

本发明提供在其表面具有亲水聚合物的脂质体组合物实例，和含有相当高浓度用于计算机断层成像的对比度增强剂实例。当将这类脂质体药物组合物实例给予受试者时，如由计算机断层成像所测，在该受试者血流和其它组织中提供长时间的增强对比度。本发明也提供制造含高浓度对比度增强剂脂质体的方法实例，和使用该组合物的方法实例。

1. 一种用于制造含有对比度增强剂的脂质体组合物的方法,该方法包括以下步骤:

a) 选择对比度增强剂;

b) 浓缩对比度增强剂;

c) 在对比度增强剂存在下形成脂质体,其中所述脂质体包含胆固醇、至少一种碳链长度为14-24个碳原子的磷脂和用亲水聚合物链衍生的至少一种碳链长度为14-24个碳原子的磷脂;

d) 浓缩脂质体;

其中所制备的脂质体的平均直径低于150nm,并且其中所述脂质体包被至少一种浓度超过85mg I/mL 脂质体悬浮液的碘化的非放射性对比度增强剂。

2. 权利要求1的方法,其中所述至少一种碳链长度为14-24个碳原子的磷脂包含1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱。

3. 权利要求1的方法,其中所述用聚合物链衍生的至少一种碳链长度为14-24个碳原子的磷脂包含N-(羧基甲氧基聚乙二醇2000)-1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺。

4. 权利要求1的方法,其中所述碘化的非放射性对比度增强剂包含碘海醇或碘克沙醇。

5. 权利要求1的方法,其中所述脂质体的平均直径为100nm。

6. 一种包含脂质体的组合物,所述脂质体包含:

至少一种碳链长度为14-24个碳原子的磷脂;

用亲水聚合物衍生的至少一种碳链长度为14-24个碳原子的磷脂;和

胆固醇;

其中所述脂质体平均直径小于150纳米,且其中所述脂质体包被至少一种浓度大于85mg I/mL 脂质体悬浮液的碘化的非放射性对比度增强剂。

7. 权利要求6的组合物,其中所述至少一种碳链长度为14-24个碳原子的磷脂包含1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱。

8. 权利要求6的组合物,其中所述用聚合物衍生的至少一种碳链长度为14-24个碳原子的磷脂包含N-(羧基甲氧基聚乙二醇2000)-1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺。

9. 权利要求6的组合物,其中所述组合物进一步包含基本上不含对比度增强剂的悬浮介质。

10. 权利要求6的组合物,其中所述至少一种碳链长度为14-24个碳原子的磷脂以60到75摩尔%的量存在;所述用聚合物衍生的至少一种碳链长度为14-24个碳原子的磷脂以1到20摩尔%的量存在;和胆固醇以25到40摩尔%的量存在。

11. 权利要求6的组合物,其中所述至少一种碳链长度为14-24个碳原子的磷脂包含1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱,其以55摩尔%的量存在;所述用聚合物衍生的至少一种碳链长度为14-24个碳原子的磷脂包含N-(羧基甲氧基聚乙二醇2000)-1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺,其以5摩尔%的量存在;和胆固醇以40摩尔%的量存在。

12. 一种组合物在制备经血管内给药受试者成像的成像剂中的用途,其中所述组合物包含脂质体,所述脂质体包含:

至少一种碳链长度为14-24个碳原子的磷脂;

用亲水聚合物衍生的至少一种碳链长度为 14-24 个碳原子的磷脂；和  
胆固醇；

其中所述脂质体平均直径小于 150 纳米，且其中所述脂质体包被至少一种浓度大于 85mg I/mL 脂质体悬浮液的碘化的非放射性对比度增强剂。

13. 权利要求 7-11 中任一项的组合物在制备经血管内给药受试者成像的成像剂中的用途。

## 用于增强成像对比度的组合物和方法

[0001] 背景

[0002] 某些医学 X 射线成像技术可检测包括不同器官、组织、细胞等等在内的受试者目的区域对比度变化。为了增加目的区域的对比度，某些成像技术采用给予受试者对比度增强剂的方法。对比度增强剂可突出不同目的区域之间所存在的对比度差别，或可在若不使用对比度增强剂此种差别将不存在时产生对比度差别。

[0003] 医学 X 射线成像已有了长足进步，尤其是涉及用于检测对比度差别的仪器或机器。这些进步包括提高这类仪器的速度，提高这类仪器的分辨力等等。这些进步部分已提供给新的医学成像方法。一种示例性方法—整体成像可提供受试者整个身体脉管系统的信息。

[0004] 与用于 X 射线成像的仪器的进展相比，对比度增强剂的进展还没有开始。当前使用 X 射线的医学成像的对比度增强剂在应用（例如整体成像）上有限制，原因尤其在于其以高于所需的外渗速度快速从身体内清除、其肾毒性和其不能靶向身体的特定区域。

[0005] 附图简述

[0006] 在结合于本说明书并构成本说明书一部分的附图中，阐明了对比度增强剂制剂实施方案、含有该制剂的药物组合物、制造这类制剂的方法和在成像中使用这类制剂的方法，其与下面给出的详述共同起阐述制剂、组合物、方法等等实施方案实例的作用。应该理解附图中阐明的实施方案用于阐明的目的而不是用于限制。应该理解在不偏离本发明的精神和范围的情况下，可对附图中阐明的实施方案进行改变、修正和变化，其如下文所述。

[0007] 图 1 阐明制备含有或结合有对比度增强剂的脂质体的方法实例 100；

[0008] 图 2 阐明制备含有或结合有对比度增强剂的脂质体的另一方法实例 200；

[0009] 图 3 阐明制备含有或结合有对比度增强剂的脂质体的另一方法实例 300；

[0010] 图 4 显示当在 4°C 用 PBS 透析时碘海醇脂质体制剂的一实施方案的体外稳定性测试结果实例 400。总碘量为 30mg 碘；

[0011] 图 5 显示当在 37°C 对 PBS 透析时碘海醇脂质体制剂的一实施方案的体外血浆稳定性测试结果实例 500。总碘量为 28mg 碘；

[0012] 图 6 显示在静脉内给予（以 475mg I/kg 剂量注射入 2.2kg 兔静脉中，在 2 次增量注射中给予）碘海醇脂质体制剂一实施方案后注射后不同时间不同目的区域时间 - 衰减曲线实例 600；

[0013] 图 7 显示碘海醇脂质体一实施方案的增强前和增强后计算机断层成像 (CT) 图像实例 700：用 34.8mg/ml 碘 IV 注射 2.2kg 兔。左栏 705、715：前对比度；右栏 710、720：注射后 2 小时 18 分钟。上栏 705、710 为所摄肝脏水平图像。下栏 715、720 为所摄心脏中央水平图像；

[0014] 图 8 显示兔躯干 CT 容积重建 (volume redered) 成像图像实例 800。左栏 805：注射对比度剂前的右侧面图；右栏 810：注射 475mgI/kg 的碘海醇脂质体制剂一实施方案后 2 小时 18 分钟的右侧视图。注意在右栏 815 中观察到的增强的血管床；

[0015] 图 9 显示兔体内心脏 CT 容积重建成像图像实例 900，其在 905 之前和多次序贯注

射碘海醇脂质体一实施方案的 910、915、920、925、930 后成像。所有容积重建成像参数和展现参数在贯穿整个时间点保持不变；

[0016] 图 10 显示在兔死后（无心脏跳动）超高分辨率 CT 扫描（每 cm<sup>2</sup>4 线对）厚板成像实例 1000。第二次注射碘海醇脂质体一实施方案后 3.5 小时处死兔。将图像重建以符合 1,024×1,024 矩阵、0.5-cm 视野；

[0017] 图 11 显示在高放大倍率下兔的左侧冠状动脉图像实例 1100；

[0018] 图 12 显示通过显微 CT 获得的小鼠心脏延时冠状图像实例 1200，显示 10 毫秒间隔中的图像 1205、1210、1215、1220、1225、1230、1235、1240、1245；和

[0019] 图 13 显示通过显微 CT 获得的含有肿瘤（人鳞状细胞癌）裸鼠腹部区域图像实例 1300，包括右侧腹部图像 1305 和左侧发炎淋巴结图像 1310。

[0020] 详述

[0021] 定义

[0022] 所选择的术语或习语定义紧接着下文列出，并贯穿整个说明书。定义包括落入术语范围的和可用于实行的各种实施方案和 / 或组分形式的实例。实例的目的不是为了限制，可实行其它实施方案。所有术语的单数和复数形式二者都适合各种含义。

[0023] 本文所用术语“X 射线成像”一般指使用产 X 射线源的许多程序中的任一种。X 射线成像实例包括计算机断层成像等等。

[0024] 本文所用术语“计算机断层成像”或“CT”或“CAT”，一般指用旋转式 X 射线仪器或机器产生 X 射线辐射且当仪器旋转时引导其通过受试者区域的方法。一般检测并记录不被受试者吸收的辐射。一般而言，将数据送到计算机，基于受试者不同区域不同的 X 射线吸收，计算机创作器官和身体部分的详细的横截面图像或切片。高分辨率 CT 可称为“显微 CT(micro CT)。

[0025] 举例而言，本文所用术语“整体成像”一般指用 CT 获得受试者整个身体图像的方法。在一种类型整体成像中，可检查整个脉管系统。一般而言，检查脉管系统的成像称作“血池成像”。

[0026] 说明

[0027] 本申请阐述包括含有或结合有一种或多种对比度增强剂的脂质体的组合物实例。在一实施方案中，脂质体含有或结合有相当高浓度的对比度增强剂。在一实施例中，脂质体含有一种或多种用于 X 射线成像（例如 CT 成像）的对比度增强剂。在一实施例中，该对比度增强剂为非放射性。

[0028] 在一实施方案中，脂质体具有附着于该脂质体或结合于该脂质体合的一种或多种亲水聚合物。在一实施例中，这类亲水聚合物附着于或结合于脂质体表面。当给予受试者时，脂质体可使受试者体内的对比度增加。在一实施例中，该对比度持续增加较长时间。

[0029] 本申请还阐述含有脂质体和对比度增强剂的药物组合物实例，以及制造含有对比度增强剂的脂质体组合物的方法实例。本申请也阐述在 X 射线成像中使用该组合物的方法实例。

[0030] 对比度增强剂

[0031] 本文所用术语“对比度增强剂”一般指当辐射通过基质和与基质相互作用时影响其衰减或强度或能量损失的物质。应该了解对比度增强剂可增加或降低衰减。一般而言，

本文提到的对比度增强剂增加辐射衰减。在一实施例中，本文所述对比度增强剂为 X 射线成像用的对比度增强剂。在一实施例中，对比度增强剂用于 CT。在一实施例中，本文所用对比度增强剂为非放射性。在一实施方案中，对比度增强剂可含有碘，可被称为“碘化的”。

[0032] 对比度增强剂可用多种方法分类。举例而言，在一种分类中，碘化的对比度增强剂可为水溶性（例如单碘化吡啶衍生物、二-碘化吡啶衍生物、三-碘化苯环化合物等等）、水不溶性（例如丙碘酮等等）或油性（例如溶于罂粟籽油的碘、含碘的罂粟籽油的碘化脂肪酸乙酯等等）。

[0033] 在一实施例中，碘化的对比度增强剂分组为水溶性的。现有的碘化的对比度增强剂可为三碘化苯甲酸衍生物。这些化合物可具有一个或多个苯环。这类化合物可为离子或非离子型。合适的非离子型化合物包括但不限于甲泛葡胺、碘海醇、碘帕醇、碘喷托、碘普胺、碘佛醇、碘曲仑、碘克沙醇和其它类。

[0034] 合适的离子型化合物对比度增强剂可为弱酸 ( $pK_a$  大约 4.0 到 6.0) 或弱碱 ( $pK_a$  大约 6.5 到 8.5)。一般而言，酸能够给出或提供一个或多个质子。在其质子化形式中，这类酸一般基本上为电荷中性或不带电荷。在其非质子化形式中，这类酸一般基本上为带负电荷。合适弱酸物质可具有一个或多个羧基。羧基能够提供质子。可将羧基连接到苯环和 / 或可成为苯甲酸的一部分。这类苯甲酸实例包括但不限于醋碘苯酸盐、泛影葡胺盐、碘酰胺盐、碘格利酸盐 (ioglicate)、碘拉酸盐、碘羟拉酸盐 (ioxithalamate)、甲泛影酸盐、碘克沙酸盐和其它类。

[0035] 一般而言，碱能够接受一个或多个质子。在其质子化形式中，这类碱一般基本上带正电荷。在其非质子化形式中，这类碱一般基本上为中性或不带电荷。合适弱碱物质可具有一个或多个伯胺基。这类胺能够接受质子。弱碱物质可为酰胺 (amide)。

#### [0036] 脂质体

[0037] 本文所用术语“脂质体”一般指含内部孔穴的球形或大体球形粒子。脂质体壁通常由双层脂尤其是磷脂组成。有众多脂类和 / 或磷脂可用于制造脂质体。举例而言，常用的是具疏水性和极性头部基团部分的两性脂类，其如磷脂所例证可在水中自发形成双层囊泡，或可稳定并入脂质双层，且其疏水部分与双层膜的内部疏水区接触，其极性头部基团部分被导向该膜的内部极性表面。

[0038] 本文所用术语“磷脂”包括但不限于磷脂酸 (PA)、磷脂酰甘油 (PG)、磷脂酰胆碱 (PC)、卵磷脂 (EPC)、溶血磷脂酰胆碱 (LPC)、磷脂酰乙醇胺 (PE)、磷脂酰肌醇 (PI) 和磷脂酰丝氨酸 (PS)，以及它们中两种或多种的混合物。这类形成囊泡的脂类可为具两个烃链（通常为酰基链）和极性头部基的脂类。包括于该类中的是磷脂，例如磷脂酰胆碱 (PC)、磷脂酰乙醇胺 (PE)、磷脂酸 (PA)、磷脂酰甘油 (PG)、磷脂酰肌醇 (PI) 和鞘磷脂 (SM) 及其它。这些磷脂可完全饱和或部分饱和。他们可天然存在或人工合成。在另一实施例中，可包括于脂质体中的其它脂类为糖脂。

[0039] 本文所述脂质体实例中所用磷脂可为两个烃链长度介于约 14-24 个碳原子并具各种不饱和度的磷脂。这类磷脂的某些实例在下面给出。尽管下面所列磷脂可单用或与其它磷脂联合使用，但该列表并非全部。也可使用未列出的其它磷脂。

#### [0040] 磷脂

[0041] 1) 1-肉豆蔻酰 -2- 棕榈酰 -sn- 甘油基 -3- 磷酸胆碱

- [0042] 2) 1-肉豆蔻酰-2-硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱  
[0043] 3) 1-肉豆蔻酰-2-棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱  
[0044] 4) 1-肉豆蔻酰-2-硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱  
[0045] 5) 1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油基-3-磷酸酯(POPA)  
[0046] 6) 1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱  
[0047] 7) 1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(POPE)  
[0048] 8) 1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油基-3-[磷酸-rac-(1-甘油)](POPG)  
[0049] 9) 1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油基-3-[磷酸-L-丝氨酸](POPS)  
[0050] 10) 1-棕榈酰-2-亚油酰-sn-甘油基-3-磷酸酯  
[0051] 11) 1-棕榈酰-2-亚油酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱  
[0052] 12) 1-棕榈酰-2-亚油酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺  
[0053] 13) 1-棕榈酰-2-亚油酰-sn-甘油基-3-[磷酸-rac-(1-甘油)]  
[0054] 14) 1-棕榈酰-2-亚油酰-sn-甘油基-3-[磷酸-L-丝氨酸]  
[0055] 15) 1-棕榈酰-2-花生四烯酰-sn-甘油基-3-磷酸酯  
[0056] 16) 1-棕榈酰-2-花生四烯酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱  
[0057] 17) 1-棕榈酰-2-花生四烯酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺  
[0058] 18) 1-棕榈酰-2-花生四烯酰-sn-甘油基-3-[磷酸-rac-(1-甘油)]  
[0059] 19) 1-棕榈酰-2-花生四烯酰-sn-甘油基-3-[磷酸-L-丝氨酸]  
[0060] 20) 1-棕榈酰-2-二十二碳六烯酰-sn-甘油基-3-磷酸酯  
[0061] 21) 1-棕榈酰-2-二十二碳六烯酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱  
[0062] 22) 1-棕榈酰-2-二十二碳六烯酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺  
[0063] 23) 1-棕榈酰-2-二十二碳六烯酰-sn-甘油基-3-[磷酸-rac-(1-甘油)]  
[0064] 24) 1-棕榈酰-2-二十二碳六烯酰-sn-甘油基-3-[磷酸-L-丝氨酸]  
[0065] 25) 1-硬脂酰-2-肉豆蔻酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱  
[0066] 26) 1-硬脂酰-2-棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱  
[0067] 27) 1-硬脂酰-2-油酰-sn-甘油基-3-磷酸酯  
[0068] 28) 1-硬脂酰-2-油酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱  
[0069] 29) 1-硬脂酰-2-油酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺  
[0070] 30) 1-硬脂酰-2-油酰-sn-甘油基-3-[磷酸-rac-(1-甘油)]  
[0071] 31) 1-硬脂酰-2-油酰-sn-甘油基-3-[磷酸-L-丝氨酸]  
[0072] 32) 1-硬脂酰-2-亚油酰-sn-甘油基-3-磷酸酯  
[0073] 33) 1-硬脂酰-2-亚油酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱  
[0074] 34) 1-硬脂酰-2-亚油酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺  
[0075] 35) 1-硬脂酰-2-亚油酰-sn-甘油基-3-[磷酸-rac-(1-甘油)]  
[0076] 36) 1-硬脂酰-2-亚油酰-sn-甘油基-3-[磷酸-L-丝氨酸]  
[0077] 37) 1-硬脂酰-2-花生四烯酰-sn-甘油基-3-磷酸酯  
[0078] 38) 1-硬脂酰-2-亚油酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱  
[0079] 39) 1-硬脂酰-2-花生四烯酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺  
[0080] 40) 1-硬脂酰-2-花生四烯酰-sn-甘油基-3-[磷酸-rac-(1-甘油)]

- [0081] 41) 1-硬脂酰-2-花生四烯酰-sn-甘油基-3-[磷酸-L-丝氨酸]
- [0082] 42) 1-硬脂酰-2-二十二碳六烯酰-sn-甘油基-3-磷酸酯
- [0083] 43) 1-硬脂酰-2-二十二碳六烯酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱
- [0084] 44) 1-硬脂酰-2-二十二碳六烯酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺
- [0085] 45) 1-硬脂酰-2-二十二碳六烯酰-sn-甘油基-3-[磷酸-rac-(1-甘油)]
- [0086] 46) 1-硬脂酰-2-二十二碳六烯酰-sn-甘油基-3-[磷酸-L-丝氨酸]
- [0087] 47) 1-油酰-2-肉豆蔻酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱
- [0088] 48) 1-油酰-2-棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱
- [0089] 49) 1-油酰-2-硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱
- [0090] 50) 1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油基-3-磷酸酯(DMPA)
- [0091] 51) 1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DMPC)
- [0092] 52) 1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DMPE)
- [0093] 53) 1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油基-3-[磷酸-rac-(1-甘油)](DMPG)
- [0094] 54) 1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油基-3-[磷酸-L-丝氨酸](DMPS)
- [0095] 55) 1,2-双十五酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱
- [0096] 56) 1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸酯(DPPA)
- [0097] 57) 1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DPPC)
- [0098] 58) 1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DPPE)
- [0099] 59) 1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-[磷酸-rac-(1-甘油)](DPPG)
- [0100] 60) 1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-[磷酸-L-丝氨酸](DPPS)
- [0101] 61) 1,2-二植烷酰-sn-甘油基-3-磷酸酯
- [0102] 62) 1,2-二植烷酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱
- [0103] 63) 1,2-二植烷酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺
- [0104] 64) 1,2-二植烷酰-sn-甘油基-3-[磷酸-rac-(1-甘油)]
- [0105] 65) 1,2-二植烷酰-sn-甘油基-3-[磷酸-L-丝氨酸]
- [0106] 66) 1,2-双十七酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱
- [0107] 67) 1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸酯(DSPA)
- [0108] 68) 1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DSPC)
- [0109] 69) 1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DSPE)
- [0110] 70) 1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-[磷酸-rac-(1-甘油)](DSPG)
- [0111] 71) 1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-[磷酸-L-丝氨酸]
- [0112] 72) 1,2-二-溴代硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱
- [0113] 73) 1,2-双十九酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱
- [0114] 74) 1,2-二花生酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱
- [0115] 75) 1,2-双二十一酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱
- [0116] 76) 1,2-二山嵛酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱
- [0117] 77) 1,2-双二十三酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱
- [0118] 78) 1,2-双二十四酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱
- [0119] 79) 1,2-二顺式肉豆蔻烯酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱

- [0120] 80) 1,2- 二反式肉豆蔻异烯酰-sn- 甘油基-3- 磷酸胆碱
- [0121] 81) 1,2- 二顺式棕榈烯酰-sn- 甘油基-3- 磷酸胆碱
- [0122] 82) 1,2- 二反式棕榈异烯酰-sn- 甘油基-3- 磷酸胆碱
- [0123] 83) 1,2- 二顺式棕榈油酰-sn- 甘油基-3- 磷酸乙醇胺
- [0124] 84) 1,2- 二油酰-sn- 甘油基-3- 磷酸胆碱 (DOPC)
- [0125] 85) 1,2- 二油酰-sn- 甘油基-3- 磷酸酯 (DOPA)
- [0126] 86) 1,2- 二油酰-sn- 甘油基-3- 磷酸胆碱 (DOPC)
- [0127] 87) 1,2- 二油酰-sn- 甘油基-3- 磷酸乙醇胺 (DOPE)
- [0128] 88) 1,2- 二油酰-sn- 甘油基-3-[ 磷酸 -rac-(1- 甘油 ) ] (DOPG)
- [0129] 89) 1,2- 二油酰-sn- 甘油基-3-[ 磷酸 -L- 丝氨酸 ] (DOPS)
- [0130] 90) 1,2- 二反油酰基-sn- 甘油基-3- 磷酸胆碱
- [0131] 91) 1,2- 二反油酰基-sn- 甘油基-3- 磷酸乙醇胺
- [0132] 92) 1,2- 二反油酰基-sn- 甘油基-3-[ 磷酸 -rac-(1- 甘油 ) ]
- [0133] 93) 1,2- 二亚油酰-sn- 甘油基-3- 磷酸酯
- [0134] 94) 1,2- 二亚油酰-sn- 甘油基-3- 磷酸胆碱
- [0135] 95) 1,2- 二亚油酰-sn- 甘油基-3- 磷酸乙醇胺
- [0136] 96) 1,2- 二亚油酰-sn- 甘油基-3-[ 磷酸 -rac-(1- 甘油 ) ]
- [0137] 97) 1,2- 二亚油酰-sn- 甘油基-3-[ 磷酸 -L- 丝氨酸 ]
- [0138] 98) 1,2- 二亚油烯酰-sn- 甘油基-3- 磷酸胆碱
- [0139] 99) 1,2- 二亚油烯酰-sn- 甘油基-3- 磷酸乙醇胺
- [0140] 100) 1,2- 二亚油烯酰-sn- 甘油基-3-[ 磷酸 -rac-(1- 甘油 ) ]
- [0141] 101) 1,2- 双二十碳烯酰-sn- 甘油基-3- 磷酸胆碱
- [0142] 102) 1,2- 二花生四烯酰-sn- 甘油基-3- 磷酸酯
- [0143] 103) 1,2- 二花生四烯酰-sn- 甘油基-3- 磷酸胆碱
- [0144] 104) 1,2- 二花生四烯酰-sn- 甘油基-3- 磷酸乙醇胺
- [0145] 105) 1,2- 二花生四烯酰-sn- 甘油基-3-[ 磷酸 -rac-(1- 甘油 ) ]
- [0146] 106) 1,2- 二花生四烯酰-sn- 甘油基-3-[ 磷酸 -L- 丝氨酸 ]
- [0147] 107) 1,2- 二芥酰-sn- 甘油基-3- 磷酸胆碱
- [0148] 108) 1,2- 双二十二碳六烯酰-sn- 甘油基-3- 磷酸酯
- [0149] 109) 1,2- 双二十二碳六烯酰-sn- 甘油基-3- 磷酸胆碱
- [0150] 110) 1,2- 双二十二碳六烯酰-sn- 甘油基-3- 磷酸乙醇胺
- [0151] 111) 1,2- 二十二碳六烯酰-sn- 甘油基-3-[ 磷酸 -rac-(1- 甘油 ) ]
- [0152] 112) 1,2- 双二十二碳六烯酰-sn- 甘油基-3-[ 磷酸 -L- 丝氨酸 ] , 和
- [0153] 113) 1,2- 双二十四烯酰-sn- 甘油基-3- 磷酸胆碱
- [0154] 脂质体组合物可调配为包括脂肪醇、脂肪酸和 / 或胆固醇酯或其它药物上可接受赋形剂的量。例如，脂质体可包括能稳定主要由磷脂组成的囊泡或脂质体的脂类。例如，可使用约 25 到 40 摩尔百分比的胆固醇。
- [0155] 在一实施方案中，所用脂质体类型为“空间稳定脂质体”。空间稳定脂质体一般包括含有或包有柔性水溶性（亲水）聚合物链包被的表面。这类聚合物链可防止脂质体与

血浆组分之间的相互作用，血浆组分在通过血液细胞吸收脂质体和从血液中除去脂质体方面起重要作用。空间稳定脂质体可避免为单核巨噬细胞系统器官主要是肝脏和脾脏（网状系统或 RES）所摄取。这类空间稳定脂质体也可称作“长循环脂质体”。

[0156] 空间稳定脂质体可含有用聚合物链衍生的脂类或磷脂。可使用的脂类或磷脂一般为上述中的任何一种。一种示例性磷脂为具有活性氨基的磷脂酰乙醇胺（PE），该氨基便于偶联活化聚合物。示例性 PE 为二硬脂酰 PE (DSPE)。

[0157] 适合用于空间稳定脂质体的聚合物实例包括但不限于亲水聚合物聚乙烯吡咯烷酮、聚甲基噁唑啉、聚乙基噁唑啉、聚羟基丙基甲基丙烯酰胺、聚甲基丙烯酰胺、聚二甲基丙烯酰胺、聚乳酸、聚乙二醇酸和衍生化纤维素，例如羟甲基纤维素或羟乙基纤维素。可使用聚赖氨酸。可使用连接于合适脂类（例如 PE）的含这些聚合物的脂类 - 聚合物缀合物。可使用其它聚合物实例。

[0158] 在一实施例中，衍生脂类或磷脂中的聚合物为聚乙二醇（PEG）。PEG 可为多种分子量中的任一种。在一实施例中，PEG 链分子量介于约 1,000–10,000 道尔顿之间。一旦形成脂质体，PEG 链可提供亲水链的表面包被，足以延长缺乏此种包被情况下的脂质体血液循环时间。这类脂质体可称作“PEG 化脂质体”。PEG 化脂质体包括由 ALZA 公司提供的所谓 STEALTH® 脂质体。

[0159] PEG 化脂质体也可包括其表面具 PEG 的脂质体，其中所述 PEG 可在将该脂质体给予受试者后于某一时间从脂质体释放。在一实施方案中，可存在将 PEG 或其它亲水聚合物附着于脂质体表面和 / 或包含脂质体表面的脂类分子的一种或多种键或联接。在一实施方案中，可裂解这类键或联接以使 PEG 从脂质体分离。举例而言，PEG 可由一个或多个二硫键连接于脂类。二硫键可由游离硫醇裂解，以从脂质体释放 PEG。可使用其它类型的可裂解联接或键将聚合物连接于脂质体。可使用其它类型的作用剂或化合物裂解这类键或联接。

[0160] 在一实例中，如上文所述，所用脂质体具有约 60 和 75 摩尔 % 的一种或多种磷脂的组成，该磷脂具长约 14–24 个碳原子的碳链。这些磷脂的一部分可连接于一种或多种亲水聚合物，以使约 1–20 摩尔 % 的脂质体组合物为用聚合物链衍生的磷脂。另外，通常为了稳定脂质体的目的，所用脂质体可具有约 25–40 摩尔 % 胆固醇或脂肪醇、脂肪酸和 / 或其它胆固醇酯或其它药学上可接受赋形剂。

[0161] 在另一实施例中，脂质体可具有一个或多个可从脂质体表面接近的分子，通常称作“配体”，举例而言，其特异性结合或连接一种或多种分子或抗原。这类配体可引导或将脂质体靶向特定细胞或组织，并可结合细胞或组织上的分子或抗原或与细胞或组织结合的分子或抗原上。配体可为抗体或抗体片段。抗体可为单克隆抗体或片段。这类脂质体可称为“靶向脂质体”的类型。

[0162] 在一实施例中，靶向脂质体具有业已经过修饰用于将抗体分子偶联到脂质体外表面上的脂类或磷脂。这些修饰过的脂类可具不同类型。修饰过的脂类可含有连接于脂类的间隔链。间隔链可为亲水聚合物。亲水聚合物通常可末端功能化，用于将抗体偶联到其功能化末端。功能化末端基团可为马来酰亚胺基，用于特异性偶联于抗体巯基。其它功能化末端基团可包括用于与抗体巯基反应的乙酰溴胺和二硫基，用于与抗体氨基反应的活化酯基和醛基。酰肼基可和醛类反应，由此产生众多的生物学相关化合物。酰肼也可通过活性酯类或碳二亚胺活化的羧基来酰化。用作酰化物质的活性酰叠氮基可易于从酰肼得到，使得

可与含氨基的配体连接。

[0163] 在另一实施例中，磷脂可用生物素分子修饰。为了将抗体分子附着于生物素化脂质体表面，一旦形成脂质体，也可用生物素修饰抗体分子，然后在抗生物素蛋白存在下温育。生物素化脂类例如市售生物素化 PE。

[0164] 在另一实施例中，脂类可由用于将靶向分子与脂质体表面结合的底物修饰。通常底物（用生物素作为例示）相当小，例如小于约 5,000 道尔顿，以使其加入倒多室脂质体中，而尽可能不破坏脂质双层结构。底物可为一种能不可逆结合到靶分子上的底物，以确保在血流中经脂质体整个寿期与脂质体持续结合的靶分子。

[0165] 含有对比度增强剂的脂质体的制备

[0166] 可通过多种方法制备脂质体。方法实例包括但不限于水合干脂类、将脂类的挥发性有机溶液引入到水溶液中引起有机溶液蒸发、透析脂类和去污剂或表面活性剂的水溶液以除去该去污剂或表面活性剂，以及其他方法。

[0167] 脂质体可含有或结合有一种或多种对比度增强剂。在一实施方案中，脂质体含有对比度增强剂。在制造脂质体过程中，可在任何适当的时间加入对比度增强剂。例如，可在脂质体形成前使对比度增强剂与脂质体组分结合。可在制造脂质体时使对比度增强剂与脂质体组分结合。也可在脂质体形成后加入对比度增强剂。可存在将对比度增强剂与脂质体结合的其它方法。一般而言，亲水性对比度增强剂位于或与脂质体粒子的内部孔穴结合。亲脂性对比度增强剂一般位于或与脂质体粒子的脂质双层结合。一般而言，本文对比度增强剂位于或与脂质体内部孔穴结合。当使用碘化的对比度增强剂时，脂质体实例可含有至少 30mg 碘 / 毫升 (I/ml) 脂质体悬浮液。脂质体一实例可含有介于约 35- 约 250mg I/ml 之间的脂质体悬浮液。脂质体一实例可含有介于约 37- 约 200mg I/ml 之间的脂质体悬浮液。脂质体一实例可含有介于约 80- 约 160mg I/ml 之间的脂质体悬浮液。脂质体一实例可含有介于约 100- 约 120mg I/ml 之间的脂质体悬浮液。脂质体一实例可含有介于约 85- 约 100mg I/ml 之间的脂质体悬浮液。脂质体一实例可含有超过 100mg I/ml 的脂质体悬浮液。

[0168] 有很多方法用于将对比度增强剂装入脂质体。参考图 1-3 的流程图可较好理解方法实例。尽管出于简化说明的目的，用一系列图框来显示和阐述要阐明的方法，但应该了解这类方法并不受图框次序限制，某些图框可以不同的次序出现和 / 或与来自所显示和阐述的图框中的其他图框同时出现。此外，可能不一定需要所有阐明的图框就可实行方法实例。图框可联合起来或分开成为多种组分。另外，可采用另外的和 / 或备择的并非阐明的图框中的另外方法。尽管图例阐明各种行为连续发生，但应该了解各种行为可同时发生、基本上平行地发生和 / 或基本上在不同时间点发生。图 1-3 图的目的并非限制所阐述的实施例的实行。

[0169] 图 1 中阐明的是用于制备含有或结合有对比度增强剂的脂质体的方法实例 100。该方法可包括选择一种或多种待用对比度增强剂（图框 105）。该方法也可包括在一种或多种对比度增强剂存在下形成脂质体（图框 110）。一般而言，可使用早先阐述的制备脂质体的方法来实施如图框 110 所阐明的步骤。这些方法可包括水合干脂类、将脂类的挥发性有机溶液引入到水溶液中引起有机溶液蒸发、透析脂类和去污剂或表面活性剂的水溶液以除去该去污剂或表面活性剂，以及其他方法。

[0170] 图 2 中阐明的是制备含有或结合有对比度增强剂的脂质体的另一方法实例 200。

该方法可包括选择一种或多种待用对比度增强剂（图框 205）。该方法也可包括浓缩该一种或多种对比度增强剂（图框 210）。该方法也可包括在存在一种或多种对比度增强剂存在情况下形成脂质体（图框 215）。该方法也可包括浓缩脂质体（图框 220）。

[0171] 可使用多种方法来对一种或多种对比度增强剂实施浓缩（图框 210）。在一实施例中，可使用这类方法来浓缩一种或多种对比度增强剂市购溶液。在一实施例中，可将对比度增强剂从溶液中沉淀，将沉淀出的对比度增强剂以高于原始溶液的浓度悬浮于液体中。在另一实施例中，可通过蒸发浓缩溶液中的对比度增强剂。一蒸发实例可为旋转蒸发。可使用其他方法。在一实施例中，对比度增强剂可浓缩至少 10%。在一实施例中，对比度增强剂溶液可浓缩 100%（即 2 倍）或更多。在另一实施例中，可将固态形式对比度增强剂以相当高的浓度（例如高于市购溶液的浓度）溶于液体中。在一实施例中，可使用加热来增加对比度增强剂在溶液中的溶解性。在另一实施例中，可使用对比度增强剂在其中溶解性比另一种更好的溶剂。

[0172] 应该了解，脂质体悬浮液的粘性一般由脂质体浓度决定，而一般并非由脂质体内容物的粘性决定。举例而言，业已装入脂质体的对比度增强剂可在脂质体内形成凝胶相甚至是结晶体（例如若温度降低）。一般而言，这并不影响脂质体悬浮液，而且可促进脂质体悬浮液的稳定性（例如通过降低对比度增强剂从脂质体渗漏的可能性）。

[0173] 在制成脂质体且处于溶液中后，可通过减少溶液体积而基本上不改变溶液中脂质体的数量来浓缩脂质体溶液，以得到更浓的脂质体溶液。可用多种方法将脂质体浓缩（图框 220）。当脂质体在水溶液中时，通过除去水的浓缩可称为脱水。一脱水的方法实例可是超滤。在一超滤实例中，可将液体中的脂质体悬浮液通过滤器或膜，以减少一定量脂质体悬浮其间的液体的数量。其他方法实例可包括离子交换、用超速离心洗涤脂质体、透析等等。这些方法可产生具有浓度为约 35–250mg I/ml 脂质体悬浮液的实例。脂质体一实例可含有介于 37 与 200mg I/ml 之间的脂质体悬浮液。脂质体一实例可含有超过 100mg I/ml 的脂质体悬浮液。这些方法也可从脂质体悬浮液除去杂质。在一实施例中，杂质可包括没有被装入脂质体或未与脂质体联合的对比度增强剂。

[0174] 图 3 中阐明的是用于制备含有或结合有对比度增强剂的脂质体的另一方法实例 300。方法 300 可包括在载药剂存在下形成脂质体（图框 305）。该方法也可包括在脂质体里外之间建立离子梯度（图框 310）。该方法也可包括将一种或多种离子性碘化的苯装入脂质体（图框 315）。

[0175] 图 3 阐明的方法可为一种或一类称为主动载药或远程载药的方法。在主动载药或远程载药一实例中，在脂质体形成后或部分形成后，待由脂质体包含或位于脂质体（例如对比度增强剂）内的对比度增强剂或药剂可进入脂质体。如此形成的脂质体一般为那些制造过程已完成的脂质体。部分形成的脂质体可能尚未完成制造过程。

[0176] 在一方法实例中，可从所形成脂质体的脂质体外面和脂质体的里面或之间建立离子梯度（例如，脂质体外面的一种或多种离子浓度不同于脂质体里面的浓度）。待装载于脂质体内的对比度增强剂可从脂质体外面移到脂质体里面。这种移动可归因于对比度增强剂通过脂质体膜。一般而言，能够通过膜移动的对比度增强剂可基本上为中性电荷或无电荷。这种移动可基于浓度梯度（例如，脂质体外面的对比度增强剂浓度大于脂质体里面）。这种移动可基于离子梯度。这种移动可基于其他因素或各种因素组合。一旦进入到脂质

体里面,脂质体里面与脂质体外面相比较的离子浓度差别可阻止或妨碍对比度增强剂从脂质体移出。在一实施例中,脂质体里面与脂质体外面相比较的离子浓度差别可化学改变对比度增强剂,以阻止或妨碍其从脂质体移出。

[0177] 一离子梯度实例可为 pH 梯度。水合脂质体可具有选择的内部和外部 pH。该 pH 可基于脂质体于其中形成的环境的 pH 来选择。然后可滴定水合脂质体所处外部溶液直至得到所选择的不同于外部 pH 的 pH。也可用所选择的不同于内部 pH 的另一 pH 溶液来交换外部溶液。例如,脂质体所存在的初始外部溶液可具有 5.5 的 pH,然后用可具有 8.5 的 pH 的溶液滴定或交换。一旦对比度增强剂进入脂质体,脂质体里面的对比度增强剂可通过接受或提供一个或多个质子来发生化学改变。业已接受或提供一个或多个质子的对比度增强剂可带有电荷。带有电荷的对比度增强剂可能不能够通过脂质体膜,或其通过脂质体膜的能力受到抑制。在这些脂质体中,对比度增强剂可能不能脱离脂质体,或具有降低的脱离脂质体的能力。

[0178] 在另一主动载药或远程载药实例中,已形成或部分形成的脂质体可含有载药剂。例如,在该载药剂存在下可形成脂质体。载药剂可帮助或促进建立脂质体内部的某些条件,例如氢离子浓度。载药剂可促进对比度增强剂的化学改变,例如促进对比度增强剂接受或提供一个或多个质子。载药剂可防止或阻止进入脂质体的对比度增强剂离开脂质体。

[0179] 在一方法实例中,将弱酸性对比度增强剂 ( $pK_a$  从大约 4.0 到 6.5) 装入脂质体。这种作用剂可为弱两性。弱酸性作用剂其质子化形式可基本上不带电荷。弱酸性作用剂其非质子化形式可基本上带负电荷。一般而言,这类弱酸作用剂可具有一个或多个游离羧基。这类游离羧基可为能够提供质子的离子化形式。弱酸性对比度增强剂实例可包括醋碘苯酸盐、泛影葡胺盐、碘酰胺盐、碘格利酸盐、碘拉 酸盐、碘羟拉酸盐 (ioxithalamate)、甲泛影酸盐、碘克沙酸盐和其它类。

[0180] 在该方法一实例中,可在存在醋酸钙 (例如  $(CH_3COO)_2Ca$ ) 时形成脂质体。醋酸钙可为载药剂。醋酸钙存在于脂质体内部和外部溶液中。然后可例如通过稀释将醋酸钙从外相移到脂质体。脂质体内部的醋酸钙可分离为钙离子和醋酸根离子。醋酸根离子可与脂质体内部的水联合,产生醋酸和氢氧根离子。稀释脂质体外部溶液可引起醋酸从脂质体内部弥散到外部溶液中,将氢氧根离子留在脂质体内部。这可制造 pH 梯度,其中脂质体内部比脂质体外部碱性更高一些。将弱酸性对比度增强剂以让显著量的该弱酸性对比度增强剂质子化并且不带电荷的 pH 加入到外相中,可导致该对比度增强剂移到脂质体内部。此移动可归因于该物质的内外浓度梯度。此移动可归因于当氨移出脂质体时帮助渗透平衡的力。此移动可归因于其他或另外的力或这类力的组合。当对比度增强剂移到脂质体内部时,对比度增强剂可提供一个或多个质子,成为带负电,从而受到阻止或妨碍而不能从脂质体移出。除此之外,可存在该种方法的替代法或变种。

[0181] 在一方法实施例中,将弱碱性对比度增强剂 ( $pK_a$  从大约 6.5 到 8.8) 装入脂质体。这种作用剂可为弱两性。弱碱性作用剂一般在中性或接近中性 pH 时不带电荷。弱碱性作用剂其非质子化形式可基本上不带电荷。弱碱性物质其质子化形式可基本上带正电荷。一般而言,这类弱碱性作用剂可具有一个或多个伯胺基。这类伯胺基可为能够接受质子的离子化形式。这类弱碱性物质可为酰胺。

[0182] 在该方法一实例中,可在存在硫酸铵 ( $(NH_4)SO_4$ ) 时形成脂质体。硫酸铵可为载药

剂。硫酸铵存在于脂质体内部和外部溶液中。然后可通过例如稀释将硫酸铵从外相移到脂质体。脂质体内部的硫酸铵可分裂为铵离子 ( $\text{NH}_4^+$ ) 和硫酸根离子 ( $\text{SO}_4^-$ )。脂质体内部的铵离子分裂为氨和氢离子。稀释脂质体外部溶液可引起脂质体内部的氨 从脂质体弥散到外部溶液中, 将氢离子留在脂质体内部。这可制造 pH 梯度, 其中脂质体内部比脂质体外部酸性更高一些。将弱碱性对比度增强剂以让显著量的该弱碱性对比度增强剂非质子化并且不带电荷的 pH 加入到外相中, 可导致该对比度增强剂移到脂质体内部。此移动可归因于该作用剂的内外浓度梯度。此移动可归因于当氨移出脂质体时帮助渗透平衡的力。此移动可归因于其他或另外的力或这类力的组合。当对比度增强剂移到脂质体内部时, 该对比度增强剂可接受一个或多个质子, 成为带正电, 从而受到阻止或妨碍而不能从脂质体移出。除此之外, 可存在该种方法的替代法或变种。也可存在多种其他主动载药或远程载药方法。

[0183] 在脂质体制成后, 可使用处理脂质体的技术。例如, 在脂质体制成后, 通过标准技术制成的脂质体制剂可在大小和薄层 (即壁厚) 上有变化。诸如让脂质体遭受高剪切力、通过膜挤出脂质体或脂质体超声等技术可用于选择适当大小的脂质体, 或修改脂质体以便其具有适当的大小。在通过这些方法处理脂质体后, 可测量脂质体的大小分布, 以确保获得适当大小的脂质体。可使用诸如 Fraunhofer 衍射和动态光散射 (DLS) 等技术测量脂质体大小分布。在 Fraunhofer 衍射情况下, 这些技术通常测量等同物的球形直径, 其为具与所测量脂质体相同的光散射特性的球体直径。在 DLS 情况下, 等同物球形直径可为具与所测量脂质体扩散系数相同的球体的直径。一般而言, 脂质体实例具有 150nm 或以下的平均直径。脂质体制剂实例可具有大约 120nm 或以下的平均直径。脂质体制剂实例可具有大约 100nm 或以下的平均直径。应该了解可使用其它大小。

[0184] 在一实施方案中, 每毫升脂质体携带 30mg 以上碘海醇的纳米脂质体制剂可用被动载药来调配。在该制剂中, 双层脂类组合物如下所述已调整为可使该对比度增强剂量装入胶囊。在一实施例中, 使用 C16 链长的纯 DPPC (1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷脂酰胆碱) 及约 40 摩尔% 胆固醇和 5 摩尔% mPEG-DSPE (N-(羧基甲氧基聚乙二醇 2000)-1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺) (可提供长循环特性的聚乙二醇-脂类缀合物), 相比于可能使用的氢化大豆 PC (HSPC) (C16 和 C18 脂类混合物) 或 C18 链长的纯 DSPC (1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱), 装入胶囊的脂质体内部活性分子可增加 20%。使用 55 摩尔% DPPC、40 摩尔% 胆固醇和 5 摩尔% mPEG-DSPE 制剂和 350mg I/ml 的碘海醇溶液, 已达到 30mg I/ml 以上的总浓度, 且如 DLS 所测定, 平均脂质体直径为  $100.6 \pm 3\text{nm}$ 。

[0185] 在另一实施方案中, 用被动载药调配每毫升脂质体携带超过 80mg 碘海醇的脂质体制剂。在该制剂中, 350mg I/ml 碘海醇溶液浓缩为至少 400-450mg I/ml, 用于制备前段所述脂质体。在得到脂质体后, 浓缩脂质体悬浮液。使用该制剂得到浓度超过 85mg I/ml 的脂质体悬浮液。

#### [0186] 药物组合物和给予受试者

[0187] 含有或与一种或多种对比度增强剂联合的脂质体可为适于给予受试者的药物组合物的一部分。一般用将组合物递送到目的区域的途径给予组合物。在一实施例中, 将对比度增强剂组合物肠胃外给予受试者, 例如通过静脉内、动脉内、皮下或其它注射途径。

[0188] 特定药物组合物处方一般将视将组合物给予患者的方法而定。应该了解药物组合物可包括盐、缓冲剂、防腐剂、其它载体和任选地其它作用剂。适于肠胃外给予的组合物可

包含无菌、无热原、水性或油质制剂，其一般与受试者血液等渗。这种水性制剂可按照已知方法用合适分散剂或湿润剂和助悬剂调配。无菌可注射制剂也可为无毒肠胃外可接受稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或悬浮液。在可能采用的可接受载体和溶剂中有水、Ringer 氏溶液和等渗氯化钠或其它盐、右旋糖、磷酸盐缓冲液等等或其组合。

[0189] 所用药物组合物也可含有稳定剂、防腐剂、缓冲剂、抗氧化剂或其它添加剂。另外，可采用无菌不挥发性油作为溶剂或悬浮基 质。另外，诸如油酸等脂肪酸可在可注射制剂中使用。可于 Remington' s Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa 中发现适于给予的载体制剂。药物组合物可方便地以单位剂量形式存在。

[0190] 肠胃外给予包括使用注射器、导管或相似装置，其可将药物组合物递送到位点。递送可导致（至少在初期）药物组合物通过受试者循环系统系统分布。

[0191] 一般而言，可将药物组合物在受试者实施成像前某一时间点给予受试者。优选给予药物组合物的量引起受试者一种或多种组织对比度增加。根本上一般由主治医生或技师决定给予受试者的药物组合物的量。一般而言，对比度增加可为超过药物组合物中不使用对比度增强剂所存在的水平以上的任何水平。对于一种或多种器官系统包括脉管系统，可获得对比度增加实例为至少 50HU，至少 100HU 或更多。

[0192] 应用

[0193] 当将含有对比度增强剂或其药物组合物的脂质体组合物给予受试者时，可在受试者血液和 / 或器官中保持对比度增强剂水平，引起对比度增加和可由 X 射线成像技术检测。可长时间检测对比度增加。根据特定应用，本文所述组合物可具从几分钟到几小时甚至到数天的循环半衰期。在一实施例中，可获得从 8 到 24 小时的循环半衰期。在一实施例中，给予组合物提供在给予后保持至少 30 分钟可检测的增加对比度。在另一实施例中，给予组合物提供在给予后保持至少 5 分钟可检测的增加对比度。包括那些解剖、功能和分子成像在内的许多应用是可能的。举例而言，本文所述组合物的用途可在心脏病学、肿瘤学、神经病学和其它领域中得到应用。

[0194] 在一实施方案中，血池成像可用于检测和（在某些情况下）定量缺血。例如，因为注射药物组合物一般改变整个脉管系统对比度，所以当在缺血中存在降低的血液流动时可检测到。可检测多种缺血类型，包括引起缺血性肠病、肺栓塞和产生心肌症的缺血类型和其它缺血。在其它应用中，也可检测动脉瘤。

[0195] 在一实施方案中，本文所述组合物可用于心肌成像以检测、检查和 / 或评估狭窄和狭窄治疗或纠正，例如如在血管成形术中所出现的。这类技术应用可通过使用对比度增强剂制剂（例如本文所述的那些）来加强。

[0196] 在一实施方案中，本文所述组合物可用于检测心肌微循环不足。已知在心外膜动脉显示阻塞症侯之前心肌微循环显示阻塞症侯。因此，与常规方法相比，心肌微循环阻塞检测可为症状前动脉硬化症危险患者的更早期检测物。本文所述组合物可促进心肌微循环阻塞的检测。

[0197] 在另一实施方案中，本文所述组合物可用于检测和鉴定大范围的肿瘤和癌症。这些应用可通过在循环中长时间存在空间稳定脂质体并在脉管系统“渗漏”区（例如肿瘤）溢出空间稳定脂质体的特性来促进。肿瘤中脉管系统渗漏可归因于高比例的新脉管系统，是随肿瘤大小生长血管持续生成的结果。在遇到此类渗漏脉管系统时，脂质体可通过流体静

力学压力离开循环,被驱于渗出液流中。这类脂质体一般在溢出后不回到循环中,因为压力梯度反对此回归。此方法可用于检测原发性和转移性两种肿瘤。

[0198] 在其它实施方案中,组合物可用于肿瘤“分期”或分类。这类应用尤其可视给定肿瘤或癌症在不同进展阶段的脉管系统“渗漏”差别而定。

[0199] 在一实施方案中,组合物可用于监测和鉴别毁坏的脊椎索的伤害和康复领域。在典型的脊椎索伤害中,例如如汽车事故所发生的伤害,在脊椎索周围组织也可有损伤。据认为周围组织康复过程对脊椎索康复可能有害。据认为在周围组织中新脉管系统的形成(如周围组织康复过程中出现的)可抑制脊椎索康复。据认为通过抑制周围组织康复和周围组织中新脉管系统的形成,脊椎索可康复。随后周围组织可康复。本文所述对比度增强剂组合物可用于监测康复和监测脊椎索周围组织康复抑制。

[0200] 本文所述组合物有多种其它应用。例如,组合物可用于检测和监测炎症、再灌注损伤等等。

[0201] 另外,例如通过将抗体连接于脂质体表面,可将包含对比度增强剂组合物的脂质体靶向受试者体内适当的细胞和组织。对于身体靶向区域这类靶向可导致增加对比度。

[0202] 对比度增强剂组合物可具相当长体内驻留时间,除了在那些如上所述渗漏的脉管系统区域外低渗出,对于肾脏相当无毒性,可用于靶向体内特定区域。另外,因为高渗透相位于脂质体内部,一般不与血液接触,所以与离子对比度增强基质联合产生的与毒性有关的传统渗透压问题,一般不是脂质体形成胶囊的问题。

[0203] 实施例

[0204] 实施例 1. 含碘海醇 PEG 化脂质体的制备

[0205] 碘海醇脂质体制剂实例可如下产生。简言之,将 55 : 40 : 5 摩尔比的 1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸-胆碱(DPPC)、胆固醇(cho1)和 N-(羧基-甲氧基聚乙二醇 2000)-1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DSPE-MPEG2000)脂类混合物(200mM)在 65°C 溶于乙醇中。然后将乙醇溶液与碘海醇(350mg I/ml)水合 1.5-2 小时。在 10ml LipexThermoline 挤压机(Northern Lipida, Vancouver, British Columbia, Canada)上 5 次通过 0.2 微米核孔膜(Waterman 公司, Newton Mass.)和 7 次通过 0.1 微米核孔膜(Waterman 公司, Newton Mass.)挤压出脂质体。然后在 300,000 分子量界值(MWCO)透析袋中对磷酸盐缓冲液(PBS)过夜透析脂质体以除去游离碘海醇。

[0206] 通过动态光散射(DLS),用改进的 BI-90 角度计、JDS 单相 532nm 激光、Hamamatsu 光电倍增器和 Brookhaven DLS 软件 3.16 版可测定得到的碘海醇脂质体制剂实例大小。碘海醇脂质体胶囊的平均直径为 100.6nm(STD = 3.0nm),其如 DLS 所测定为纳米范围。

[0207] 用紫外-可见光分光光度计通过测量 245nm 吸收可测定碘海醇脂质体制剂实例碘海醇浓度。然后可计算当量碘浓度。在制剂实例中,不同脂类水合时间(1.5 小时和 2 小时)导致不同碘海醇装载浓度(分别为 30 和 34.8mg I/ml)。30mg I/ml 碘海醇脂质体制剂用于下述体外稳定性测定,而 34.8mg I/ml 碘海醇脂质体制剂用于下述体内 CT 成像实验。

[0208] 举例而言,可通过 Vapro® 蒸汽压渗透仪(Wescor 公司)测量碘海醇脂质体制剂的渗透压。碘海醇制剂渗透压实例范围在 305 到 315mmol/kg 之间。

[0209] 实施例 2. 含碘海醇 PEG 化脂质体的体外稳定性

[0210] 通过在 4°C 的 PBS 中和在 37°C 的血浆中两种情况下测量从碘海醇脂质体制剂渗漏

的碘海醇，可测定碘海醇脂质体制剂实例的体外稳定性。在该方法中，将 1ml 碘海醇脂质体制剂实例置于 300,000MWCO 透析袋中，在 4°C 对 250ml PBS 透析。在各时间点（0、1、2、3、8、24 小时和 3、4、5、6、8、10、18 天）取 1ml 透析液用于基于紫外吸收的碘海醇测量。在各时间点至少可得到 3 个数据点。测量后将样品放回到 PBS 以保持恒定体积。

[0211] 为测量血浆稳定性，可将碘海醇脂质体制剂实例在 25°C 对 250ml PBS 透析 1 小时以除去游离碘海醇。在这些实验中，将 1ml 碘海醇脂质体制剂置于 300,000MWCO 且含 4ml 人类血浆的透析袋中，在 37°C 对 250ml PBS 透析（选择 1 : 4 比率）。分别在 0、1、2、3、4、5、6 和 8 小时取走 1 毫升外相，用紫外可见光吸收分析。因为血浆组分也从透析袋渗漏且在 245nm 处具有有限吸收，也实施 PBS- 血浆混合物对 PBS 透析的对照实验。从碘海醇脂质体制剂实验中减去该外相吸收，得到的吸收余值可代表从碘海醇脂质体制剂渗漏的碘海醇。结果显示碘海醇脂质体制剂在 PBS 和人类血浆中很稳定。

[0212] 碘海醇 400 渗漏曲线实例示于图 4 中。将碘海醇脂质体制剂实例（30mg I/ml）在 4°C 对 250ml PBS 透析。在 0、1、2、3、8、24 小时和 3、4、5、6、8、10 和 18 天时间点实例 405，测定透析液的碘海醇量。通过绘制经由各时间点数据的线得到渗漏曲线实例 410。数据显示 1 小时透析后曲线稳定下来。通过在 4°C 平衡透析，经 8 小时碘海醇脂质体制剂展示了占总装入胶囊碘海醇 7.4% 的渗漏，经 18 天渗漏 7.8%。因此碘海醇脂质体制剂的寿命可长于 18 天。

[0213] 碘海醇 - 血浆混合物实例的渗漏曲线 500 示于图 5 中。将先前已对 PBS 透析 1 小时的碘海醇脂质体制剂用于该研究以测定血浆对从脂质体渗漏碘海醇的贡献。在 0、1、2、3、8、24 小时和 3、4、5、6、8、10 和 18 天时间点实例 505，测定透析液碘海醇的量。通过绘制经由各时间点数据的线得到渗漏曲线实例 510。数据显示 3 小时透析后曲线稳定下来，经 8 小时碘海醇脂质体制剂展示了占总装入胶囊碘海醇 2.3% 的渗漏，超过贮存于 PBS 期间所观察到的渗漏。这些结果共同指出当贮存 18 天然后注射时，碘海醇脂质体制剂可为装入胶囊的约 90%。

#### [0214] 实施例 3. 用含碘海醇 PEG 化脂质体制剂兔中成像的体内研究

[0215] 用 35mg/kg 氯胺酮和 5mg/kg 甲苯噻嗪肌肉内给药，接着通过面罩（face cone）给予 2% 异氟烷气体，来麻醉重 2.2kg 的雌兔。在气管插管和耳静脉放置静脉导管后，静脉给予 20mg 戊巴比妥。用压力控制通风设备给动物肺部通风，通风机设置为峰值通气压力 15cm H<sub>2</sub>O，和每分钟换气 25 次。在转移到 CT 扫描仪后，给予动物 0.25mg 双哌他酮（肌肉松弛剂）以确保获得图像期间活动最少。每 30–60 分钟补充给予戊巴比妥，每剂量 10–20mg。用 4 层切片 Phillips MX8000MDCT 扫描仪在螺旋扫描模式（100mAs, 120keV）且单一切片等量螺距 1.25、切片准直和厚度为 1.3mm 得到最初的体胸腔和腹部图像。用标准重建核（“B”核）重建图像，矩阵 512×512。用 0.5 秒的机架转速。在每一成像方案期间，通气压力固定在 20cm H<sub>2</sub>O（例如接近总肺容量），在呼出端用水下喷水管使兔保持呼吸暂停。接下来手动注射 15ml 的 34mg I/ml 碘海醇脂质体制剂，然后重复容积成像，然后第二次注射 15ml 碘海醇脂质体制剂悬浮液，接着进行第三次容积成像。2 次注射中所给总剂量为每公斤 475mg 碘。然后在第二次注射对比度剂后大约 12、60、90、120、150 和 180 分钟开始重复容积成像。获得最后图像后（约注射对比度剂 3.5 小时后），用过量戊巴比妥对动物实施安乐死，用无运动的人造物品获得最后的高分辨率图像（用同样的通气压力和获得图像设置）。最后，用超敏重建核（“D”核和 1024×1024 图像矩阵）获得超高分辨率扫描图以评估不存在心源

性动作时的解剖细节。

[0216] 实施例 4. 图像重建

[0217] 随后脱机对如实施例 3 所述获得的每一扫描图用对心脏三维图像最小视野 ( $5\text{cm} \times 5\text{cm}$ ,  $0.1\text{mm}$  体素尺寸) 重建实施例。通过选择在 Philips MXV 工作站软件 (4.1 版) 上已有的容积成像软件的合适设置, 可显现清晰的 (enhanced) 心室。一旦确定了设置, 在所有时间点用同样的重建和显示设置。在不同时间点分切另外结构。

[0218] 通过在主动脉、心脏、肾脏 (髓质和皮质)、肝脏、肌肉和脾脏中定位目的区域 (ROI) 来实施定量分析。在各时间点测定平均 Hounsfield 单位 (HU) 以使在每一种这些结构中能跟踪对比度浓度随时间衰减。已调整了不同时间点兔的解剖构造中 ROI 切片和切片定位的微小变化。

[0219] 实施例 5. 含碘海醇 PEG 化脂质体体内时间 - 衰减

[0220] 在主动脉、肾脏 (髓质和皮质)、肝脏实质、背肌、左侧主冠状动脉、肺动脉和在主干支气管 (作为对照值) 的目的区域, 实施实施例 4 所述图像分析实例, 并在图表中对时间作图 600 (图 6)。在实施例 3 所述时间点测定平均衰减 (Hounsfield 单位), 以定量这些位点中的每一处对比度随时间的衰减。数据显示各目的区域随时间对比度的增强和保持。在对比度剂注射衰减 3.5 小时后主动脉 605、肺动脉 615 和肝脏皮质的平均衰减为 200HU (提高 130HU), 在肾脏皮质 625 中衰减为 75HU (提高 25HU)。血池中注射后衰减迅速上升, 事实上在研究的 3.5 小时保持恒定。肝脏实质 620 中观察到衰减稍有增加。在肾脏髓质 630 中观察到短暂增加, 表明在研究早期清除很少到后来不清除。位于左侧主冠状动脉的小部分目的区域显示 9HU 的基线水平衰减和高峰期 118HU 的值。图 7 显示肝脏水平 0 小时基线 705 和脂质体注射后 2 小时 18 分钟获得的增强峰 710 的图像。图 7 也显示心脏中央水平 0 小时基线 715 和脂质体注射后 2 小时 18 分钟获得的增强峰 720 的图像。

[0221] 这些数据表明提供对比度增加的实施例 PEG 化脂质体制剂实例驻留时间不止 3 小时。另外, 这类数据显示肌肉中对比度增加可很低, 表明碘海醇脂质体可保留在血管中, 不会迅速溢出。另外, 肝脏实质中对比度增强表明该组合物的清除可能基本上是由于肝脏而不是肾脏。

[0222] 实施例 6. 给予含碘海醇 PEG 化脂质体后内心脏图像

[0223] 另外, 分析了兔心脏图像实例 800 (图 8)、900 (图 9)、1000 (图 10) 和 11000 (图 11)。图 8 显示在 805 之前和注射碘海醇脂质体制剂 8102 小时 18 分钟后整个兔子的容积重建图像 800。可观察到由于脂质体而增强了脉管系统 815。结果显示即使在注射后 2 小时以上, 仍可见到血管 815, 而使用同样的显示和重建参数, 在给予脂质体之前观察不到他们。这种增强可持续直至在第二剂量脂质体注射后 3 小时以上对动物实施安乐死时。

[0224] 图 9 显示兔心脏体溶剂成像 900, 在对比度剂 905 之前和注射碘海醇脂质体制剂 20 分钟 910、1 小时 15 分钟 915、1 小时 51 分钟 920、2 小时 38 分钟 925 和 3 小时 23 分钟 930 后获得。所有显示和容积成像参数在所有图像中是同样的。可清楚地看到所有四个心室连同大血管的解剖。注意左上栏 905 可能没有血池, 且血池增强的不透明性一直持续到代表注射后 3 小时 23 分钟的最后的图 930。可见结构包括: 右心室 935 (RV); 左心室 940 (LV); 主动脉 945 (Ao); 肺动脉 950 (PA); 和下腔静脉 855 (IVC)。这些图像证明即使在给予碘海醇脂质体 3 小时后仍有持续不变的对比度。

[0225] 图 10 显示在对兔实施安乐死由此消除心脏跳动后以超高分辨率获得的心脏厚板成像图 1000。标记结构包括右心室 1005 (RV) ; 左心室 1010 (LV) ; 和主动脉 1015 (Ao)。

[0226] 图 11 显示第二次注射碘海醇脂质体制剂后 3 小时在高倍放大条件下兔左侧冠状动脉的图像。左图 1105 显示在第二次注射碘海醇脂质体一实施方案后 3 小时 18 分钟时成像的兔体内心脏 1.3mm 厚的 CT 切片。右图 1110 显示同样数据设置的容积成像图像。左侧冠状动脉 (在 1110 中表示为 1115) 增强了 109HU。

[0227] 实施例 7. 含碘海醇或碘克沙醇 PEG 化脂质体的制备

[0228] 脂质体制剂实例如下制备。通过旋转蒸发浓缩大约 350mg I/ml 碘海醇或碘克沙醇溶液到浓度大约 400–450mg I/ml。然后用碘海醇或碘克沙醇溶液制备实施例 1 所述脂质体。然后通过一系列核孔径迹蚀刻膜将得到的脂质体悬浮液挤出, 得到 100nm 大小的均一脂质体, 如实施例 1 所述。然后洗涤脂质体悬浮液, 通过用界值 100,000 道尔顿的 Microkros 膜超滤将脂质体浓缩大约 2.5 倍。得到碘浓度介于 85 与 100mg I/ml 之间的脂质体悬浮液。

[0229] 实施例 8. 给予小鼠含碘海醇 PEG 化脂质体后心脏和肿瘤体内图像

[0230] 用特别构造的显微 CT 系统对小鼠成像。动物在该系统中垂直置于旋转架上, 使用固定 X- 射线源和探测器。在该系统中, 有高通量的旋转阳极 X- 射线管 (Philips SR0 09 50), 其具有 0.3/1.0mm 双焦点。该系统的流量足以支持短至 10 毫秒的曝光量以限定心脏动作引起的图像模糊。使用具 50×50 微米像素的高分辨率探测器 (Microphotonics X-ray Image Star camera, Photonics Science, EastSussex, UK), 图像矩阵为 2048×2048, 经过 106×106mm 的主动输入区域。使用将像素与 2×2 阵列联合的硬件特点, 2×2 阵列将检测器的有效螺距减少到 100 微米。

[0231] 用下列 X- 射线参数实施成像 : 通常为 80kVp, 170mA, 10 毫秒。用总共 260 个投影经具有 0.50 距角的 1900 圆型轨道 (即 1800+ 扇角) 获得投影。每一投影系列采用大约 8–10 分钟来获得。将动物置于 X 射线源到目标物距离 sod = 400mm、目标物到探测器距离 odd = 40mm 以及 X 射线源到探测器距离 sdd = 440mm 进行扫描, 在探测器上产生与 Nyquist 样本相匹配的焦点的几何模糊。这导致每一图像系列的标准曝光量为 17.64R。

[0232] 这些投影图像用于通过 Feldkamp 运算法则用 Parker 加权来重建 X 射线断层图像。为此目的使用 Cobra EXXIM 软件包 (EXXIMComputing 公司, Livermore, CA)。因为用于几何学的放大倍数为 1.1, 所以在 90 微米的图像平面中用有效数字取样将数据重建为 1024×1024×1024 的等方阵列。

[0233] 在 ECG 周期的不同点用通气同步 (在呼出端) 和心跳同步获得所有数据集。在成像研究期间温度 (36.5±1°C) 和心率 (RR = 90–100ms) 二者都相当稳定。

[0234] 为实施这类研究, 将 1.5 毫升实施例 7 所述脂质体悬浮液注射入小鼠尾静脉。如上所述实施成像和图像重建。数据指出血液中的稳定不透明性为 700HU。该稳定的不透明性有助于 (例如) 心脏和呼吸同步成像, 使得可以延时成像。在 10 毫秒间隔中所摄的小鼠心脏延时冠状图实例 1200 阐明于图 12 中。可见增强的心室。

[0235] 在另一研究中, 将实施例 7 所述脂质体悬浮液注射入已植入人鳞状细胞癌 (FaDu) 的裸鼠的右侧腹部。图 13 阐明在注射脂质体悬浮液后 4 小时小鼠腹部区域显微 CT 冠状图像 1300。在阐明的图像中可见肿瘤 1305, 在肿瘤中可见血管以及血管周围组织中的

逐渐变化的不透明性。也可见肿瘤血液溢出（血液从血管渗漏到组织）。尸检后的组织检查确证肿瘤中血管的位置和肿瘤脉管部分（在中间）。在小鼠的左侧也可见发炎的淋巴结（转移性）1310。

[0236] 以上说明书已经论述了优选实施方案和所选备择实施方案。通过阅读和理解前面详细描述，对本发明实施方案的修改和变化对于本领域技术人员而言是显而易见的。本文所述实施方案应解释为包括所有这类在所附权利要求或其等同范围内的改变和修正。

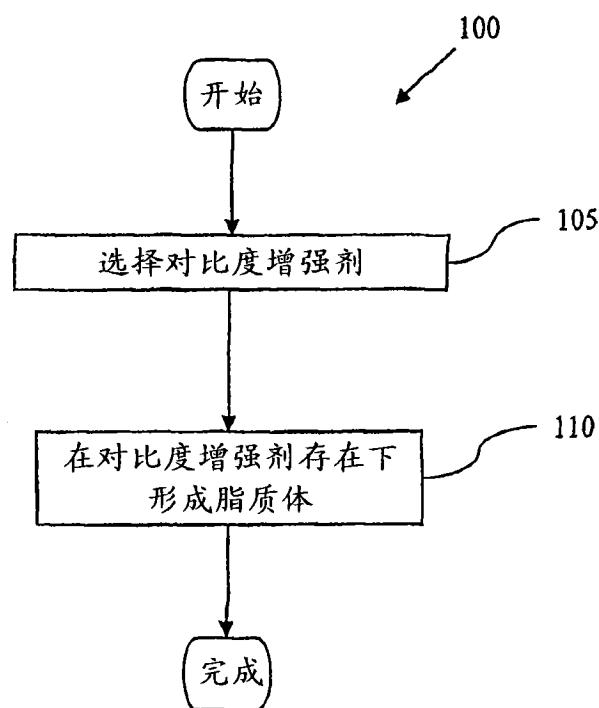


图 1

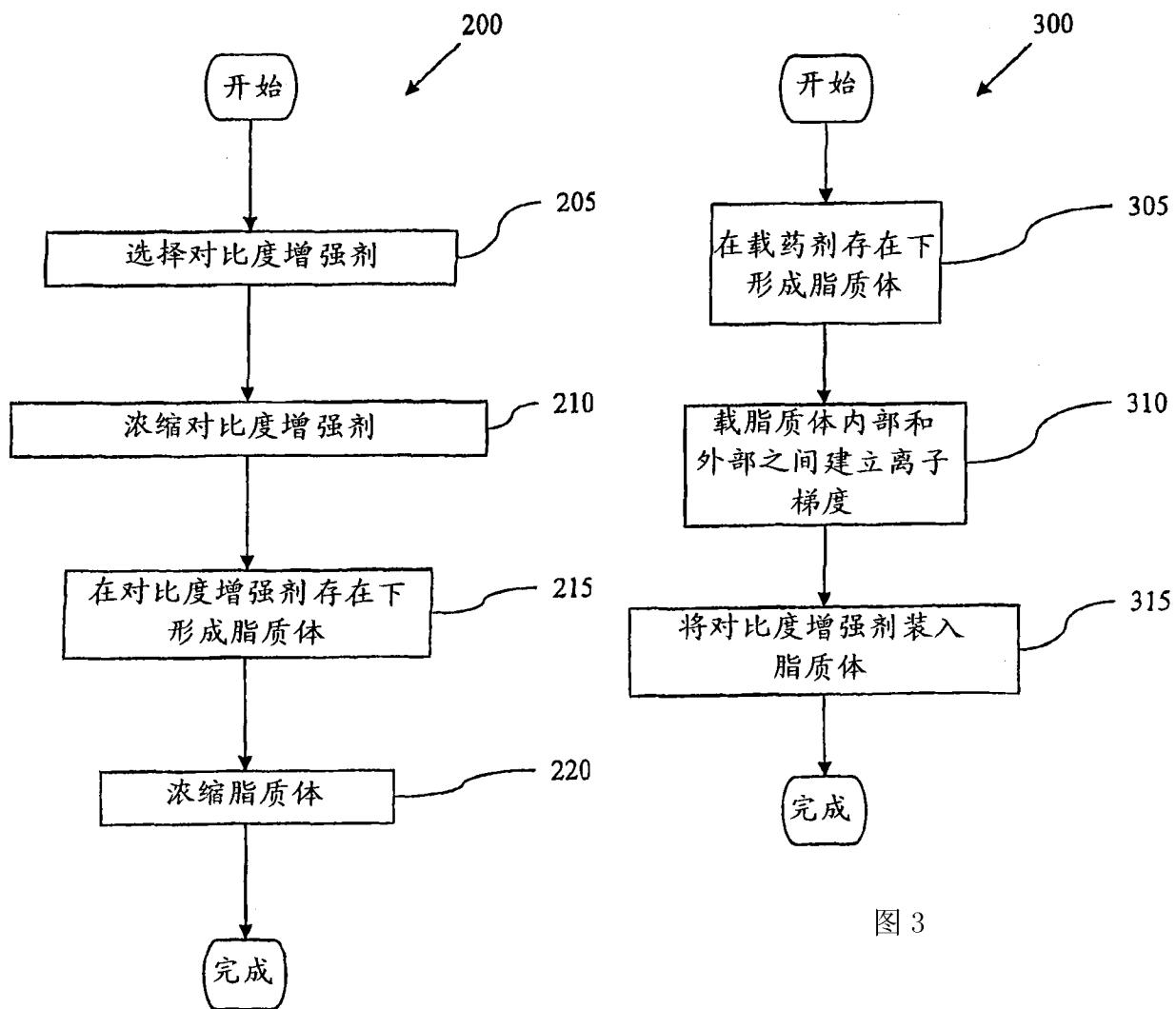


图 2

图 3

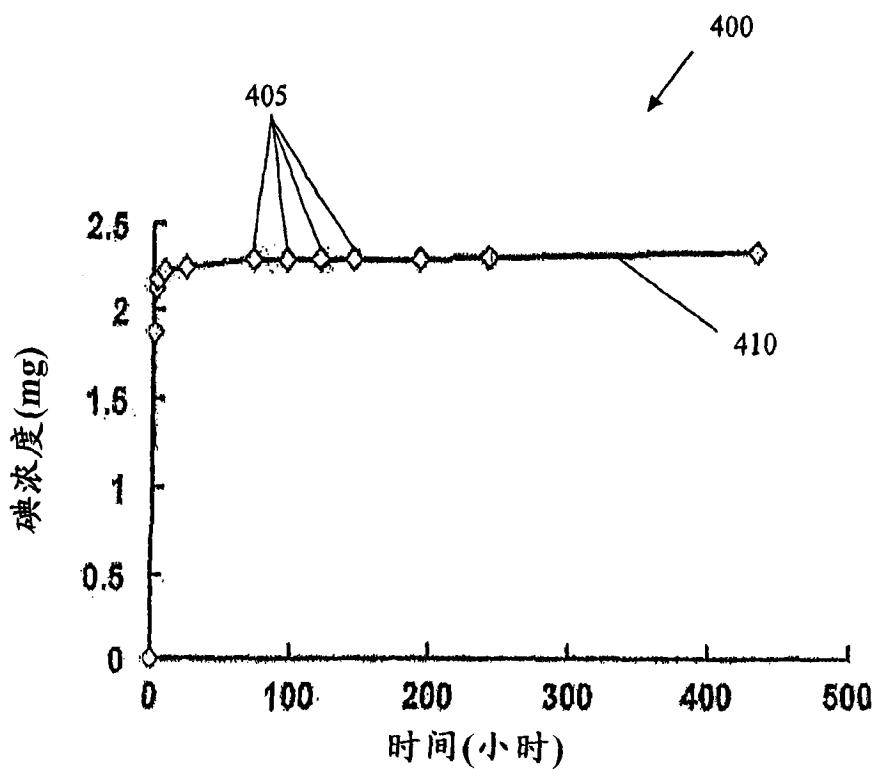


图 4

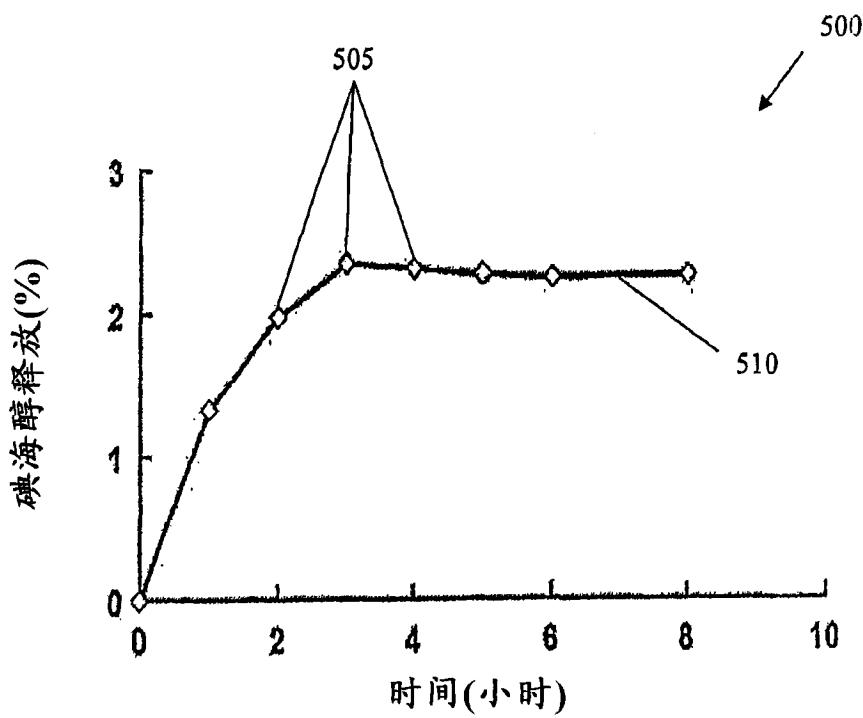


图 5

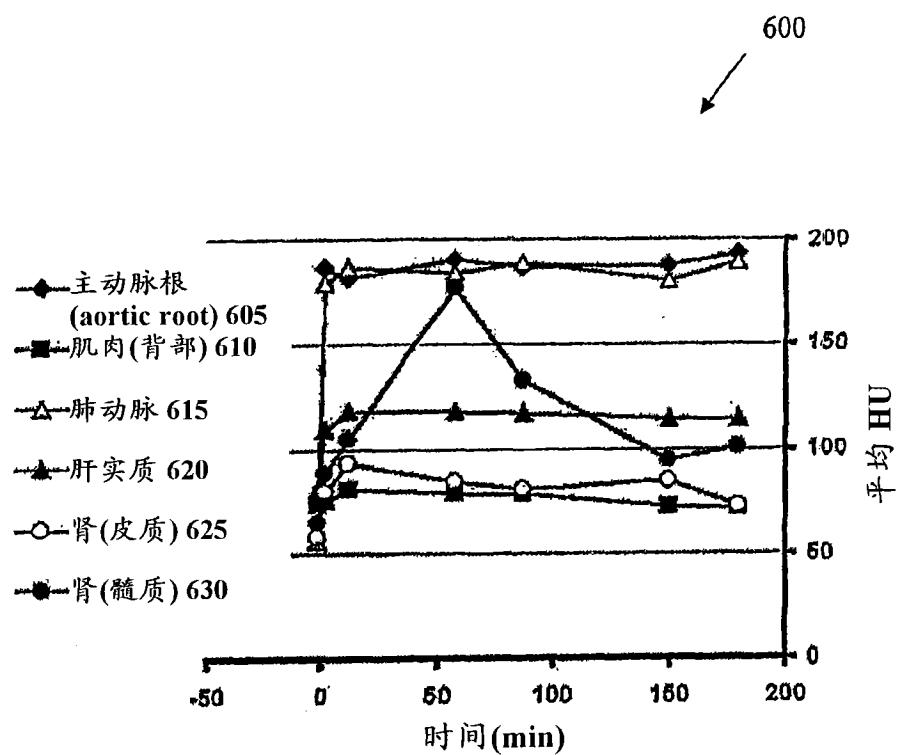


图 6

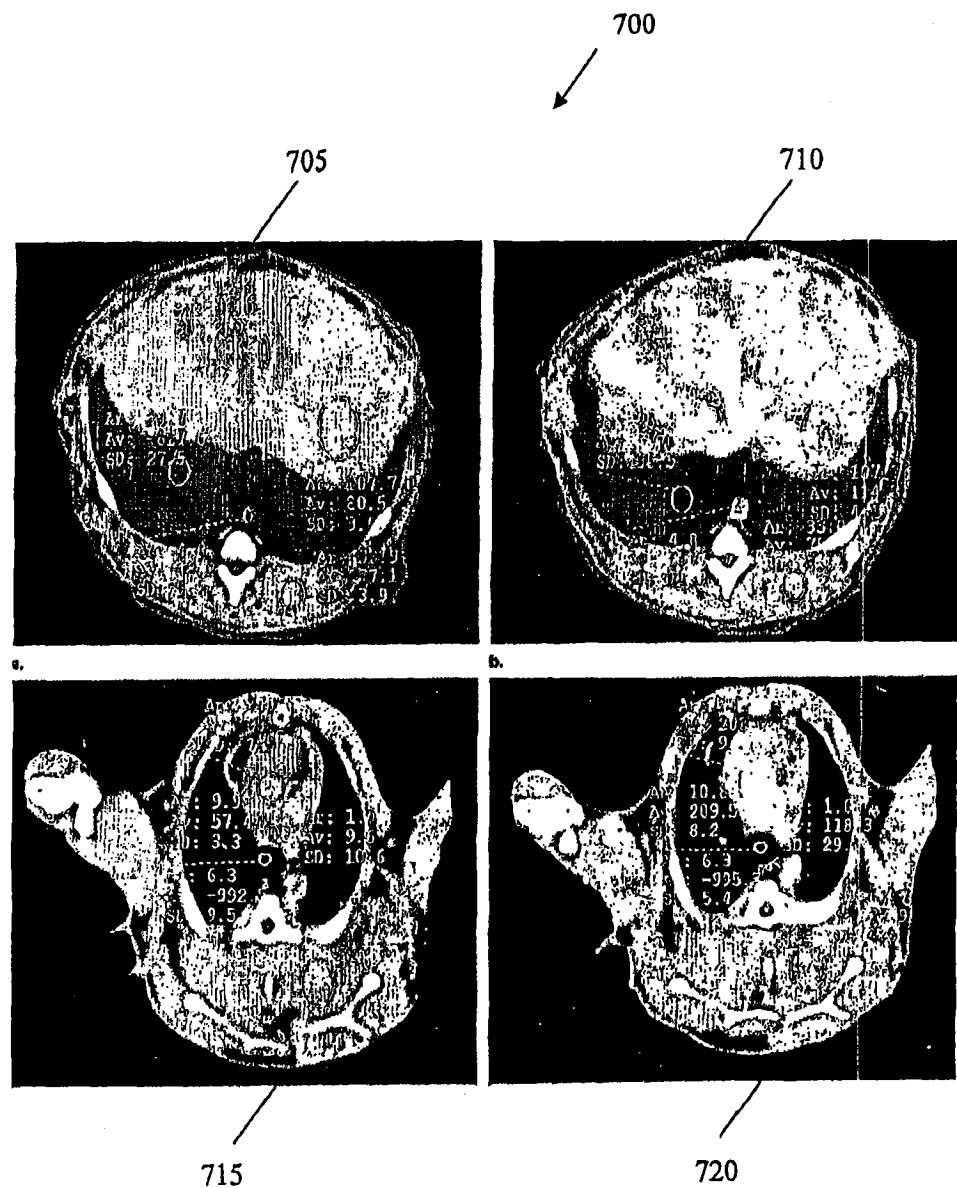


图 7

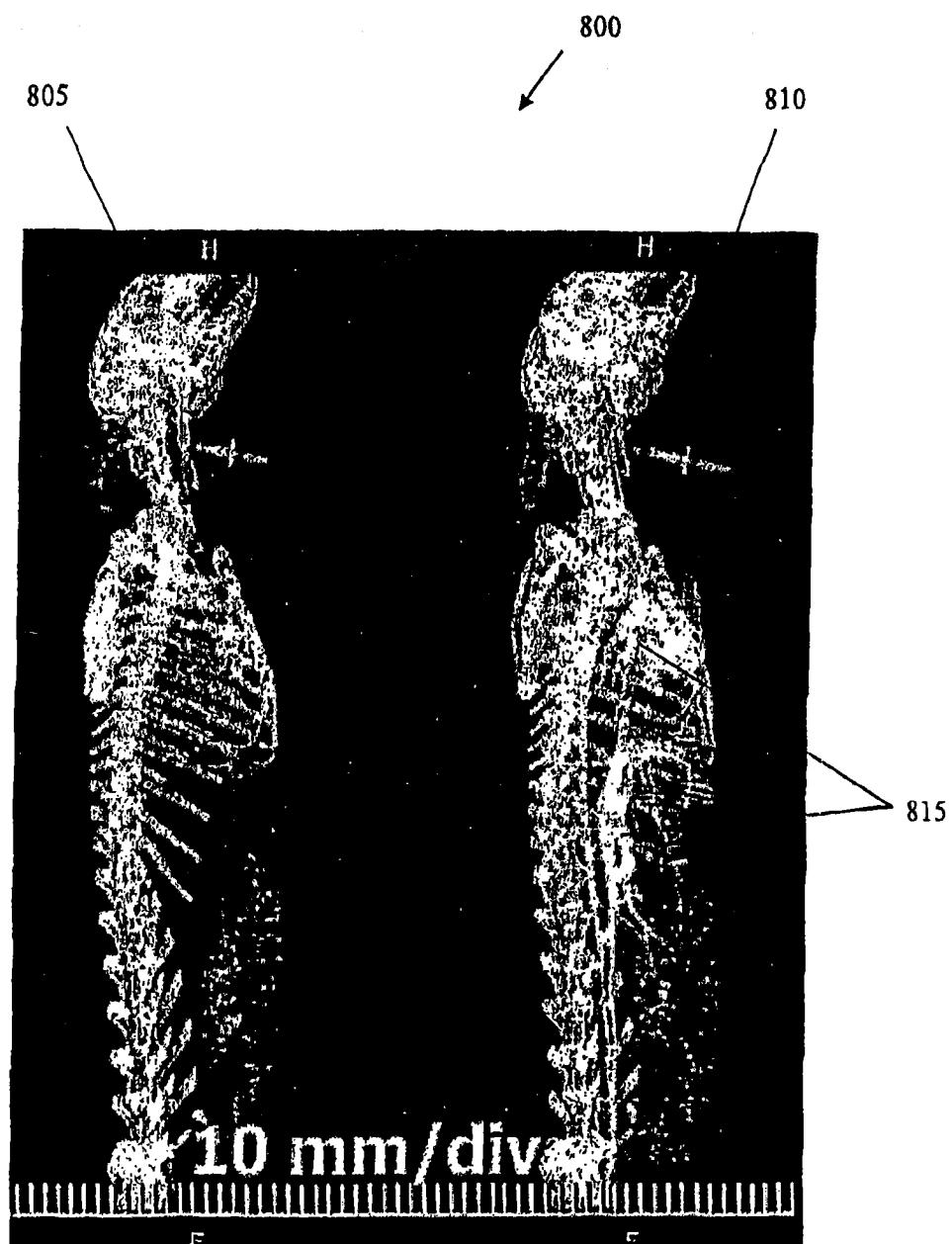


图 8

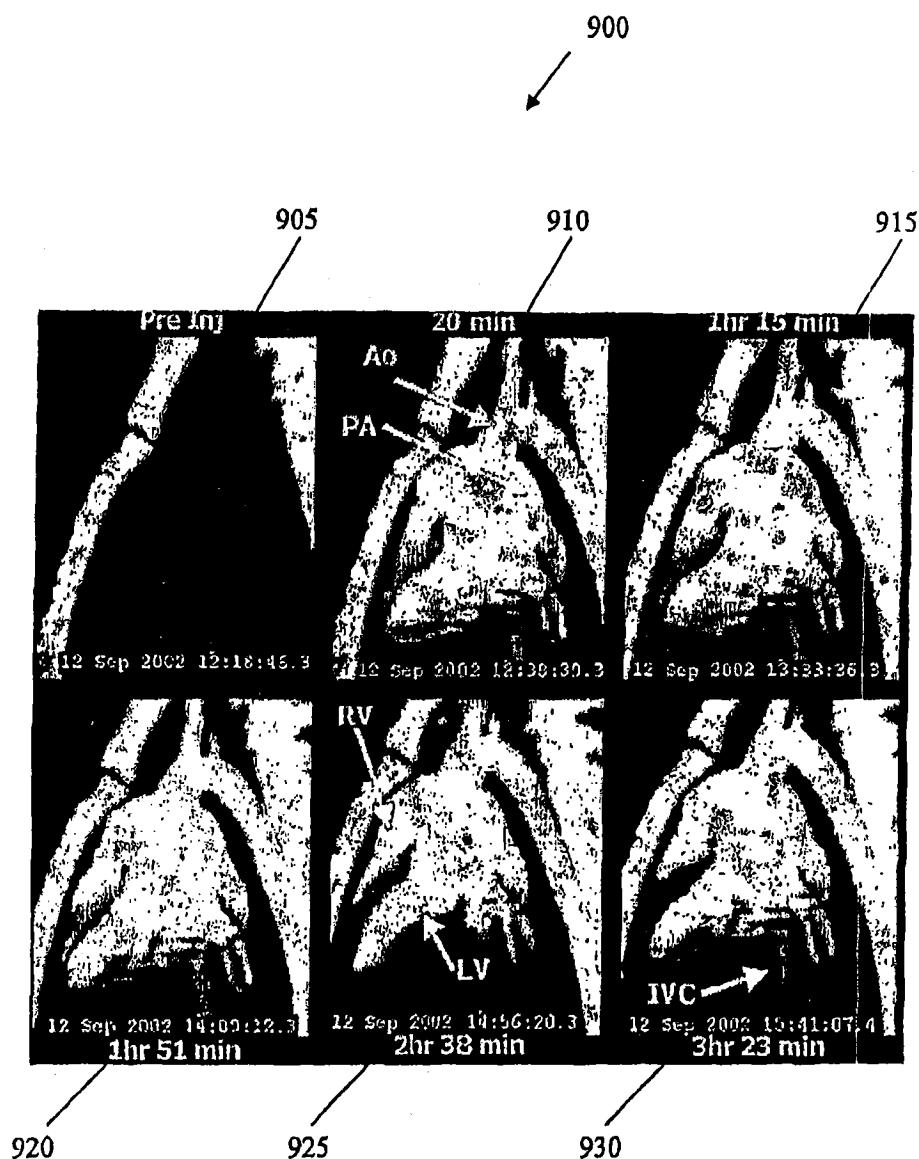


图 9

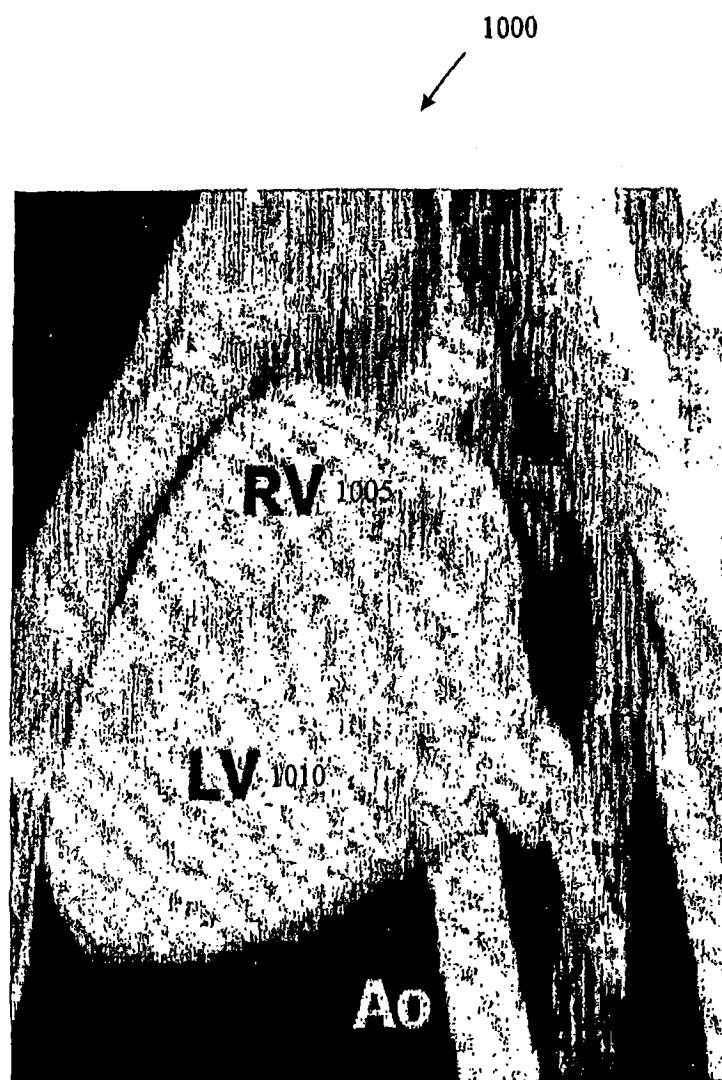


图 10

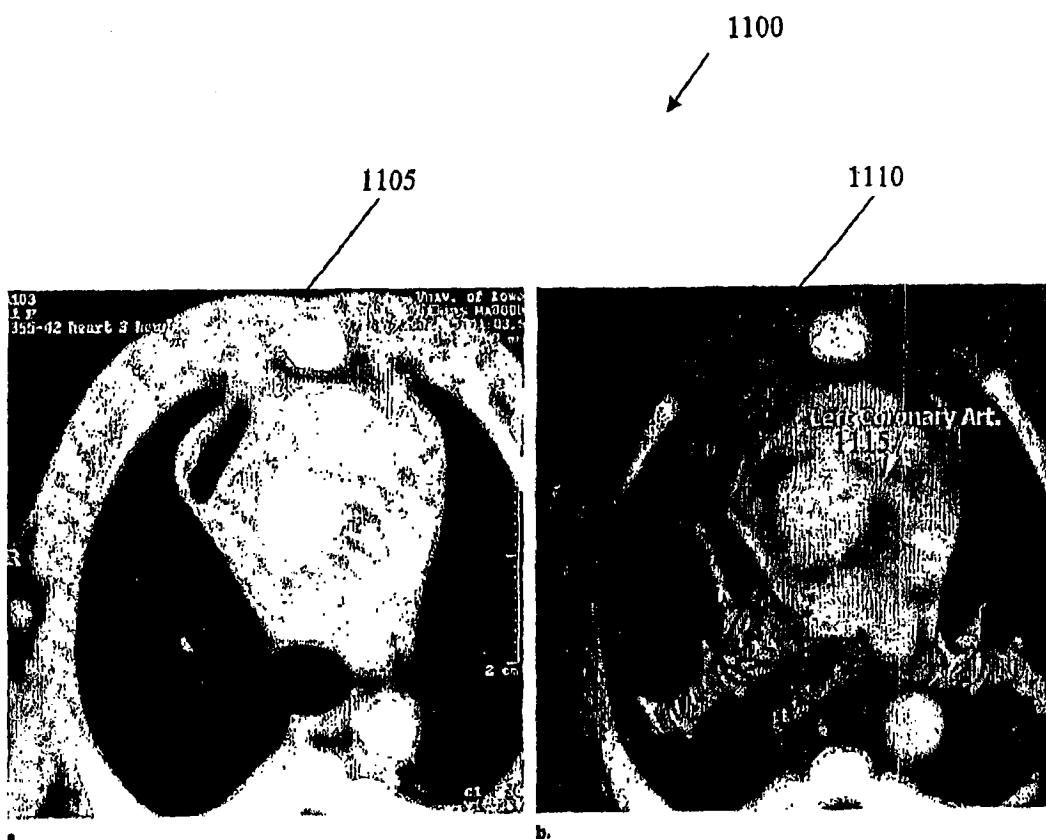


图 11

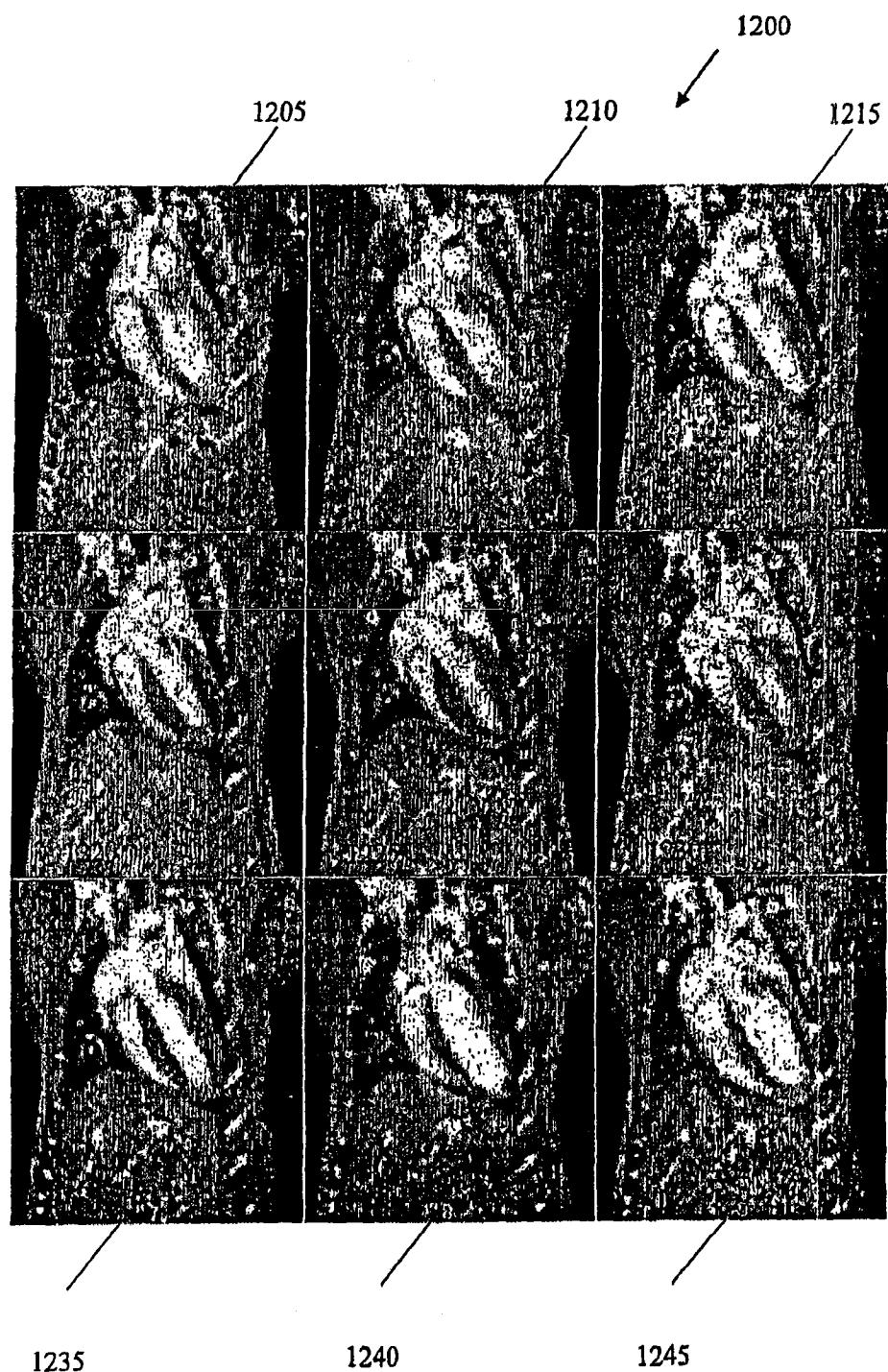


图 12

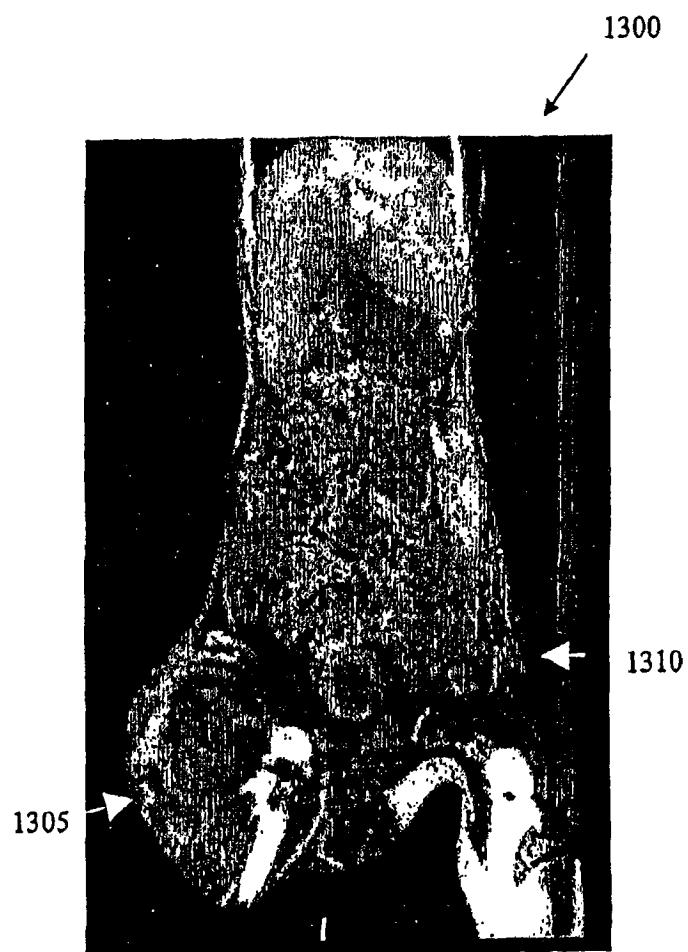


图 13