

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.CI⁶

A61K 49/04



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 95193160.1

[43]公开日 1997年9月24日

[11] 公开号 CN 1160357A

[22]申请日 95.5.22

[30]优先权

[32]94.5.23 [33]US[31]08 / 247,656

[32]95.5.19 [33]US[31]08 / 445,299

[86]国际申请 PCT / US95 / 06499 95.5.22

[87]国际公布 WO95 / 32006 英 95.11.30

[85]进入国家阶段日期 96.11.19

[71]申请人 ImaRx药物公司

地址 美国亚利桑那州

[72]发明人 艾文·C·安格尔

[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 王达佐

权利要求书 6 页 说明书 35 页 附图页数 3 页

[54]发明名称 作为计算机化X射线断层照相术对比剂
的气体填充的微球体

[57]摘要

本发明提供了用作计算机化 X 射线断层照相术 (CT) 对比剂的新的气体填充的微球体。所述微球体由气体和 / 或气体前体, 以及一种或多种稳定化化合物制备。

(BJ)第 1456 号

权 利 要 求 书

1. 包含气体填充的微球体的用于计算机化 X 射线断层照相术造影的对比介质。

5

2. 根据权利要求 1 的对比介质,其中所说的气体选自由空气,氮气,二氧化碳,氧气,氟,氦,氩,氙和氪组成的组。

3. 根据权利要求 1 的对比介质,其中所说的气体包含氟化的气体。

10

4. 根据权利要求 1 的对比介质,其中所说的氟化的气体选自由全氟代烃和六氟化硫组成的组。

5. 根据权利要求 3 的对比介质,其中所说的全氟代烃气体选自由全氟丙烷,全氟丁烷,全氟环丁烷,全氟甲烷,全氟乙烷和全氟戊烷组成的组。

15

6. 根据权利要求 1 的对比介质,其中所述的微球体由生物相容的类脂制备。

7. 根据权利要求 6 的对比介质,其中所说的类脂选自脂肪酸,溶血类脂,磷脂
20 酰胆碱,磷脂酰乙醇胺,磷脂酰丝氨酸,磷脂酰甘油,磷脂酰肌醇,鞘脂,糖脂,葡糖脂,硫苷脂;糖鞘脂,磷脂酸,棕榈酸,硬脂酸,花生四烯酸,油酸,带聚合物的类脂,带磺化单糖的类脂,带磺化双糖的类脂,带磺化的寡糖的类脂,带磺化的多糖的类脂,胆甾醇,生育酚,带醚键连的脂肪酸的类脂,带酯键连的脂肪酸的类脂,聚合的类脂,二乙酰基磷酸酯,二鲸蜡基磷酸酯,硬脂基胺,心磷脂,带 6
25 -8 个碳原子长度的磷脂,带不对称酰基链的合成磷脂,神经酰胺,非离子型类脂,甾醇脂族酸酯,糖酸的甾醇酯,糖酸的酯,糖醇的酯,糖的脂,脂族酸酯,皂草苷,甘油二月桂酸脂,甘油三月桂酸酯,甘油二棕榈酸脂,甘油,甘油酯,长度为 10 至 30 个碳的醇, 6-(5-胆甾烯-3 β -基氧基)-1-硫代- β -D-吡喃半乳糖苷,二半乳糖二甘油苷, 6-(5-胆甾烯-3 β -基氧基)己基-6-氨基-6-脱氧-1-硫代- β -D-吡喃
30 半乳糖苷, 6-(5-胆甾烯-3 β -基氧基)己基-6-氨基-6-脱氧-1-硫代- α -D-吡喃甘露糖苷, 12-(((7'-二乙基氨基香豆素-3-基)羰基)甲氨基)十八烷酸, N-[12-(((7'-二乙基氨基香豆素-3-基)羰基)甲氨基)十八烷酰基]-2-氨基棕榈酸,胆甾醇基(4'-三甲基铵基)丁酸酯, N-琥珀基二油酰基磷脂酰乙醇胺, 1,2-二油酰基-sn-甘油, 1,2-二棕榈酰基-sn-3-琥珀酸基甘油, 1,3-二棕榈酰基-2-琥珀酰基甘油,
35 1-十六烷基-2-棕榈酰基甘油磷酸乙醇胺,棕榈酰基胱氨酸,阳离子型类脂, N-

[1-(2,3-二油酰氧基)丙基]-N, N, N-三甲基铵氯化物, 1,2-二油酰基-3-(三甲铵基)丙烷, 1,2-二油酰基-3-(4'-三甲基氨基)丁酰基-sn-甘油, 带阳离子聚合物的类脂, 磷酸烷基脂, 次磷酸烷基酯, 和亚磷酸烷基酯。

5 8. 根据权利要求 7 的对比介质, 其中所说的磷脂酰胆碱选自二油酰基磷脂酰胆碱, 二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱, 二(十五烷酰基)磷脂酰胆碱, 二月桂酰基磷脂酰胆碱, 二棕榈酰基磷脂酰胆碱和二硬脂酰基磷脂酰胆碱; 其中磷脂乙醇胺选自二油酰基磷脂酰乙醇胺, 二硬酰基磷脂酰乙醇胺和二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺; 其中鞘脂类是鞘磷脂; 其中糖脂类选自由神经节苷脂 GM1 和神经节苷酯 GM2 组成的组; 其中
10 带有聚合物的类脂中, 聚合物选自由聚乙二醇, 几丁质, 透明质酸和聚乙烯基吡咯烷酮组成的组; 其中甾醇脂族酸酯选自由胆甾醇硫酸酯, 胆甾醇丁酸酯, 胆甾醇异丁酸酯, 胆甾醇棕榈酸酯, 胆甾醇硬脂酸酯, 羊毛甾醇乙酸酯, 麦角甾醇棕榈酸酯, 和植物甾醇正丁酸酯组成的组; 其中糖酸的甾醇酯选自由胆甾醇葡萄糖苷酸, 羊毛甾醇葡萄糖苷酸, 7-脱氢胆甾醇葡萄糖苷酸, 麦角甾醇葡萄糖苷酸, 胆甾醇葡萄糖酸酯, 羊毛甾醇葡萄糖酸酯, 和麦甾醇葡萄糖酸酯组成的组; 其中糖酸的酯和糖醇的酯选自由月桂基葡萄糖苷酸, 硬脂酰基葡萄糖苷酸, 肉豆蔻酰基葡萄糖苷酸, 月桂基葡萄糖酸酯, 肉豆蔻酰基葡萄糖酸酯, 和硬脂酰基葡萄糖酸酯组成的组; 其中糖的酯和脂族酸的酯选自由蔗糖月桂酸酯, 果糖月桂酸酯, 蔗糖棕榈酸酯, 蔗糖硬脂酸酯, 葡萄糖醛酸, 葡萄糖酸, accharic acid, 和多糖醛酸组成的组; 其中皂草苷选自由萨酒皂草配基, 菝葜配基, 常春配基, 石竹素, 和毛地黄素苷配基组成的组; 其中甘油酯选自由甘油三棕榈酸酯, 甘油二硬脂酸酯, 甘油三硬脂酸酯, 甘油二肉豆蔻酸酯, 甘油和三肉豆蔻酸酯组成的组; 其中 10-30 个碳原子的醇选自由正癸醇, 月桂基醇, 肉豆蔻基醇, 鲸蜡基醇, 和正十八烷基组成的组; 其中在带阳离子型聚合物的类脂中, 阳离子型聚合物选自由聚赖氨酸和聚精氨酸组成的组。

25

9. 根据权利要求 6 的对比介质, 其中所说的类脂选自由二棕榈酰基磷脂酰胆碱, 二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺和二棕榈酰基磷酸组成的组。

10. 根据权利要求 9 的对比介质, 其中聚乙二醇被连接到所说的二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺上。

11. 根据权利要求 1 的对比介质, 其中所说的类脂包含结合量为摩尔百分数约 0.5 至约 30 的二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺和磷脂酸。

12. 根据权利要求 11 的对比介质, 其中所说的类脂选自由二棕榈酰基磷脂酰胆碱和二硬脂酰基磷脂酰胆碱组成的组, 其量为约 70 至约 100 摩尔百分数。

13. 根据权利要求 6 的对比介质，其中所说的类脂包括：(i)中性类脂，(ii)负电荷类脂，和(iii)带亲水性聚合物的类脂；其中所说的负电荷类脂的量大于存在的总类脂的 1%摩尔，而带亲水性聚合物的类脂的量大于存在的总类脂的 1%摩尔。

5

14. 根据权利要求 13 的对比介质，其中所说的负电荷类脂是磷脂酸，而其中聚合物在带亲水性聚合物的类脂中具有平均分子量的 400 至 100000，并被共价连接到所说的类脂上。

10 15. 根据权利要求 14 的对比介质，其中所说的亲水聚合物选自由聚乙二醇，聚丙二醇，聚乙烯基醇和聚乙烯基吡咯烷酮和其共聚物组成的组，而其中所说的带亲水聚合物的类脂的所说的类脂选自由二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺和二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺组成的组。

15 16. 根据权利要求 6 的对比介质，其中所说的类脂包含约 77.5 摩尔百分数的二棕榈酰基磷脂酰胆碱，约 12.5 摩尔百分数的二棕榈酰基磷脂酸，和约 10 摩尔百分数的二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 5000。

20 17. 根据权利要求 6 的对比介质，其中所说的类脂包含约 82 摩尔百分数的二棕榈酰基磷脂酰胆碱，约 10 摩尔百分数的二棕榈酰基磷脂酸，和 8 摩尔百分数的二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 5000。

18. 根据权利要求 1 的对比介质，其中所说的微球体从选自由多糖，半合成聚合物和合成聚合物组成的组的生物相容聚合物制备。

25

19. 根据权利要求 18 的对比介质，其中所说的聚糖选自由阿聚糖，果聚糖，岩藻聚糖，半乳聚糖，半乳醛聚糖，葡聚糖，甘露聚糖，木聚糖，果聚糖，岩藻依聚糖，角叉菜聚糖，galactocarolose，果胶酸，果胶，直链淀粉，支链淀粉，糖原，支链淀粉，纤维素，葡聚糖，石脐素，几丁质，琼脂糖，角质素，软骨素，皮肤素，透明质酸，藻酸，黄耆胶，淀粉，含有一个或多个下列醛糖，酮，酸或胺的天然均聚物和杂聚物：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，古洛糖，艾杜糖，半乳糖，塔罗糖，赤藓酮糖，核酮糖，木酮糖，阿洛酮糖，果糖，山梨糖，塔格糖，甘露糖醇，山梨糖醇，乳糖，蔗糖，海藻糖，麦芽糖，纤维素二糖，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，组氨酸，葡糖醋酸，葡糖酸，葡糖二酸，半乳糖醛酸，甘糖醛酸，葡糖胺，半乳糖胺，和神经氨酸，和其天然产生

30

35

的衍生物。

20. 根据权利要求 18 的对比介质，其中所说的半合成的聚合物选自羧甲基纤维素，羟甲基纤维素，羟丙基甲基纤维素，甲基纤维素，和甲氧基纤维素组成的组。

5

21. 根据权利要求 18 的对比介质，其中所说的合成聚合物选自由聚乙烯，聚丙烯，聚氨基甲酸乙酯，聚酰胺，聚苯乙烯，聚乳酸，氟化的烃，氟代烃和聚甲基异丁烯酸酯组成的组。

10

22. 根据权利要求 21 的对比介质，其中所说的聚乙烯选自由聚乙二醇，聚氧乙烯和聚对苯二甲酸乙二醇酯；其中所说的聚丙烯是聚丙烯；其中所说的聚氨基甲酸乙酯选自聚乙烯基醇，聚氯乙烯和聚乙烯基吡咯烷酮；其中所说的聚酰胺是尼龙；而其中所说的氟代烃是聚四氟乙烯。

15

23. 根据权利要求 1 的对比介质，进一步包含选自由可摄入的油；混合的胶束体系化合物；粘度改进剂；乳化和 / 或增溶剂；悬浮或粘度增加剂；合成的悬浮剂；和张力提高剂组成的组。

20

24. 根据权利要求 1 的对比介质，其中所说的气体至少部分地从气体前体衍生。

25. 根据权利要求 1 的对比介质，其中所说的微球体从包含二棕榈酰基磷脂酰胆碱，甘油和丙二醇的组合物的制备。

25

26. 制备用作计算机化 X 射线断层照相术对比介质的气体填充的微球体的方法，包含在气体存在下搅拌生物相容类脂的水悬浮液。

27. 根据权利要求 26 的方法，其中所说的搅拌包括振荡或涡旋。

30

28. 根据权利要求 27 的方法，其中所说的振荡包括以弧线形式往复运动。

29. 根据权利要求 28 的方法，其中所说的弧在约 2° 至 20° 之间，每分钟往复的次数在约 1000 至约 20000 之间。

35

30. 根据权利要求 29 的方法，其中所说的弧在约 6° 至约 7° 之间，而每分钟往复的次数在约 5000 至约 8000 之间。

31. 根据权利要求 26 的方法，其中所说的搅拌在低于所说的生物相容类脂从凝胶向液晶相变温度的温度下进行。

5 32. 制备用作计算机化 X 射线断层照相术对比介质的气体填充的微球体的方法，包含

在气体前体存在下，搅拌生物相容类脂的水悬浮液以提供气体前体填充的微球体；和

活化所说的气体前体以产生气体填充的微球体。

10

33. 根据权利要求 32 的方法，其中所说的搅拌包括振荡或涡旋。

34. 根据权利要求 33 的方法，其中所说的振荡包含以弧线形式的往复运动。

15 35. 根据权利要求 34 的方法，其中所说的弧在 2° 至 20° 之间，而每分钟往复的次数在约 1000 至约 20000 之间。

36. 根据权利要求 35 的方法，其中所说的弧在约 6° 至约 7° 之间，而每分钟往复的次数在约 5000 至 8000 之间。

20

37. 根据权利要求 32 的方法，其中所说的搅拌在低于所说的生物相容类脂从凝胶向液晶相变温度的温度下进行。

38. 根据权利要求 32 的方法，进一步包含在气体存在下搅拌所说的悬浮液。

25

39. 提供患者的内部区域影像的方法，包含(i)对患者施用根据权利要求 1 的对比介质，和(ii)用计算机化 X 射线断层照相术扫描患者，得到区域的可视影像。

40. 根据权利要求 39 的方法，其中区域包括脉管系统。

30

41. 根据权利要求 39 的方法，其中区域包括心血管区。

42. 根据权利要求 39 的方法，其中区域包括胃肠区。

35 43. 诊断患者体内病组织存在的方法，包括(i)对患者施用根据权利要求 1 的对比介质，和(ii)用计算机化 X 射线断层照相术扫描患者得到患者体内任何病组织的

可视影像。

44. 根据权利要求 43 的方法，其中区域包含脉管系统。

5 45. 根据权利要求 43 的方法，其中区域包含心血管区。

46. 根据权利要求 43 的方法，其中区域包含胃肠区。

10 47. 根据权利要求 43 的方法，其中所说的区域扫描是选自由患者鼻道，耳道，眼内区，腹膜内区，肾，尿道和生殖泌尿道组成的组的区域扫描。

48. 提供患者内部区域影像的方法，包含(i)对患者施用气体前体填充的微球体，(ii)使所说的气体前体进行从液态到气态的相变，和(iii)用计算机化 X 射线断层照相术扫描患者，得到所说区域的可视影像。

15

49. 诊断患者体内病组织存在的方法，包括(i)对患者施用气体前体填充的微球体，(ii)使所说的气体前体从液体相变为气体，和(iii)用计算机化 X 射线断层照相术扫描患者，得到患者体内任何病组织的可视影像。

20

50. 在患者组织中就地制备用于计算机化 X 射线断层照相术的对比介质的方法，该对比介质包含气体填充的微球体，该方法包含(i)对患者施用气体前体填充的微球体，和(ii)使气体前体从液体相变为气体以提供气体填充的微球体。

25 51. 根据权利要求 48 的方法，其中所说的气体前体在接近患者正常体温进行从液态到气态的相变。

说明书

作为计算机化 X 射线断层照相术对比剂的气体填充的微球体

5

相关申请的交叉参考

这是 1994 年 5 月 23 日提交的共未决美国申请序号 08/247,656 的部分连续申请，08/247,656 申请的相关申请是 1993 年 9 月 7 日提交的美国申请序号 08/116,982，现已被授权，08/116,982 申请是 1993 年 1 月 19 日提交的美国申请序号 07/980,594，1994 年 1 月 25 日公告的美国专利 5,281,408 的分案，而 5,281,408 专利则是 1991 年 4 月 5 日提交的美国申请序号 07/680,984，于 1993 年 4 月 27 日公告的美国专利 5,205,290 的分案。

10

上述所有的各个公开全部引作本文的参考。

15

本发明领域

本发明涉及用于计算机化 X 射线断层照相术的组合物。更具体地，本发明涉及包含气体填充的微球体的用于计算机化 X 射线断层照相术的组合物。

20

本发明背景

计算机 X 射线断层照相术 (CT) 是以其造影方法测量物质的放射密度的诊断造影技术。物质的放射密度典型地以 Hounsfield 单位 (HU) 表示。Hounsfield 单位是物质的计算机化 X 射线断层照相术 X-射线的相对吸收的度量，并与电子密度成正比。水被人为地定义为 0 HU，空气为 -1000HU，而皮骨密度为 1000HU。

25

体内的各种组织具有相似的密度。已遇到的困难是由具有相似密度的组织的 CT 可视影像产生的，它们彼此非常相近。例如，很难产生胃肠 (GI) 道和相邻结构，例如包括血管和淋巴结的分开的 CT 影像。因此，对比剂已被开发出来试图改变不同组织的相对密度，由此改进 CT 的诊断效果。

30

常用于计算机化 X 射线断层照相术，尤其是与 GI 道扫描有关以增加肠腔的放射密度的对比剂是硫酸钡。硫酸钡在身体的某些部位增加电子密度，被分类为“正对比剂”。

35

目前可以得到的 CT 对比剂，包括钡化合物如硫酸钡，具有各种弊端。例如，CT 剂的寿命通常对浓度极为敏感。如果浓度太低，观察到很小的对比度。如果浓度太高，产生射线硬化的影像，在 CT 影像中被观察为条纹。另外，用现有的对比剂通常难以看到腔粘膜。

5

脂质体组合物，例如，脂质体乳化液和/或悬浮液，已被配制为对比剂，尤其是用于 GI 道。脂质体固有低于水的电子密度。因而，脂质体组合物可以减小电子密度，并通称为“负对比剂”。

10 脂质体组合物可以在 CT 扫描中提供增加的显现。然而，以脂质体为基础的对比剂也有各种弊端。例如，单含有脂质体的组合物一般口感不好，这限制了其作为经口应用的用途。另外，脂质体组合物在配制时很贵。高浓度的常用于以脂质体为基础的对比剂以在身体的某些区域，例如肠腔达到适当的负对比度的脂质体也可产生不想有的副作用。患有胰腺炎，消化道或胃溃疡，过敏性肠病，Crohn 氏病，或
15 结肠炎的患者特别易于产生这类副作用。而且，以质脂体为基础的对比剂很容易腐烂，因此具有有限的贮藏寿命。

因此，需要新和 / 或更好的用于 CT 的对比剂。本发明涉及这些，以及其它重要的目标。

20

现有技术简述

在上面的 US5,205,290 中，披露了作为用于计算机化 X 射线断层照相术的对比剂的低密度微球体，它由从单体，如丙烯酸，异丁烯酸，吡丙淀，丙烯酰胺，乙二醇，N-乙烯基-2-吡咯烷酮等等制备的生物相容的合成聚合物或共聚物组成的。在
25 优选的合成方案中，微球体用热膨胀法制备，其中由可膨胀的聚合物或共聚物制造的微球体，其空隙或空腔中含有挥发性液体。微球体然后被加热，塑化微球体并挥发液体，使微球体膨胀至其原来大小的约几倍。当热被除去时，热塑性聚合物保持至少一些其膨胀的形状。由此方法产生的微球体倾向于具有特别低的密度，因而被
30 认为是优选的。

可用于 US5,205,290 的热膨胀方法中的挥发性液体包括脂肪烃，如乙烷；氯氟代烃，如 CCl_3F ；四烷基甲硅烷，如四甲基甲硅烷；以及全氟代烃，如具有 1 至约 9 个碳原子和约 4 至 20 个氟原子的，尤其是 C_4F_{10} 。据说挥发性液体不是微球体
35 聚合物或共聚物的溶剂这点很重要；而且挥发性液体应具有低于微球体聚合物或共聚物的软化点的沸点。

在本发明中用作对比介质的稳定化的气体前体填充的微球体区别于 US5,205,290 中的那些，其中它们不是由聚合物或共聚物通过热膨胀法制造的，因而也没有相同的限制：挥发性液体应不是微球体聚合物或共聚物的溶剂，没有低于
5 微球体聚合物或共聚物的软化点的沸点。

在 D'AMigo 的，US4,684,479 和 5,215,680 中分别公开了液包气乳化液和脂质液包衣的微气泡，它们是稳定的并声称可用于几个领域，包括作为用于心回波描记术的对比剂，和在局部血流的超声波监测中。然而，没有建议这些组合物可用作计算
10 机化 X 射线断层照相术的对比介质。

Quay 公开的申请 WO93/05819 中公开了具有高 Q 值的气体对于形成稳定的气体是理想的，这些气体的“微气泡”在超声波造影中用作对比剂。然而，该公开只限于稳定的气体，而没有如本发明中的其稳定化和胶囊化；尽管在第 31 页所述的优
15 选方案中，山梨糖醇被用于增加粘度，它被声称延长微气泡在溶液中的寿命。而且，所包括的气体具有一定的 Q 值或扩散性因子不是本发明的基本需要。Quay 不含有气体微气泡有效地作为用于计算机化 X 射线断层照相术的对比介质的建议。

Vanderipe 公开的申请 WO93/06869 中也公开了气体和气体混合物，包括全氟代
20 烃的气泡作为超声波造影增强剂的应用。然而，同样地，这些气泡没有被胶囊化，也没有建议它们作为计算机化 X 射线断层照相术对比介质的应用。

Lanza 等人，公开的申请 WO93/20802 中公开了声反射的寡层脂质体用于超声波造影增强，它是在两层之间带有增加的含水空间的多层脂质体，或具有脂质体以
25 非同心的方式藏在两层之间，因而含有相互分开的两层。其在对患者给药的脂质体中监测输送的药物的用途也被描述。然而，没有建议这些脂质体可作为用于计算机化 X 射线断层照相术的对比介质。

Widder 等人，公开的申请 EP-A-0324938 中公开了由热变性生物相容性蛋白质，例如，白蛋白，血红蛋白，红交原生产的稳定化的微气泡类超声波造影剂。然而，同样地，这类组合物作为用于计算机 X 射线照相术的对比介质的用途也没有
30 被描述。

也提到一个相信是由 Moseley 等人在 1991 Napa, California, Society for Magnetic
35 Resonance in Medicine 的会议上作出的介绍，在一个题为“Microbubbles: A Novel MR Susceptibility Contrast Agent”的摘要中简介。被应用的微气泡包含用一层人白

蛋白包衣的空气。本发明的稳定化的气体填充的微球体没有被建议，也没有它们作为用于计算机化 X 射线断层照相术的对比介质。

5 Tei 等人，特开昭 63-60943 的未审专利申请中披露了用于超声波诊断的对比剂，包含乳化液颗粒大小 1 至 10 μm 的全氟代烃乳化液，其中全氟代烃优选地有 9 至 11 个碳原子，而乳化剂可以是，例如，磷脂或非离子聚合物表面活性剂如聚（氧乙烯）-聚（氧丙烯）共聚物。乳化液可以通过用混合器制备。然而，没有建议这些全氟代烃乳化液适于用作计算机 X 射线断层照相术中的对比介质。

10 Knight 等人，在 US5,049,388 中披露了小颗粒气雾剂脂质体如脂质体-药物结合用医用，例如，用于通过吸入法将药物输送到呼吸道系统。然而，没有建议这些脂质体可以是气体前体填充的，或它们可作为用于计算机化 X 射线断层照相术的对比介质。

15 发明提要

本发明涉及用于计算机化 X 射线断层照相术造影的对比介质，所说的对比介质包含稳定化的气体和气体前体填充的微球体，其中气体可以是，例如，空气或氮气，但也可以从气体前体，例如，全氟戊烷衍生，而微球体通过从稳定化的化合物，例如，20 生物相容的类脂或聚合物形成而稳定化。在某些优选的方案中，生物相容的类脂包含以类脂双层形成的磷脂。根据本发明的对比介质包含一基本均匀以及惊人地稳定的包含气体和稳定化化合物的微球体的悬浮体。本发明一个独特的方面包括可以保持微球体完整性，因而增强微球体的稳定性的全氟代烃气体的应用。

25 本发明也涉及制备用于计算机化 X 射线断层照相术造影对比介质的稳定化的气体填充的微球体的方法，包含搅拌稳定化化合物，例如，生物相容类脂或聚合物的水悬浮液的步骤，使稳定化的气体填充的微球体产生。理想地，此步骤在低于生物相容类脂凝胶在液晶相变温度的温度下进行以实现稳定化的气体填充的微球体产物。

30 本发明还涉及提供患者的体内区域增强的造影的方法，包含（i）对患者施用一种或多种本发明的对比介质，和（ii）用计算机化 X 射线断层照相术造影扫描患者，以得到所包含区域的可视影像。

35 本发明也包括用于诊断患者病组织存在，尤其是患者的胃肠区的方法，包括（i）对患者施用一种或多种本发明的对比介质，和（ii）用计算机化 X 射线断层

照相术造影扫描患者以得到区域内任何病组织的可视造影。

5 本发明还涉及在患者组织中原位制备用于计算机化 X 射线断层照相术的对比介质的方法，包括 (i) 对患者施用气体前体填充的微球体，和 (ii) 使气体前体进行从液体到气体的相变产生气体填充的微球体，所述的对比介质包含气体填充的微球体。

10 本发明的所有上述部分都可以十分有利地，尤其是考虑患者容易吸收，通过用气体前体形成气体填充的微球体的气体而进行。一旦吸收，和气体在，例如，胃肠道中形成，气体前体的膨胀引起对比介质体积的增加，并给予胃肠道低密度，因而增强其计算机化 X 射线断层照相术造影。这些气体前体可以通过多种因素活化，但优选地是温度活化，即，它们通过被暴露于升高的温度而活化。这类气体前体是在选择性的活化或转变温度，从液体到气体相变的化合物。因而活化化合物的温度使通过从低于活化或转变温度增加到高于活化或转变温度而进行。非强制性地，对
15 比介质可进一步包含液体氟代烃化合物，例如，全氟代烃，以进一步稳定微球体。优选地，氟代烃液体被包裹于微球体。

20 本发明也涉及制备用作计算机化 X 射线断层照相术造影对比介质的稳定化的气体或气体前体填充的微球体的方法。该方法包括在气体或气体前体存在下搅拌类脂（即，类脂稳定化的化合物）的水悬浮液，产生气体或气体前体填充的微球体。理想地，搅拌在低于类脂的凝胶向液晶相转变温度的温度下进行以得到优选的产品。

25 当使用气体前体时，气体前体填充的微球体组合物在对患者给用之前一般保持在气体前体为液体的温度。如果需要，给用时，可使温度增高到活化气体前体形成气体的温度。然后对患者给用所得的气体填充的微球体。另外，如果需要，气体前体填充的微球体可以不升温而给用，在患者内部自然升温使气体前体形成气体。如果需要，在给用之前，组合物可被搅抖。

30 本发明还涉及提供患者内部的增强影像的方法，尤其是所说的患者的胃肠区的造影，所说的方法包括 (i) 对患者施用前面的对比介质，和 (ii) 用计算机化 X 射线断层照相术造影扫描患者以得到所说区域的可视造影。

35 本发明也涉及诊断患者病组织，尤其是在所说的患者的胃肠区中存在的方法，所说的方法包括 (i) 对患者施用前述对比介质，和 (ii) 用计算机化 X 射线断层照相术造影扫描患者以得到在该区域中的任何病组织的可视造影。

本发明的这些和其它方面将由下面的详述与下面的附图结合而变得更清楚。

附图简述

5 应该注意到，为了使附图更容易理解，只有单个双层被示出。事实上，这些附图说明的膜可以是单层，双层，寡层，或多层。因而，下述附图不在任何意义上将本发明限于微球体的外套或皮只包含单层或双层稳定的化合物。

附图 1 给出了带有最接近类脂的疏水尾巴的全氟代烃充气的类脂双层微球体的
10 稳定化。

附图 2 给出了分布在类脂双层内部的单层内带有最接近类脂的疏水尾巴的全氟代烃充气的类脂寡层微球体的稳定化。

附图 3 给出了带有最接近类脂的内部亲水首基的全氟代烃充气的类脂双层微球体的稳定化。

15 附图 4 给出了带有最接近类脂的外部亲水首基的全氟代烃充气的类脂双层微球体的稳定化。

附图 5 给出了带有最接近类脂的内部疏水尾巴的全氟代烃充气的类脂单层微球体的稳定化。

附图 6 给出了在分布于类脂双层外侧的单层内带有最接近类脂的疏水尾巴的全
20 氟代烃充气的类脂寡层微球体的稳定化。

发明详述

如上述所用并贯穿整个文件的，下列术语除非另外指明，将被理解为具有如下
25 意义。

“稳定化的”指微球体基本上阻止例如，由微球体壁内结构或构成的完整性的丧失而引起的和 / 或由被包裹在微球体内的气体或气体前体的重要部分的丧失引起的降解。
30

“类脂”指合成的、半合成的或天然的两性化合物，包含亲水部分和疏水部分。类脂包括，例如，脂肪酸，中性脂肪、磷脂，糖脂，脂肪醇和蜡，萜类和甾类。

“微球体”指特征在于存在内部空腔的小球体。优选的微球体是从类脂，包括
35 各种本文所述类脂配制的。在任何给出的微球体中，类脂可以是单层或双层形式，而单层或双层类脂可被用于形成一个或多个单或双层。在多于一个单或双层的情况

下，单或双层一般是同心的。本文所述的类脂微球体包括通称为脂质体，胶囊，气泡，微气泡，等等的这类实体。因此，类脂可被用于形成单层微球体（包含一个单层或双层）、寡层微球体（包含约两个或约三个单层或双层）或多层微球体（包含多于约三个单层或双层）。微球体的内部空腔可用液体，例如包括，含水液体，气体，气体前体，和 / 或固体或溶质物质，如所需的来填充。

“脂质体”指两性化合物的一般性球状簇集或聚集，所述的两性化合物包括类脂化合物，典型地为一个或多个同心层，例如，双层的形式。它们在本文也可以被称作类脂微球体。

10

“聚合物”指由两个或多个重复单位的化学单元化合形成的分子。因而，包括在术语“聚合物”内的有，例如，二聚物，三聚物和寡聚物。以优选的形式，术语“聚合物”指包含 10 个或更多个重复单位的分子。

15 “半合成聚合物”指已被化学修饰的天然产生的聚合物。示例性的天然产生的聚合物包括，例如，多糖。

“患者”指动物，包括哺乳动物，优选人类。

20 本发明特别涉及，包含稳定化的气体填充的微球体的对比介质，所述的微球体是非常小直径的基本气泡，包含包围或包裹用液体或气体填充的空穴或空腔的稳定化化合物的“皮”或“外壳”。稳定化化合物提供微球体的完整性，可使微球体有用的期间存在。稳定化的微球体特别适合用作计算机化 X 射线断层照相术（CT）的对比剂。在稳定化化合物包含，例如，类脂的实施方案中，微球体具有比水低的
25 电子密度。这一较低的电子密度赋予本发明的对比剂很理想的性质，尤其是对于 CT 造影。

本发明的稳定化的微球体包含气体和/或气体前体。任何一种生物相容的气体和气体前体可被用于本发明的气体和气体前体填充的微球体。优选的气体是惰性而且是生物相容的气体，即对生物功能无害的气体。优选的气体还在含水介质中具有低溶解性和扩散性。

而且，气体和气体前体可以一起使用。本发明一个独一无二且优选的方面产生于当气体前体，例如，全氟代烃，与常用于制造本发明的稳定化微球体的气体结合
35 时，得到稳定性程度增加的微球体，而单独用气体不能得到微球体的发现。因而，本发明的一个优选方面是使用例如，通过使之暴露于升高的温度而被活化的气体前

体，例如，以稳定的泡沫形式形成稳定化的微球体，它可被用作计算机化 X 射线断层照相术的有效的低密度对比剂。

5 用气体前体制造的稳定化的微球体具有几个优点。首先，因为从气体前体产生的气体倾向于不溶和相对不扩散，这些气体可被稳定化以用于计算机化 X 射线断层照相术的对比介质。因为气体是相对稳定的，所需的稳定化化合物比较易溶解和扩散的气体，如氮气或空气所需的少。一般地，稳定化化合物的较厚的壁皮或外壳，例如，厚壁微球体，对于气体如空气或氮气的稳定是必需的。在用空气，氮气或其它气体填充的厚壁微球体可被用作 CT 对比剂的同时，这类微球体的厚壁增加了对比介质的有效密度，这将反过来限制对比介质的效果。而且，厚壁微球体对于口服口感不好，或静脉注射后代谢困难。对于用于本发明的气体前体，例如，全氟代烃，稳定化化合物可以是硬性较小的，而所得的微球体可以是较薄壁的且更易代谢，但仍具有足够的稳定化化合物以稳定微球体。

15 如下面更详细描述，用于本发明的稳定化的微球体可简单地通过在含水环境中和在气体和 / 或气体前体的存在下搅拌稳定化化合物而形成。当使用气体前体时，已被制备的气体前体填充的微球体对比介质在对患者给药之前，理想地保持在气体前体为液体的温度。在给药时，可被预先摇动然后以预先形成的泡沫被吸收。另外，对比介质可以以悬浮液吸收以在，例如，患者的胃和胃肠道中原位形成泡沫。肠蠕动进行气体前体和稳定化化合物之间的混合，而温度的增高使以气体填充的微球体为基础的泡沫在肠内原位形成。在下面更详细描述的首选方案包括掺入合适的粘度改进剂，例如，天然和半天然的胶，纤维素或合成聚合物，例如，聚乙二醇。在这类粘度改进剂和稳定化化合物存在下，它们形成的气泡用这些化合物包被，并通过这一包被方法变得稳定，因此形成本发明的对比介质。

25 这样，微球体由稳定化化合物的基质形成，或由此产生，它使气体填充的微球体被建立，并在被用于计算机化 X 射线断层照相术造影所需的时间内保持其大小和形状。这些稳定化化合物包括具有疏水 / 亲水特征，使它们在水存在下形成双层，以及微球体的那些化合物。这样，水，盐水或一些以水为基础的介质，此后常称之为稀释剂，是本发明的稳定化的气体和气体前体填充的微球体对比剂的重要方面，尤其是在涉及包含双层的微球体的方案中。

35 稳定化化合物可以是对稳定化的微球体提供所需性质的化合物的混合物。例如，已发现有助于基本的稳定化化合物溶解或分散的化合物有利。该气体，可以是微球体被制造时的气体，或可以是响应活化因素，如升高的温度，从液相到气相转变的气体前体。本发明的稳定化的气体和气体前体填充的对比剂的各个方面现在将

被，从气体和气体前体开始描述。

气体和气体前体

5 本发明的微球体是包裹了气体和 / 或气体前体的基本稳定的气泡。气体和 / 或前体又提供具有增加的负密度的组合物。这增加了它们作为用于 CT 对比剂的效果。

10 优选的气体是极其稳定的气体。本文所用的术语，稳定的气体，指基本上惰性且与生物相容的气体，即，对生物功能无害且不产生任何程度的不可接受的毒性，包括变应性反应和病态的气体。优选的也是在含水介质中具有低溶解性和 / 或扩散性的气体。诸如全氟代烃的气体在含水介质中扩散性较小和相对难溶的。因而，它们更容易在含水介质中以气泡的形式而稳定。

15 优选的气体包括选自自由空气，稀有气体，如氦，氖，氩和氙，二氧化碳，氮，氟，氧，含硫气体，如六氟化硫和四氟化硫，氟代烃，全氟代烃气体，和其混合物组成的组。优选的气体是全氟代烃气体。示例性的全氟代烃气体包括，例如，全氟甲烷，全氟乙烷，全氟丙烷，全氟丁烷，全氟环丁烷和其混合物。同样优选的是不同类型气体，如全氟代烃气体和其它类型气体，如氧的混合物。Guay，在公开于
20 申请 WO93/05819 中讨论的气体，包括其中所述的高“Q”因子气体，也可被使用。Quay，公开申请号为 WO93/05819 的公开全文引本文作参考。另外，顺磁性气体和同位素的气体，如“¹⁷O”，可被使用。人们期望包含这些气体的对比介质也可以与其它诊断技术，如磁共振造影（MRI）一起使用。

25 其它气体，包括上面例举的气体，基于本发明的公开，对于本专业技术人员将是容易明白的。

在某些特别优选的方案中，能变为气体物质的前体被掺入微球体中。这类前体包括能够在体内转化为气体的物质。示例性的前体是室温为液体，对患者施用后，
30 在体内变为气体的物质。优选地，气体前体是与生物相容的，且体内产生的气体也是与生物相容的。合适的气体前体的例子是全氟代烃。如专业人员懂得的，当微球体被首先制造时，特定的全氟代烃可以液态存在，因而被用作气体前体，或全氟代烃可直接用作气体。全氟代烃是否以液体或气体被使用取决于其液 / 气相变温度，或沸点。例如，一个优选的全氟代烃，全氟戊烷，具有 29.5 °C 的液 / 气相变温度和沸点。这意味着全氟戊烷在室温（约 25 °C）将是液体，但在人体内将变为气体，
35 人体正常温度（37 °C）高于全氟戊烷的相变温度或沸点。因此，在正常情况下，

全氟戊烷是气体前体。作为进一步的例子，有全氟代戊烷的同系物，即全氟丁烷和全氟己烷。全氟丁烷的液 / 气转变温度是 4 °C，而全氟己烷的是 57 °C。因而，全氟丁烷潜在地可用作气体前体，虽然更可能作为气体，而仅因为其相对高的沸点全氟己烷仅可用作气体前体。

5

广泛的物质可被用作本发明组合物中的气体前体。只需要该物质在经过适当的温度时可以相变为气相。合适的气体前体包括，例如，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，2,3-丁二烯，1,3-丁二烯，1,2,3-三氟-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，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-1,1,1,4,4,4-六氟丁炔，3-甲基-1-丁炔，全氟-2-丁炔，2-溴丁醛，氧硫化碳，丁烯腈，环丁烷，甲基环丁烷，八氟环丁烷，全氟环丁烯，3-氯环戊烯，全氟环戊烷，八氟环戊烯，环丙烷，全氟环丙烷，1,2-二甲基环丙烷，1,1-二甲基环丙烷，1,2-二甲基环丙烷，乙基环丙烷，甲基环丙烷，二乙炔，3-乙基-3-甲基二氮丙啶，1,1,1-三氟二乙基偶氮，二甲基胺，六氟二甲基胺，二甲基乙基胺，双-(二甲基膦)胺，全氟己烷，全氟庚烷，2,3-二甲基-2-降冰片烷，全氟二甲基胺，氯化二甲基氧，1,3-二氧戊环-2-酮，4-甲基-1,1,1,2-四氟乙烷，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-1,1,2,2,2-五氟乙烷，2-氯-1,1-二氟乙烷，1,1-二氯-2-氟乙烷，1-氯-1,1,2,2-四氟乙烷，2-氯-1,1-二氟乙烷，氟代乙烷，氯戊氟乙烷，二氯三氟乙烷，氟乙烷，六氟乙烷，硝基五氟乙烷，亚硝基五氟乙烷，全氟乙基胺，乙基乙烯基醚，1,1-二氯乙烷，1,1-二氯-1,2-二氟乙烷，1,2-二氟乙烷，甲烷，三氟甲磺酰氟，三氟甲磺酰氟，溴二氟亚硝基甲烷，溴氟代甲烷，溴氯氟代甲烷，溴三氟甲烷，氯二氟硝基甲烷，氯二硝基甲烷，氯氟甲烷，氯三氟甲烷，氯二氟甲烷，二溴二氟甲烷，二氯二氟甲烷，二氯氟甲烷，二氟甲烷，二氟碘甲烷，二甲硅烷基甲烷，氟甲烷，碘甲烷，碘三氟甲烷，硝基三氟甲烷，亚硝基三氟甲烷，四氟甲烷，三氯氟甲烷，三氟甲烷，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，氧化亚氮，1,2,3-十九烷-三羧酸-2-羟基三甲基酯，1-壬烯-3-炔，1,4-戊二烯，正戊烷，全氟戊烷，4-氨基-4-甲基戊-2-酮，1-戊烯，2-戊烯(顺式)，2-戊烯(反式)，3-溴戊-1-烯，全氟戊-1-烯，四氯邻苯二甲酸，2,3,6-三甲基哌啶，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-1-硝基丙烷，七氟-1-亚硝基丙烷，全氟丙烷，丙烯，六氟丙烷，1,1,1,2,3,3-六氟-2,3-二氯丙烷，1-氯丙烷，氯代丙烷-(反式)，2-氯丙烷，3-氟丙烷，丙炔，3,3,3-三氟丙炔，3-氟苯乙烯，十氟化二硫(S₂F₁₀)，2,4-二氨基甲苯，三氟乙腈，三氟甲基过氧化物，三氟甲基硫，六氟化钨，乙烯基乙炔和乙烯基醚。

35

在某些优选的方案中，气体，例如，空气或全氟代烃气体，与液体全氟代烃，如全氟辛基溴（PFOB），全氟萘烷，全氟十二氢萘，全氟辛基碘，全氟三丙基胺，和全氟三丁基胺相结合。

5 如果需要，微球体大小可通过多种工艺，例如包括，微乳化，涡旋，挤压，过滤，超声处理，均化，冷冻和熔融的重复循环，在压力下挤过确定大小的孔，和类似方法来调节。

10 作为脉管内应用，微球体优选具有小于约 30 μm 的直径，更优选地，小于约 12 μm 的直径。对于定向脉管应用，包括，例如，结合到某一组织，如癌组织，微球体可明显地更小，例如，直径小于 100nm。对于肠或胃肠道应用，微球体可明显地较大，例如，最高达微米大小。优选地，微球体大小为具有约 20 μm 至 100 μm 之间的直径。

15 下表列出的是一系列在相对接近或低于人正常体温（37 $^{\circ}\text{C}$ ）下进行液体向气体相变的气体前体。在表中也列出了乳化的微滴的直径大小，它是形成最大规格约 10 μm 的微球体所需要的。

表 1

20 气体前体的物理性质和形成 10 μm 微球体的乳化微滴的直径

化合物	分子量	沸点($^{\circ}\text{C}$)	密度	制造 10 微米微球体的乳 化液滴的直径(μm)
全氟戊烷	288.04	29.5	1.7326	2.9
1-氟丁烷	76.11	32.5	6.7789	1.2
2-甲基丁烷 (异戊烷)	72.15	27.8	0.6201	2.6
2-甲基-1-丁烯	70.13	31.2	0.6504	2.5
2-甲基-2-丁烯	70.13	38.6	0.6623	2.5
1-丁烯-3-炔-2- 甲基	66.10	34.0	0.6801	2.4
3-甲基-1-丁炔	68.12	29.5	0.6660	2.5
八氟环丁烷	200.04	-5.8	1.48	2.8
十氟丁烷	238.04	-2	1.517	3.0
六氟乙烷	138.01	-78.1	1.607	2.7

*来源: Chemical Rubber Company Handbook of Chemistry and Physics Robert C.

Weast and David R. Lide, eds. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. (1989-1990).

通过使用有限溶解性的气体使微球体的应用最佳化是本发明的部分。这里所说的有限溶解性，指气体依靠在其周围含水介质中的溶解性扩散出微球体的能力。在含水介质中较大的溶解性施加梯度给微球体中的气体，使其具有扩散出微球体的倾向。在含水介质中较小的溶解性将减小微球体和界面之间的梯度，使气体向微球体外的扩散被阻止。优选地，捕集在微球体内的气体具有小于氧的溶解性，即在 32 份水中 1 份气体。参见 Matheson Gas Data Book, Matheson Company, Inc. (1966)。更优选地，捕集在微球体内的气体在水中具有低于空气的溶解性；还更优选地，捕集在微球体内的气体在水中具有低于氮气的溶解性。

稳定化化合物

一种或多种稳定化化合物被用于形成微球体，并保证气体或气体前体的连续胶囊化。即使对于相对不溶，非扩散性气体，如全氟丙烷或六氟化硫，当一种或多种稳定化化合物被用于气体和气体前体填充的微球体形成时，也可得到改进的微球体制剂。这些化合物在其大小，形状和 / 或其它性质方面保持微球体的稳定性和完整性。

广泛的稳定化化合物可被用于本发明的对比介质。当与气体和 / 或气体前体结合时，稳定化化合物可促进微球体的形成，并改进其稳定性。本发明的稳定化化合物基本上阻止由测量在使用的时间内微球体结构或囊括的气体或气体前体得知的降解。典型地，微球体可以在正常环境条件下在至少约两或三周的时间保持其原有结构的 90% 体积，尽管优选地此周期至少约一个月，更优选地，至少约两个月，还更优选地，至少约六个月，更更优选地，约一年，还更优选地约三年。因而，本发明的微球体即使在不利条件下，包括升高的温度和压力下具有长的贮存寿命。

本发明微球体的稳定性至少部分地归因于制造微球体的材料，经常不需要使用额外的稳定化添加剂，尽管这样作是非强制性的，有时是优选的。这类附加的稳定化剂和其特征在下面解释得更详细。

在优选的方案中，稳定化化合物包含与生物相容的类脂化合物和 / 或聚合的化合物，类脂是优选的。优选地、类脂或聚合物是惰性的。因为配制容易，包括在施用之前产生微球体的能力，微球体可被容易地定点制造。

与生物相容的类脂

广泛的生物相容的类脂可被用作稳定化化合物。合适的类脂包括，例如，溶血类脂，磷脂，如包括二油酰基磷脂酰胆碱，二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱，二（十五烷酰基）磷脂酰胆碱，二月桂酰基磷脂酰胆碱，二棕榈酰基磷脂酰胆碱（ DPPC ）和二硬脂酰基磷脂酰胆碱（ DSPC ）的具有饱和和不饱和类脂的磷脂酰胆碱；磷脂酰乙醇胺，如二油酰基磷脂酰乙醇胺，二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺和二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺；磷脂酰丝氨酸；磷脂酰甘油；磷脂酰肌醇；鞘脂类，如鞘磷脂；糖脂，如神经节苷脂 GM1 和 GM2 ；糖脂；硫苷脂；糖鞘脂；磷脂酸；棕榈酸；硬脂酸；花生四烯酸；油酸；带有聚合物的类脂，所述聚合物包括诸如聚乙二醇，几丁质，透明质酸或聚乙烯基吡咯烷酮；带有磺化的单糖，二糖，寡糖或多糖的类脂；胆甾醇和半琥珀酸胆甾醇酯；生育酚和半琥珀酸生育酚酯；带有醚和酯连接的脂肪酸的类脂；聚合的类脂；磷酸二乙酰基酯；磷酸联十六烷基酯；硬脂酰胺；心磷脂；带短链脂肪酸（ C₆ 至 C₈ ）的磷脂；带有不对称酰基链，例如，第一个为 C₆ 酰基链和第二个为 C₁₂ 酰基链的合成磷脂；神经酰胺；聚氧乙烯脂肪酸酯，聚氧乙烯脂肪醇，聚氧乙烯脂肪醇醚，聚氧乙基化的山梨醇脂肪酸酯，烃基硬脂酸甘油聚乙二醇酯，甘油聚乙二醇蓖麻酸酯，甾醇，乙氧基化的大豆甾醇，乙氧基化的蓖麻油，聚氧乙烯-聚氧丙烯聚合物，和聚氧乙烯脂肪酸硬脂酸酯；甾醇脂肪酸酯包括硫酸胆甾醇酯，丁酸胆甾醇酯，异丁酸胆甾醇酯，棕榈酸胆甾醇酯，硬脂酸胆甾醇酯，乙酸羊毛甾醇酯，棕榈酸麦角甾醇酯和正丁酸植物甾醇酯；糖酸的甾醇酯包括葡糖苷酸胆甾醇酯，葡糖苷酸羊毛甾醇酯，葡糖苷酸 7-脱氢胆甾醇酯，葡糖苷麦角甾醇酯，葡糖酸胆甾醇酯，葡糖酸羊毛甾醇酯，和葡糖酸麦角甾醇酯；糖酸和醇的酯包括葡糖苷酸月桂酯，葡糖苷酸硬脂酰酯，肉葡糖苷豆蔻酰基酯，葡糖酸月桂酯，葡糖酸肉豆蔻酰酯，和葡糖酸硬脂酰酯；糖和脂肪酸的酯包括月桂酸蔗糖酯，月桂酸果糖酯，棕榈酸蔗糖酯，硬脂酸蔗糖酯，葡糖醛酸，葡糖酸， accharic acid, 多糖醛酸；皂草苷，包括萨洒皂草配基，菝葜配基，常春藤苷配基，石竹素，和毛地黄毒苷配基；二月桂酸甘油酯，三月桂酸甘油酯，二棕榈酸甘油酯，甘油和甘油酯，包括三棕榈酸甘油酯，二硬脂酸甘油酯，三硬脂酸甘油酯，二肉豆蔻酸甘油酯，三肉豆蔻酸甘油酯；长链醇，例如，约 10 至约 30 个碳原子，包括正癸醇，月桂基醇，肉豆蔻基醇，鲸蜡醇，和正十八烷基醇；磷酸烷基酯，次磷酸烷基酯和亚磷酸烷基酯； 6-(5-胆甾烯-3 β-基氧基)-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷；二半乳糖基-二甘油苷； 6-(5-胆甾烯-3 β-基氧基)己基-6-氨基-6-脱氧-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷； 6-(5-胆甾烯-3 β-基氧基)己基-6-氨基-6-脱氧-1-硫代-α-D-吡喃甘露糖苷； 12-(((7'-二乙基氨基香豆素-3-基)羰基)甲基氨基)十八烷酸； N-[12-(((7'-二乙基氨基香豆素-3-基)羰基)甲基氨基)十八烷酰基]-2-氨基棕榈酸；胆甾(4'-三甲基铵基)丁酸酯； N-琥珀酰基二油酰基磷脂酰乙醇胺； 1,2-二油酰基-sn-甘油； 1,2-二棕榈酰基-sn-3-琥珀酰基甘油； 1,3-二棕榈酰基-2-琥珀酰基甘油； 1-十六烷基-2-棕榈酰基甘油磷酸乙

醇胺；和棕榈酰基高半胱氨酸。

合适的类脂化合物也包括典型地用于制造混合的胶束系统的类脂，如月桂基三甲基铵溴化物；鲸蜡基三甲基铵溴化物；肉豆蔻基三甲基铵溴化物；烷基二甲基苄基铵氯化物（其中烷基是，例如， C_{12} ， C_{14} 或 C_{16} ）；苄基二甲基十二烷基铵溴/氯化物；苄基二甲基十六烷基铵溴/氯化物；苄基二甲基十四烷基铵溴/氯化物；鲸蜡基二甲基乙基铵溴/氯化物；和鲸蜡基吡啶 溴/氯化物。

用于本发明组合物的合适类脂也包括带净电荷的类脂，例如，阴离子和/或阳离子类脂。例子性的阳离子类脂包括，例如，N-[1-(2,3-二油酰氧基)丙基]-N,N,N-三甲基铵氯化物(DOTMA)；1,2-二油酰氧基-3-(三甲基铵基)丙烷(DOTAP)；1,2-二油酰基-c-(4'-三甲基铵基)丁酰基-sn-甘油(DOTB)；和带阳离子的聚合物的类脂、如聚赖氨酸和聚精氨酸。一般地，阳离子类脂与非阳离子型类脂在微球体中的摩尔比可为，例如，1:1000，1:100，优选地，在2:1至1:10之间，更优选地在1:1至1:2.5之间的范围，而最优选地为1:1(摩尔量的阳离子类脂与摩尔量的非阳离子类脂，例如，DPPC的比例)。当阳离子类脂被用于构建微球体时，广泛的类脂可包含非阳离子类脂。优选地，此非阳离子类脂是二棕榈酰基磷脂酰胆碱，二棕榈酰式磷脂酰乙醇胺或二油酰基磷脂酰乙醇胺。作为如上所述的阳离子类脂的替代，带有阳离子的聚合物，如聚赖氨酸或聚精氨酸，以及磷酸烷基酯，次磷酸烷基酯，和亚磷酸烷基酯也可被用于构建微球体。

已经惊奇地且出乎意料地发现，微球体的稳定性可以通过掺入少量的，例如，占总类脂的约1至10摩尔百分数的负电荷的类脂而得到实质性的改进。人们相信负电荷类脂通过降低微球体的由于融合在一起而爆裂的趋势而增强稳定性。人们相信通过由微球体外表面的负电荷类脂形成负电荷层至少部分地实现这一点。负电荷微球体然后被其它，相似的负电荷微球体排斥。这种排斥防止了典型地导致微球体壁爆裂的微球体间接触和接触的微球体合并为更大的微球体。

合适的负电荷类脂包括，例如，含游离羧基的(CO_2^-)类脂，如磷脂酰丝氨酸，磷脂酸，如二棕榈酰基磷脂酸，和脂肪酸。在某些优选的方案中，类脂包含占总量约0.5至约30摩尔百分数的二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺和磷脂酸。在某些其它优选方案中，类脂包含占约70至100摩尔百分数量的二棕榈酰基磷脂酰胆碱和二硬脂酰基磷脂酰胆碱。

如上说明的，理想地，在某些方案中，包括作为稳定化化合物的带聚合物的类脂。优选地，聚合物共价键连在类脂上并具有约400至约100,000的分子量。例子

性的聚合物包括亲水聚合物，如聚（乙二醇）（PEG），聚（乙烯基吡咯烷），polyoxomers 和聚山梨酸酯和聚（乙烯醇）。PEG 聚合物中优选的是 PEG 2000，PEG 5000 和 PEG 8000，分别具有 2000，5000 和 8000 的分子量。其它合适的聚合物，亲水的和其它的，基于本公开、对本专业熟练技术人员是显然的。可以由与类脂的烷基化或酰化反应被掺入的聚合物对于改进类脂组合物的稳定性特别有用。带有亲水聚合物的例子性类脂包括，例如，二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺-PEG，二油酰基磷脂酰乙醇胺-PEG 和二硬脂基磷脂酰乙醇胺-PEG。

除上面讨论的类脂化合物之外，或代替它们，本发明的类脂组合物可包含脂族羧酸，例如，脂肪酸。优选的脂肪酸包括在脂族基中含约 5 至 22 个碳原子的那些。脂族基可以是直链或支链的。例子性的饱和脂肪酸包括，例如，（异）月桂酸，（异）肉豆蔻酸，（异）棕榈酸和（异）硬脂酸。例子性的不饱和脂肪酸包括，例如，月桂烯酸，抹香鲸酸，肉豆蔻烯酸，棕榈烯酸，岩芹酸，和油酸。合适的脂肪酸也包括，例如，其中脂族基是类异戊二烯或异戊二烯基的脂肪酸。另外，带聚合物的碳水化合物可被用作本发明的类脂组合物。带类脂的碳水化合物被描述于，例如，US4,310,505 中，该文献全文引作本文参考。

优选的类脂是磷脂，包括 DPPC、DPPE, DPPA 和 DSPC，而 DPPC 是优选的。

除上面例举的外，其它用于本发明组合物的类脂化合物将由于本公开而显而易见。优选地，选择类脂以最佳化组合物的某些需要的性质，包括稳定性和半衰期。基于本公开，除了上面例举的类脂外，在本发明组合物的制备中，合适类脂的选择对于本专业熟练技术人员将是显而易见的，并且不需实验就能实现。

如下面详细讨论的，许多方法可用于制备微球体，包括，例如，摇动，干燥，气体装入，喷雾干燥等等。优选地，微球体从保持凝胶状态的类脂制备，这是类脂双层从凝胶态转化为液晶态的温度。参见，例如，Chapman 等人，J. Biol. Chem. 1974, 249, 2512-2521，该文献全文引作本文参考。下表列出了代表性类脂及其相变温度。

30

表 2 饱和的二酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱：主链相变温度

酰基链中的碳	相变温度 °C
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

参见，例如， Derek Marsh, CRC Handbook of Lipid Bilayers, p. 139(CRC Press, Boca Raton, FL 1990).

- 5 用于形成微球体的类脂材料或其它稳定化合物还优选地是柔韧性的，这意味着，在气体和气体前体填充的微球体的前后文中，变化其形状，例如，为了穿过一个具有比微球体小的尺寸的开口的结构能力。

生物相容聚合物

- 10 正如前面提到的，稳定化合物也含有生物相容聚合物。聚合物可以是天然的、半合成的或合成的。典型的天然聚合物包括，例如，多糖类，如阿拉伯聚糖，果聚糖，岩藻聚糖，半乳聚糖，葡聚糖，甘露聚糖，木聚糖（例如，菊粉），左聚糖，岩藻依聚糖，角叉菜聚糖，半乳昔醇糖，果胶酸，直链淀粉，糖原，支链淀粉，纤维
- 15 纤维素，葡聚糖，石脐素，几丁质，琼脂糖，角蛋白，软骨素聚糖（chondroitin），皮肤素，透明质酸，藻酸，黄原胶，淀粉及各种其它含有一个或多个下列醛式糖，酮式糖，酸或胺的均聚物或杂聚物：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、古洛糖、艾杜糖、半乳糖、塔罗糖、赤藓酮糖、核酮糖、木酮糖、阿洛酮糖、果糖、山梨糖、塔格糖、甘露糖醇、山梨糖醇、
- 20 乳糖、蔗糖、海藻糖、麦芽糖、纤维二糖、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、葡萄糖醛酸、葡糖酸、葡糖二酸、甘露糖醛酸、葡糖胺、半乳糖胺、神经氨酸及其天然衍生物。

- 25 典型的半合成聚合物包括羧甲基纤维素，羟甲基纤维素，羟丙甲基纤维素，甲基纤维素和甲氧基纤维素。

典型的合成聚合物包括聚乙烯类，例如聚乙二醇，聚氧乙烯及聚对苯二甲酸乙二醇酯，聚丙烯类，例如聚丙烯，聚氨酯类，例如，聚乙烯醇（PVA），聚氯乙烯及聚乙烯吡咯烷酮，聚酰胺，例如尼龙，聚苯乙烯，聚乳酸，氟代烃类，例如聚四氟乙烯，聚异丁烯酸甲酯及其衍生物。聚合物基质的微球体的制备方法对本领域普通技术人员而言，一旦知晓本发明的公开，再结合已知技术（如 Unger 在美国专利 5205290 中公开的信息）则是很容易的，本发明的公开与此处引用的现有技术共同构成了一个整体作为参考。

优选地，聚合物具有相对较高的亲水性。当使用时，例如在 GI 区，聚合物具有较高的亲水性而能结合大量的游离水。这能使聚合物携带大量的液体通过 GI 道，从而充满和扩张该道。充满和扩张了的 GI 道可增强该区域的 CT 造影。

此外，当需要 GI 区域造影时，优选的是聚合物不在 GI 区域中充分降解，也不被吸收。这样，在 GI 道中的代谢和吸收被优选地降至最小从而避免对比剂的去除。这也避免了在 GI 道中因降解产生的气体的形成。对于 GI 区域造影，优选的聚合物是能够排除空气并能将在对比介质中较大气泡的形成降至最小。

本发明特别优选的实施方案包括微球体，其中形成稳定化的气体和气体前体填充的微球体的稳定化化合物包括三种成分：(1)中性类脂，例如，非离子或两性离子类脂，(2)负电荷类脂，及(3)承载亲水性聚合物的类脂。优选地，带负电荷的类脂的数量要大于所含总类脂量的百分之一摩尔，并且承载亲水性聚合物的类脂的量也要多于总类脂量的百分之一摩尔。带负电荷的类脂为磷脂酸同样也是优选的。所需承载亲水性聚合物的类脂是与聚合物以共价键相连的类脂并且聚合物优选平均分子量为 400 至 100000。优选的亲水性聚合物选自聚乙二醇（PEG），聚丙烯醇，聚乙烯醇，和聚乙烯吡咯烷酮及其共聚物。PEG 或其它聚合物可以通过共价键，例如酰胺，氨基甲酸酯，及胺与类脂相连，如 EPPD。或者，酯、醚、硫酯、硫代酰胺或二硫化物（硫代酯）链也可用于 PEG 或其它聚合物的连接，例如，胆甾醇或其它磷脂。当亲水性聚合物是 PEG 时，承载该聚合物的类脂可称之为“PEG 化的”（PEGylated）。承载亲水性聚合物的脂优选为二棕榈酰磷脂酰乙醇胺-PEG5000(DPPE-PEG5000)，这是指二棕榈酰磷脂酰乙醇胺类脂上连接有平均分子量为 5000 的 PEG 聚合物。

本发明优选的实施方案包括含有，例如约 77.5%摩尔的二棕榈酰磷脂酰脂碱(DPPC)，12.5%摩尔的二棕榈酰磷脂酸(DPPA)和 10%摩尔的二棕榈酰磷脂酰乙醇胺-PEG5000 的微球体。对于该组合物，摩尔为 82:10:8 为优选。DPPC 成分为两性离子因而为中性，因为磷脂酰部分带负电荷而胆碱部分带正电荷。根据前面所述

关于带负电荷类脂的作用机制，带负电荷的 DPPA 成分的加入可增强稳定性。第三个成分， DPPE-PEG5000，提供了通过 DPPE 部分与类脂膜或微球体表面相连的材料，由于 PEG 部分在微球体膜上或表面是游离的，因此形成了对在体内降解这类外部物质的各种酶和其它内源性物质的物理屏障。由此可以推理 PEG 化的物质可消除人类免疫系统中从另一方面包围和消除外部物质的巨噬细胞的作用。结果导致稳定的微球体在体内存在时间的增加，从而可用作 CT 对比剂。

辅助稳定化合物

除前面所述的用生物相容脂和聚合物之外的材料制备稳定气体和气体前体填充的微球体也同样构成了本发明的一部分，条件是这些微球体满足稳定性和此中的其它标准。这些原料是基本的和基础的，因而能形成产生和建立用于填充微球体的稳定气体和气体前体的主要基础。另一方面，它们可以是辅助的，因此起次要或补充作用，既可以增强基本的稳定化合物或化合物的作用，又可以起除基本稳定化合物所起作用之外的其它所需作用。

然而，可以设想我们很难确定一个具体化合物是基础物还是辅助试剂，因为化合物的功能通常是根据经验确定的，或通过产生的稳定微球体的结果来确定的。例如，将生物相容类脂和水或盐水通过振摇而简单地混合，将所得云状溶液再经蒸煮消毒。该云状溶液可用作对比剂，但这并不美观并且意味着由于形成了不溶的或不分散的类脂颗粒而导致了不稳定性。因此，可加入聚乙二醇促进类脂颗粒的分散和溶解从而消除云状物。聚乙二醇可用作增稠剂从而促进微球体的形成并通过增加微球体膜或表面的表面张力而起稳定作用。聚乙二醇可进一步用作包在微球体膜或表面上的附加层，从而起到额外的稳定化作用。

根据本发明公开的内容，用基本材料和辅助材料制备稳定的微球体对本领域普通技术人员来说是显而易见的。这些材料包括常规的表面活性剂如在 D'Arrigo 在美国专利 4684479 和 5215680 中公开的材料，此公开内容，在此作为整体来参考。

附加辅助化合物和基础稳定化合物包括油，例如，花生油， canola 油，橄榄油，红花油，玉米油，或其它常用的可食用油。其它的辅助和基础化合物是海藻糖。

本发明中使用的气体和气体前体填充的微球体可以通过选择各种这里所述的附加的或辅助的稳定剂，根据其大小、溶解性和热稳定性进行控制。这些试剂不仅可通过与类脂包衣的物理作用，而且可通过改善气体和气体填充的微球体表面的粘性和表面张力来影响微球体的这些参数。因此，气体和气体填充的微球体可以进行更

好地改进和进一步稳定化，例如，通过加入粘度改良剂，如碳水化合物或其磷酸化和硫酸化衍生物，聚醚，包括含有分子量从约 400 至约 100000 的二或三羟基烷烃及其分子量为 200 至 50000 的聚合物；乳化剂和 / 或溶解剂，包括，如阿拉伯胶，胆甾醇，二乙醇胺、单硬脂酸甘醇酯，羊毛脂醇，卵磷脂，单一和二甘油酯，单乙醇胺，油酸，油醇， poloxamer，硬脂酸聚氧乙烯 50 酯，聚氧 35 蓖麻油，聚氧 10 油醚，聚氧 20 鲸蜡十八烷醚，硬脂酸聚氧 40 酯，聚山梨酸酯 20，聚山梨酸酯 40，聚山梨酸酯 60，聚山梨酸酯 80，二乙酸丙二醇酯，单硬脂酸丙二醇酯，月桂酰硫酸钠，硬脂酸钠，单月桂酸脱水山梨醇酯，单油酸脱水山梨醇酯，单棕榈酸脱水山梨醇酯，硬脂酸，三乙醇胺，和乳化蜡；悬浮和 / 或粘性增强剂，包括，例如琼脂，藻酸、单硬脂酸铝，皂土，糖糊， carbomer 934P，羧甲基纤维素，钙，钠和钠 12，角叉菜胶，纤维素，葡聚糖，明胶，爪耳胶，刺槐豆胶，硅酸镁铝，羟乙基纤维素，羟丙甲基纤维素，硅酸镁铝，甲基纤维素，果胶，聚乙烯氧化物，聚乙烯吡咯烷酮，藻酸丙二醇酯，二氧化硅，藻酸钠，黄耆胶，黄原胶， α -D-葡萄糖酸内酯，甘油和甘露醇；合成悬浮剂，包括，例如聚乙二醇（PEG），聚乙烯吡咯烷酮（PVP），聚乙醇醇（PVA），聚丙二醇和聚山梨酸酯；能够提高组合物强度的材料包括，例如山梨醇，丙二醇和甘油。

含水稀释剂

正如前面提到的，微球体本质上是类脂，稳定的微球体的一个特别需要的成分是其某种含水环境，该环境可诱导类脂因其疏水性 / 亲水性特性而形成微球体，且该微球体在这种环境中具有非常稳定的构象。这种稀释剂可用于产生水性环境包括，但却不仅限于，去离子或者含有任何数量的溶解盐但并不干扰稳定的微球体的形成和保持或将其用作 CT 剂的水，以及标准盐水和生理盐水。

25

制备方法

用于本发明的稳定的气体和气体前体填充的微球体可以通过许多适当的方法制备。下面将分别叙述气体填充的微球体，气体前体填充的微球体和气体和气体前体填充的微球体。

30

用气体制备的方法

优选的实施方案包括在气体存在下，在低于类脂的凝胶向液晶相转移温度下搅拌含稳定化合物（优选为类脂）的水溶液从而形成气体填充的微球体的步骤。这里所用术语搅拌及其变化，是指任何振荡水溶液从而使气体从局部环境中产生并进入

35

水溶液的运动。振荡必须用力以形成微球体，特别是稳定的微球体。振荡可以通过回荡，如涡旋，左右运动，或上下运动。不同的运动可以进行组合。振摇可以通过摇动含有含水类脂溶液的容器，或通过振摇容器中的水溶液而不振摇容器本身。

5 而且，振摇可以手动也可以机械搅拌。可以使用的机械搅拌器，包括，例如搅拌台如 VWR Scientific (Cerritos, (CA)搅拌台，或者 Wig-L-Bug Shaker (来自 Dental Mfg. Ltd. Lyons, Ill)，用该搅拌器可获非常好的效果。本发明的优选方案是用某些搅拌或涡流方式制备在优选尺寸范围内的稳定微球体。优选用 Wig-L-Bug 机械搅
10 拌器的搅拌。根据该优选方法，使用往复式运动产生气体和气体前体填充的微球体是优选的。进一步优选的是能够往复式地形成弧线的运动。更优选的是能够往复式地形成约 2° 至约 20° ，进一步优选为约 5° 至 8° 的弧线的运动。最优选的是能够往复式产生约 6° 至约 7° ，特别是 6.5° 的弧线运动。可以设想往复速率和其弧线一样，在确定气体填充的微球体形成的数量和大小是特别重要的。优选地，往复式圆周振荡的数量，是每分钟约 1000 至 20000 次。更优选的是每分钟约 5000
15 至约 8000 次。上述的 Wig-L-Bug，是可以提供每 10 秒钟 2000 杵的振荡，即每分钟 6000 次振荡的机械搅拌器。当然，振荡的数量取决于所搅拌的内容物的质量，质量越大，振荡的次数越低。另一种产生振荡的方法是通过高速或高压下释放气体的运动来实现。

20 可以理解优选增大水溶液的量，从而使力的总量相应增加。强力振荡定义为每分钟至少约 60 次振荡运动，并且是优选的。涡流在约每分钟 60 至 300 转是更优选的，甚至更优选涡流在每分钟约 300 至 1800 转。

气体填充的微球体在振荡下的形成可以目视检测。形成所需稳定微球体水平所
25 需的类脂的浓度根据所用类脂的类型有很大变化，这完全可以通过常规实验确定。例如，在优选方案中，根据本发明方法用于形成稳定微球体的 1,2-二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC) 的浓度约为 0.1mg/ml 到约 30mg/ml 盐溶液，更优选的是约 0.5mg/ml 至 20mg/ml 盐溶液，甚至更优选的是 1mg/ml 至 10mg/ml 盐溶液。优选方案中使用二硬脂酸磷脂酰胆碱 (DSPC) 的浓度为约 0.1mg/ml 至约 30mg/ml 盐溶液，更优
30 选的是约 0.5mg/ml 至约 20mg/ml 盐溶液，甚至更优选的是约 1mg/ml 至约 10mg/ml 盐溶液。

除上述的简单振荡方法之外，也可以使用复杂的方法。这些复杂方法包括，例如，液晶振荡气体灌输法和真空干燥气体灌输法，还有共待审的美国申请
35 08/076250(1993 年 6 月 11 日申请)中描述的方法，在此作为整体引作参考。当使用这些方法时，将气体填充的稳定微球体在用任何一种常规脂质体制备技术的气体灌

输之前制备，这对于本领域普通技术人员而言是显而易见的。这些技术包括冷冻-熔化，以及声处理法，整合渗析，均化，溶剂浸渍，微乳化，自发成形，溶剂蒸发，French 加压细胞技术，控制洗涤渗析，及其它技术，每种技术均包括制备不同形式的微球体。参见 Maddem 等, *Chemistry and Physics of Lipids*, 1990 53, 37-46, 此公开在此作为一个整体结合参考。

根据上述方法制备的用于气体填充的微球体的大小从低于 1 微米至 100 μm 。此外，值得注意的是在挤压和消毒步骤之后，搅拌或振荡步骤产生气体填充的微球体和气体前体的同时，在溶液剩余物中基本上没有或极少残留有无水类脂相。

10 (Bangham, A.D., Standish, M.M, & Watkins, J.C.(1965)*J. Mol. Biol.* Vol 13, pp. 238-252(1965)。残留的气体填充的微球体在室温下 1 年内或更长时间内保持稳定的含量。

气体填充的微球体的大小可以根据需要通过各种方法调节，这些方法包括微乳

15 化，涡旋，挤压，过滤，声处理处，均化，反复冷冻及熔化循环，通过所需尺寸的气孔在加压下挤出，或类似方法。理想的是在形形成时，使用本发明的微球体，而其大小不需要进一步的改变。

用于气体填充的微球体可以通过过滤器挤出的简单方法筛分。过滤器孔径的大小控制着气体填充的微球体的尺寸分布。通过使用两个或多个串联的或层叠的过滤器组设置，如一个 10 μm 过滤器接一个 8 μm 过滤器，所得的用于气体填充的微球体将有一个约 7 至 9 μm 很窄的尺寸分布。过滤后，这些稳定的气体填充的微球体将保持稳定超过 24 小时。

当使用前将悬浮液从无菌管形瓶中除去时，用过滤器系列完成成形和过滤步骤，或优选地，过滤器装配将在其使用过程中组合进注射器。微球体的筛分包括使用一个包括针筒，至少一个过滤器和一个针头的注射器；并将通过包含从所述针筒通过安装于所述注射器的针筒与针之间的过滤器挤压所述微球体的萃取步骤而完成，藉此使所述微球体在根据本发明用微球体做 CT 对比剂时给患者服用之前而筛

25 分。该萃取步骤包括将所述微球体抽进所述注射器中，而过滤器将以同样的方式使微球体在进入注射器时筛分。另一种方法是用已经通过其它方法筛分的微球体填充于注射器中，在这种情况下，过滤器的作用是确保仅在所需尺寸范围，或所需最大尺寸

30 的微球体随后从注射器中被挤出供给用。

在优选的实施方案中，微球体中的溶液或悬浮液在振摇之前要通过过滤器挤出并加热消毒。气体填充的微球体一旦形成，它们就可以按上述方法过滤筛分。这些

步骤在用于气体填充的微球体和产物气形成之前进行比较有利，例如，可以减少未水合稳定化合物的数量，从而显著地提高气体填充的微球体的产率，同样也得到供患者使用的消毒的气体填充的微球体。例如，用过滤的稳定化合物，特别是类脂悬浮液填充混合容器如管形瓶或注射器中，然后将悬浮液在混合容器中消毒，例如
5 蒸煮消除。可将气体灌输入类脂悬浮液中，通过振摇消毒容器而形成气体填充的微球体。优选地，在消毒容器上安装一个过滤器，以使气体填充的微球体在接触患者之前通过过滤器。

10 优选方法的第一步，是通过过滤器挤出稳定化合物溶液，通过分散干燥化合物来减少非水合化合物的数量，从而暴露更多的表面积用于水合作用。优选地，过滤器孔径的大小为约 0.1 至约 5 μm ，更优选约 0.1 至约 4 μm ，甚至更优选约 0.1 至 2 μm ，最优选 1 μm 。非水合化合物，特别是类脂，出现为没有均匀尺寸的无定形块是不符合要求的。

15 第二步，消毒，提供可供患者使用的 CT 造影的组合物。优选的消毒方法为加热消毒，优选地，是在至少约 100 $^{\circ}\text{C}$ 蒸煮溶液，更优选的是在约 100 $^{\circ}\text{C}$ 至约 130 $^{\circ}\text{C}$ ，甚至更优选的是约 110 $^{\circ}\text{C}$ 至约 130 $^{\circ}\text{C}$ ，还优选的是约 120 $^{\circ}\text{C}$ 至约 130 $^{\circ}\text{C}$ ，最优选约 130 $^{\circ}\text{C}$ 。优选地，至少加热约 1 分钟，更优选的是约 1 至约 30 分钟，甚至更优选的是约 10 至约 20 分钟，还优选约 15 分钟。

20

如果需要，可将上述的第一步和第二步颠倒进行，或仅用两步中的一步。

25 当消毒不是在一定温度下加热而可能使气体填充的微球体破裂的方法时，则优选在消毒后形成气体填充的微球体。例如， γ 射线辐射可用于气体填充的微球体形成之前和 / 或之后。

用气体前体制备的方法

30 除了前面提到的方案之外，还可用包含在微球体中的气体前体，通过如温度、光、或 pH、或其它给用的宿主的组织特性而激活，经过从残存于微球体中的液态到气态的相转移而，膨胀产生本发明稳定的气体填充的微球体。这些技术详细地描述在共同待审查中的专利申请 08/160 232(1993 年 11 月 30 日申请)和 08/159 687(1993 年 11 月 30 日申请)，两者在此结合为一整体引为参考。

35 优选的激活气体前体的方法是通过暴露于高温中。激活或转移温度，或类似术语，是指气体前体的沸点即在此温度下气体前体发生由液相向气相的转移。有用的

气体前体是指沸点范围为约-100 °C至 70 °C的材料。每一种气体前体都有一个特定的激活温度。激活温度为约 37 °C，或约人体温度是本发明优选的气体前体。这样，在优选形式中，液态气体前体在约 37 °C被激活变成气体。而且，在本发明方法中气体前体可以用其液相或气相。

5

本发明中制备 CT 造影对比剂的方法是在低于气体前体沸点的温度下进行以便液体可混合入微球体中。此外，该方法也可在气体前体的沸点下完成以便气体可以混合入微球体中。对于具有低温度沸点的气体前体，液体前体可以通过微观流体仪冷至低温而乳化。沸点也可以用溶剂的液介质中利用液态形成前体而降低。而且，
10 在整个过程中增加温度，这些方法也可进行，由此，本方法开始时，气体前体为液体，而结束时则为气体。

气体前体可以选择便于在进入患者或动物体内，使用前，储存中或制造过程中在靶组织中现场形成气体或流体。产生温度-激活气体前体-填充的微球体的方法可以在低于气体前体沸点的温度下进行。在该实施方案中，气体前体截留于微球体中以致在生产过程中不发生相转移。相反，气体前体填充的微球体是在气体前体的液相下生产的。只要温度超过气体前体的沸点则在任何时间内均可发生相转移激活作用。当然，知道了液体气体前体液滴的数量，便可确定达到气态的微球体的尺寸。

或者，气体前体可用于产生在使用前先形成的稳定气体填充的微球体。在此实施方案中，在各个气体前体的液相-气相转移温度下将气体前体加入到装有悬浮和 / 或稳定介质的容器中。然后升高温度，在气体前体和液态溶液之间形成一个乳状态液，气体前体经过液态向气态的转移。加热的结果便形成了气体，该气体置换了液体悬浮液上面热空间中的空气以便形成截留有产物气体，环境气体（即空气），
25 或共截留有气体前体气体和环境空气的气体填充球。这种相转移可以用依 CT 造影对比介质的最适宜的混合和稳定化。例如，气体前体，全氟丁烷，可以截留在生物相容稳定化合物中，当温度升高，超过 4 °C（全氟丁烷的沸点），则全氟丁烷气体将存在于微球体中，另外一个实例是将气体前体全氟丁烷悬浮在一个含有乳化剂和稳定剂（例如甘油或丙二醇）的水悬浮液中，并在商购的旋转器上涡旋。涡旋开始时的温度要足够低以便气体前体保持液体并继续搅拌至样品温度升高过由液态向
30 气态转移的温度。这样，前体在微乳化过程中转化为气态。在适宜的稳定剂存在下，稳定的气体微球体便形成了。

因此，气体前体在体内可以被选择形成气体-填充微球体或可以被设计为在原地
35 产生气体-填充微球体，这些过程是在生产过程中，储存中或使用前完成。

作为本发明进一步的实施方案，通过在液态预形成气体前体而成水乳液，一旦转移为气态是有效的，则微泡的最大尺寸就可用理想气体定律来计算。为了从气体前体制备气体填充微球体，假设在新形成的微球体中瞬间形成或基本上没有气体的气相由于分散到本质上为水溶液的液体中而被耗尽。因此，从已知的乳液中的液体数量我们可以预计气体填充微球体的上限尺寸。

根据本发明，稳定化合物如类脂和气体前体的乳液所含有的限定尺寸的液滴可以用公式计算，这样在达到一个特定温度（气体前体的沸点）后，液滴便膨胀形成限定尺寸的气体填充微球体。限定尺寸代表一个精确的上限尺寸因为如气体扩散到溶液中，气体在空气中的损失，以及增加压力的等因素是不能用理想气体定律计算的。

计算由液态向气态转移的气泡体积的增加的理想气体定律和方程如下：

$$PV=nRT$$

其中

P=大气压

V=用升表示的体积

n=气体的摩尔数

T=用° K 表示的温度

R=理想气体常数=22.4L 大气压度⁻¹ 摩尔⁻¹

根据液体乳液中液体的体积、密度和温度，可以计算液体前体的数量（即摩尔数）和液体前体的体积，当转化为气体时，则膨胀成已知体积的微球体。计算出的体积则反映了气体填充微球体的上限尺寸，假设膨胀成气体填充微球体是瞬时进行的并且在膨胀时可忽略气体的扩散。

因此，对于乳液中液态前体的稳定化作用，其中前体的液体为球形的，前体液滴的体积可以通过如下方程确定：

$$\text{体积（球体）} = \frac{4}{3} \pi r^3$$

其中

r=球的半径

这样，一旦计算出体积，并知道液体在所需温度下的密度后，液滴中的液体（气体前体）的数量便可确定了。在进一步的叙述术语中，将使用下面的公式：

$$V_{\text{气体}} = 4/3 \pi (r_{\text{气体}})^3$$

5 根据理想气体定律，

$$PV = nRT$$

换算为，

$$V_{\text{气体}} = nRT/P_{\text{气体}}$$

10

或

$$(A) \quad n = 4/3 [\pi r_{\text{气体}}^3] P/RT$$

$$\text{量 } n = 4/3 [\pi r_{\text{气体}}^3 P/RT] \cdot MWn$$

15

转换为液体体积

$$(B) \quad V_{\text{液体}} = [4/3 [\pi r_{\text{气体}}^3 P/RT] \cdot MWn/D]$$

计算出液滴直径，其中 $D = \text{前体的密度}$

$$20 \quad (C) \quad \text{直径}/2 = [4/3 \pi [4/3 \cdot \pi r_{\text{气体}}^3] P/RT] \cdot MWn/D]^{1/3}$$

由此推导出

$$\text{直径} = 2[r_{\text{气体}}^3] P/RT [MWn/D]^{1/3}$$

25 本发明中用于制备所需尺寸的作用 CT 造影对比剂的微球体的进一步的方法，是在知道了稳定化合物 / 前体液滴的体积和具体的半径，我们可以用适宜尺寸的过滤器将气体前体液滴筛分得到适宜直径的球体。

30 典型的气体前体可用于形成限定尺寸（例如直径为 $10 \mu\text{m}$ ）的微球体。在这个实例中，微球体在人体血流中形成，这种典型的温度将是 37°C 或 310K 。在 1 个大气压下用方程式（A）， 7.54×10^{-17} 摩尔的气体前体将填满直径为 $10 \mu\text{m}$ 的微球体中。

35 用上述（公式）计算气体前体的量，则分子量为 76.11，沸点为 32.5°C 并且 20°C 时密度为 0.7789g/ml 的 1-氟丁烷，为了得到 $10 \mu\text{m}$ 的微球体进一步计算该气体前体为 5.74×10^{-15} 克。进一步外推，结合密度，方程式(B)进一步计算出要形成上

限值为 $10 \mu\text{m}$ 的微球体需要液体前体 $8.47 \times 10^{-16}\text{ml}$.

最后, 用方程式(C), 具有半径为 $0.0272 \mu\text{m}$ 或相应的直径为 $0.0544 \mu\text{m}$ 的类脂液滴乳液可形成填充上限值为 $10 \mu\text{m}$ 微球体的气体前体。

5

用一个适宜尺寸的过滤器可容易地制备具有特定尺寸的乳液。此外, 通过过滤器的尺寸可以预计需要形成限定尺寸的气体前体液滴, 过滤器的尺寸也要足以除去任何可能的细菌污染, 因此, 可以作为消毒过滤。

10 本发明方法中制备用作 CT 造影对比剂的气体填充微球体的实施方案可以应用于所有可被温度激活的气体前体。事实上, 溶剂系统的凝固点的降低可以允许使用在 0°C 以下进行液体到气体相转移的气体前体。可选择溶剂系统提供作气体前体悬浮液的介质。例如, 20%丙二醇缓冲盐水溶液便显示了比单纯水更低的凝固点。通过增加丙二醇的量或加入如氯化钠等的材料, 凝固点可以降得更低。

15

适宜的溶剂系统的选择可以通过物理方法确定。当物质, 固体或液体(这里是指溶质)溶于溶剂(如水基缓冲液)中后, 凝固点便降低, 降低多少取决于溶液的组成。因此, 由 Wall 定义, 我们可以用下面的方程表示溶剂凝固点的降低:

20
$$\ln X_a = \ln(1 - X_b) = \Delta H_{\text{fus}}/R(1/T_0 - 1/T)$$

其中:

X_a =溶剂的摩尔分数

X_b =溶液的摩尔分数

25 ΔH_{fus} =溶剂的熔融热

T_0 =溶剂的正常凝固点

解方程得到溶剂的正常。如果 X_b 小于 X_a , 则上述方程可改写为:

30
$$X_b = \Delta H_{\text{fus}}/R[T - T_0/T_0 T] \approx \Delta H_{\text{fus}} \Delta T/RT_0^2$$

上述方程中假设温度变化 ΔT 小于 T_2 。上述方程在假设溶液的浓度(每千克溶剂的摩尔数)用术语重量摩尔浓度 m 表示时可以被进一步简化为:

35
$$X_b = m/[m + 1000/m_a] \approx mM_a/1000$$

其中

Ma=溶剂的分子量, 并且

m=用摩尔表示的每 1000 克溶质的重量摩尔浓度。

5 因此, 取代分数 Xb:

$$\Delta T = [MaRT_0^2 / 1000 \Delta H_{fus}]m$$

或 $\Delta T = K_f m$, 其中

$$K_f = MaRT_0^2 / 1000 \Delta H_{fus}$$

10 K_f 是指摩尔凝固点并且水在一个大气压下每单位摩尔浓度为 1.86 度。上述方程可以精确地计算用于本发明中气体前体填充的微球体溶液的摩尔凝固点。

因此, 上述方程可以用于计算凝固点降低并且可确定用于降低溶剂凝固点温度至一个适宜值时液体或固体溶质的适宜浓度。

15

制备温度激活气体前体填充的微球体的方法包括:

(a) 使本发明中使用的气体前体填充的微球体的悬浮水溶液涡旋; 该方法的变换包括可选择的在振荡前蒸煮消毒, 可选择地加热气体前体或类脂悬浮水溶液, 可选择地将含悬浮液的容器开孔, 可选择地振荡或允许气体前体微球体自发形成并冷却气体前体填充微球体悬浮液, 并且可选择地通过约 0.22 μm 的过滤器挤出气体前体或类脂悬浮水溶液, 另外, 过滤也可在用约 0.22 μm 的过滤器在体内给用所得的微球体时进行。

(b) 将本发明气体前体填充的微球体的悬浮水溶液用微乳化方法是在患者给用前通过搅拌和加热而微乳化;

25 (c) 通过加热, 和 / 或搅拌在类脂悬浮液中形成气体前体, 用膨胀和置换容器中其它微球体的方法使密度较低的气体前体填充的微球体浮至溶液的顶层并且使容器开孔而释放空气; 和

(d) 在前述任意方法中, 用密封容器盛装气体前体和稳定化合物 (如生物相容类脂) 的悬浮水溶液, 所述悬浮液保持在气体前体相转移温度以下, 接着加热使温度升高至相转移温度以上, 可选择地用振荡, 或使气体前体微球体自发形成, 由此通过膨胀密封容器中的气体前体而升高所述容器的压力, 以及冷却气体填充微球体悬浮液, 其后也可进行振荡。

35 在振荡气体注入方法之前用冷冻干燥法除去稳定化合物中的水和有机材料。干燥-气体注入方法可用以除去微球体中的水分。通过在干燥微球体 (即先干燥) 中预截留气体前体然后加热, 气体前体便膨胀而填充微球体。气体前体也可以填充被

抽成真空之后的干燥微球体。当干燥微球体保持在其凝胶态至液晶温度以下时，干燥的气室可以缓慢地被气态气体前体填满，如在生物相容类脂的相转移温度，4 °C（全氟丁烷的沸点）和低于 40 °C 之间，全氟丁烷可用于填充由二棕榈酰磷脂酰胆碱（DPPC）组成的干燥微球体。在此情况下，最优的填充微球体的温度为 4 °C 至 5 °C 之间。

10 优选的制备温度激活气体前体填充的微球体的方法包括在气体前体存在下，在低于类脂的凝胶态到液晶态相转移温度及气体前体液态到气态的相转移温度下，振荡含稳定化合物（如生物相容类脂）的水溶液。将混合物加热至气体前体液态至气态相转移温度以上后使前体膨胀。停止加热，将混合物温度降至气体前体液态至气态相转移温度。在加热过程中可以振荡混合物，或随后将混合物冷却。

15 本发明也着重使用制备气体前体填充微球体的方法，该方法包括在气体前体存在下振荡含稳定化合物（如生物相容类脂）的水溶液，并分离所得气体前体填充的微球体用于计算断层机化 X 射线照相术。前述方法制备的微球体在此是指通过振荡气体前体注入方法由凝胶态制备的气体前体填充的微球体。

20 通常，现有技术中水填充的脂质体是在高于类脂的相转移温度常规地形成并使用的，由于它们更富弹性因此用于液晶态生物系统中。参见，例如，Szoka and Papahadjopoulos, Proc. Natl. Acad. Sci. 1978, 75, 4194-4198。相反，根据优选方案制备的微球体是气体前体填充的（更富弹性），因为气体形成后的气体前体比水溶液具有更好的可压缩性和柔顺性。因此，尽管在胶体相更稳定，但在类脂的相转移温度下形成时，气体前体填充的微球体可用于生物系统。

25 本发明提出的方法包括在温度激活气体前体存在下振荡含有稳定化合物（如生物相容类脂）的水溶液。这里的“振荡”，是指搅拌水溶液以使气体前体从局部外界环境中进入水溶液的运动。任何搅拌水溶液而产生气体前体的运动均可用作振荡。振荡必须足够强以使一段时间后形成泡沫。优选地，振荡足够强以使泡沫在很短时间内形成，例如 30 分钟，优选 20 分钟，更优选 10 分钟。振荡可以是微乳化，30 微流体化，例如，旋转（如涡旋），左右，或上下运动。在液态下加入气体前体的情况下，在前面提出的振荡方法之外还可使用声处理法。而且，不同类型的运动可以结合使用。当然，振荡可以是振荡装有类脂水溶液的容器，也可以不振荡容器本身而振其中的水溶液。而且，振荡可以手动也可以机械振荡。可以使用的机械搅拌器包括，例如，搅拌台，如 VWR Scientific (Cerritos, CA) 搅拌台，微流体化器，35 Wig-L-Bug™ (Crescent Dental Manufacturing, Inc., Lyous, IL) (可以得到特别好的结果)，机械涂料混合器，以及其它已知机械。产生振荡的其它方法包括在高速或高

压下释放气体前体的运动。可以理解，水溶液体积大，用力的总量相应增加是优选的。剧烈振荡是指每分钟至少有 60 次振荡运动是优选的。优选的实例是每分钟至少 1000 转的涡旋。更优选的是每分钟 1800 转的涡旋。

5 振荡下气体前体填充的微球体的形成可以通过水溶液顶层泡沫的存在来检测。它伴随着在泡沫形成时水溶液体积的减少。优选地，最终的泡沫体积至少两倍于类脂水溶液最初的体积；更优选地，最终的泡沫体积至少是类脂水溶液最初体积的三倍；甚至更优选地，最终的泡沫体积至少是类脂水溶液最初体积的四倍。最优选的是所有的类脂水溶液均转化成泡沫。

10

所需的振荡时间可以通过检测泡沫的形成来确定。例如，将 10ml 类脂溶液置于 50ml 的离心管中涡旋大约 15-20 分钟或直至气体前体填充的微球体的粘度变得足够大以至其在搅拌时不再粘着于瓶壁上。这时，泡沫便产生而使含气体前体填充微球体的溶液体积升至 30 至 35ml。

15

稳定化合物的浓度，特别是类脂实施形成适宜泡沫水时的浓度可根据所使用的稳定化合物（如所用的生物相容脂）的类型而变化，而且本领域普通技术人员根据本发明的公开可以很容易地确定。例如，在优选的实施方案中，根据本发明提出的方法，用于形成气体前体填充的微球体的 1,2-二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)的浓度大约为 20mg/ml 至约 30mg/ml 盐溶液。在优选方案中所用的二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)为大约 5mg/ml 至大约 10mg/ml 盐溶液。

20

特别地，DPPC 的浓度为 20mg/ml 至 30mg/ml 时，振荡下，产生总悬浮液和截留的气体前体体积是悬浮液体积的四倍多。DSPC 的浓度为 10mg/ml 时，振荡后，产生完全没有任何液体悬浮液体积的总体积并且全含泡沫。

25

本领域普通技术人员可以理解，一旦结合本发明的公开，用作初始原料的类脂和其它稳定化合物，或微球体的最终产品，可以先制备随后用于本发明提出的方法。例如，稳定化合物（如生物相容脂）可以水合然后冷冻干燥，经过冷冻和熔化循环，或者简单的水合。在优选的实施方案中，类脂可以水合然后冷冻干燥，或水合，然后经过冷冻和熔化循环，然后再冷冻干燥，之后形成气体前体填充的微球体。

30

根据本发明提出的方法，存在的气体例如但不限于空气，可以通过局部外界大气提供。局部外界大气可以是密封容器，或非密封容器中的大气，也可以是外界环境。或者，例如，气体可以注入或以其它方式具有类脂水溶液的容器或加入类脂水溶液自身以提供气体而不是空气。比空气轻的气体可以加入密封容器中同时

35

比空气重的气体可以加入密封的或未密封的容器中。因此，本发明包括空气和 / 或其它气体与气体前体的共截留。

5 正如在前面处理稳定化合物部分已经描述的那样，本发明提出的优选方法是在低于所用类脂凝胶态到液晶态相转移温度下完成的。“凝胶态到液晶态相转移温度”是指类脂双层从凝胶态向液晶态转化时的温度。参见，例如，Chapman et al., J. Biol. Chem. 1974,249,2512-2512。

10 因此，前述的稳定微球体前体，可以用与本发明中使用的其它稳定微球体相同的方法使用，一旦在宿主组织中进行激活，则可使用诸如温度或 pH 等因素来产生气体。优选的实施方案是气体前体在接近所述宿主正常体温时经过由液态向气态的相转移，并且通过宿主组织的温度激活以便进行相转移产生气相。更优选地，该方法中宿主组织是具有正常体温约 37 °C 的人体组织，并且其中气体前体在 37 °C 左右经过由液态到气态的相转移。

15 本发明中所有上述包括稳定气体和气体前体填充微球体的制备实施方案中，如果消毒过程是在气体发生步骤之前或在悬浮液中温度敏感的气体前体发生温度介导的气体转化之前，则可使用加热消毒或消毒过滤来灭菌。另一方面，在对比介质制剂中可以加入一种或多种抗菌剂和 / 或防腐剂，如苯甲酸钠，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，抗坏血酸棕榈酸酯，丁基化的羟基茴香醚，丁基化的羟基甲苯，氯丁醇，脱氢乙酸，乙二胺，单硫代甘油，苯甲酸钾，偏亚硫酸氢钾，山梨酸钾，亚硫酸氢钠，二氧化硫，和有机汞盐。这种灭菌，如果需要在入侵环境（如血管内地或腹腔内地）下造影时使用稳定微球体时，
20 则可用其它常规方法，如放射法。适宜的灭菌方法对本领域技术人员在本发明提供的稳定气体和气体前体填充的微球体及其使用说明书的指导下是显而易见的。对比介质通常以水悬浮方式储存但是在干燥微球体或干燥类脂球的情况下对比介质则以干粉形式储存以便使用前复制。

30 使用方法

作 CT 造影对比剂的新的稳定气体和气体前体填充的微球体，可用于所有使用计算机化 X 射线断层照相术造影领域中。

35 本发明提供一种患者通常，和 / 或特别地在诊断疾病组织存在的造影方法。本发明的造影方法可以通过给用本发明的对比剂，然后用计算机化 X 射线断层照相术造影法扫描以获得患者和 / 或任何疾病组织在这些区域的内部区域可视图像。患

者区域，是指整个患者或患者的特定区域或部位。对比剂特别适用于提供胃肠区的造影，但也可更广地应用于诸如脉管系统或其它区域的造影，这对于本领域技术人员而言是显而易见的。这里所用的短语胃肠区或胃肠道，包括所述患者的食管、胃、小肠及大肠和直肠。短语脉管系统，是指身体内的血管或身体的组织或部分。
5 患者可以是任何哺乳动物，优选人。

正如本领域普通技术人员所知的，本发明中使用的稳定气体和气体前体填充的微球体的给用可以通过多种方式进行，如通过血管，经口，直肠，阴道，膀胱，腹腔，耳蜗，泌尿系统给药等等，给药时可用多种制剂形式。当扫描区域是胃肠区时，
10 本发明的对比剂的给用优选口服或直肠给药。给用的剂量和具体模式依据年龄、体重和具体的哺乳动物和其扫描区域，及所用的本发明中的具体对比剂而变化。典型地，开始为较低剂量水平然后增加直至达到所需的对比强度。多种稳定气体和气体前体填充微球体的结合可用于改变诸如粘度，渗透性或口味等口服材料的特性。为了完成本发明的 CT 造影方法，可以单独使用对比剂，或者与诊断剂、治疗剂或其它试剂联合使用。其它试剂包括赋形剂如香料或着色剂。所用 CT 造影技术是常规的或描述于以下文献中，如，
15 *in Computed Body Tomography*, Lee, J.K.T., Sagel, S.S, 和 Stanley, R.J., eds., 1983, Ravens Press, Mew York, N.Y., 特别是题为 “Physical Principle and Instrumentation” Ter-Pogossian, M.M., 和 “Techniques”, Aronberg, D.J. 文中的前两章。

20 气体和气体前体填充微球体的给用途径和有效面积不仅仅限于血液空间，即血管。本发明中所用的气体和气体前体填充的微球体可以用于 CT 造影，如果微球体是通过口腔摄入的则可得到胃肠道的图像。另一方面，稳定气体微球体通过直肠给药则可得到下胃肠道（包括直肠，降结肠，横结肠，和升结肠，及阑尾）的完美图像。
25 通过直肠途径，还可以得到回肠，和可能的空肠的图像。同样，直接通过腹腔给药则可得到腹膜图像。可以设想稳定气体和气体前体填充的微球体可以直接通过耳道给药从而得到象咽鼓管一样的耳道的图像，如果穿孔，还可得到内耳图像。可以设想如果稳定气体和气体前体填充微球体通过鼻内给药则可通过计算机化 X 射线断层造相术造影而得到鼻隔和鼻窦的图像。

30 本发明的微球体对比剂的其它给药途径，和足以造影的组织区域包括，但不仅限于 1) 鼻内给用而得到鼻通道和鼻窦包括鼻区域和鼻窦和窦状隙的图像； 2) 鼻内或口服给用而得到呼吸道残端，包括气管、支气管、细支气管和肺的图像； 3) 通过耳给用而得到听觉通道和咽鼓管，鼓室膜和内外耳和耳道的图像； 4) 眼内给用而得到与视觉有关的区域的图像； 5) 腹膜内给用可得到腹膜的图像；和 6) 膀胱内给用，即通过膀胱给药，可得到通过其区域的泌尿生殖道（包括，但不限于，
35

尿道，膀胱，输尿管，肾及肾脉管系统及以上）区域的图像，进行膀胱造影或确定输尿管回流的存在。

5 本发明通过下面实施例进一步说明。所有实施例均是真实的。这些实施例仅用以解释说明而不应被认为是对所附权利要求的限定。

10 实施例

用于下列实施例的各种材料均可商购。所有类脂均购自于 Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL)。全氟戊烷和全氟己烷购自于 PCR Chemicals, Inc. (Gainesville, FL)。

15 在下面实施例中，“DPPE”是指二棕榈酰磷脂酰乙醇胺；“DPPA”是指二棕榈酰磷脂酸；和“DPPC”是指二棕榈酰磷脂酰胆碱。“PEG 5000”是指与 PEG 5000 以共价键相联的 DPPE。

20 实施例 1

该实施例在本发明范围内描述了气体和气体前体填充的微球体的制备。

25 将 DPPC (77.5 摩尔%)，DPPA (12.5 摩尔%)，和 DPPE-PEG 5000 (10 摩尔%) 加入含有甘油(10wt%)和丙二醇(10wt%)的生理盐水载体溶液中。在该混合物中加入全氟戊烷和悬浮液部分(6mL)并置于 18mL 玻璃管形瓶中在 121 °C 加热 15 分钟。将所得半透明冷至室温。未观察到明显的泡沫，但轻微的搅拌可在悬浮液顶层产生少量气泡。在 Wig-2-Bug 上搅拌(Crescent Dental Mtg. Corp. , Lyons, IL) 2 分钟得到稠密的泡沫并基本上填满管形瓶。

30 类脂 / 全氟戊烷(PFP)悬浮液样品，搅拌或不搅拌，用 Siemens DRH Somatom III (Siemens, Iselin, NJ)，用 410 毫安秒和 8 毫米片厚度和 1.4 的放大因子在 125 峰千伏，通过计算机化 X 射线断层照相术来扫描。造影过程用一个宽度为 380 Hounsefield Unit (HU)的窗口和一个 30HU 的中心显示未搅拌样品和搅拌样品完全黑的流体密度。当用宽度为 1500 HU 的窗口和-600HU 的中心检测时（相应类型的窗口装置用于肺扫描），未搅拌样品出现亮白色而搅拌的样品则仅微弱可见。测定
35 样品的密度，未搅拌样品为 84.2HU (S.D.38.02)和搅拌样品为 -548.3HU ±

实施例 2

5 该实施例涉及分析手动和机械振荡对微球体大小的影响。

按实施例 1 所述方法制备类脂/PFP 悬浮液。将悬浮液样品在室温下手动振荡（远没有在实施例 1 中所用的 Wig-L-Bug 机械振荡器剧烈）。基本上没有泡沫产生，仅有少量气泡在液面上。然而，当样品被加热到体温 37 °C，高于 27.5 °C（全氟戊烷的沸点），并手动振荡，泡沫形成并充满整个管形瓶。当比较用 Wig-L-Bug 机械振荡器在室温产生的泡沫和手动振荡在体温产生的泡沫时，可以发现手动振荡产生的微球体比用 Wig-L-Bug 机械振荡器产生的微球体稍大一点。手动振荡产生的微球体比用 Wig-L-Bug 机械振荡器产生的微球体更快地升至表面，这进一步说明机械振荡产生的微球体比手动振荡产生的微球体小，因为大微球体升得更快。

15

实施例 3

该实施例是有关含有聚乙烯醇类脂双层的稳定气体填充微球体的形成。

20 该实施例可以说明聚乙烯醇聚合物对含有全氟化碳的微球体的大小的影响。含类脂的气体填充微球体可以通过在含有 5%（重量）的聚乙烯醇（平均 M.W. 50000,99+%水解的）正常盐水载体中加入 5mg/mL 摩尔重量比为 82:8:10 的 DPPC: 磷脂酸，和 DPPE-PEG 5000 悬浮液而制备。在该混合物中加入 50 μ L 全氟戊烷。将载体换成生理盐水，甘油，和丙二醇 8:1:1(V:V:V) (Spechtrum Chemical Co. 25 Gardena, Calif.)，可以制备与上述相同的悬浮液。将悬浮液在 Barnstead/Thermolyne 高压消毒器(Barnstead/Thermolyne, Rancho Dominguez, Calif) 中，在 121 °C 加热消毒 21 分钟。然后将所得产品的温度在 VWR Model 2500 恒温箱(VWR Manufacturing Corp., Albuquerque, New Mexico) 中恒温至 30 °C。将稍不透明的悬浮液在 Wig-L-Bug 振荡器 (Crescent Dental Mtg. Corp., Lyons, Il.) 中搅拌 2 分钟。这样便可产生 30 气泡。将随后的气泡样品在 Particle Sizing System Model 770 光阴暗筛上确定大小。仪器用大小范围为 2.02 μ m 至 41.55 μ m (Coulter Electronics, Inc. Hialeah, Fla.) 的标准尺寸胶乳球校正。样品载体是去离子水。含 PVA 样品对生理盐水、甘油、丙二醇样品的大小分布如下：

35

表 3

包括有或没有聚乙烯醇(PVA)的脂质双分子层的气体—真充微球体的的大小

	5% PVA 样品	正常盐水,甘油, 丙烯醇样品
平均大小	5.51 μm	5.82 μm
95%小于	14.45 μm	19.1 μm
99.9%小于	72.2 μm	75.6 μm

实施例 4

5 该实施例说明全氟戊烷在制备含类脂双层微球体的制备中的作用。

在 18mL 管形瓶中加入 6mL 5mg/mL 由 77.5 摩尔 % 的 1,2 二棕榈酰-3-Sn 甘油
 磷脂酰胆碱(DPPC), 12.5 摩尔 % 的磷酸, 和 10 摩尔 % 的 1,2-二棕榈酰-3-Sn-磷
 脂酰乙醇胺聚乙二醇 5000(DPPE-PEG 5000)组成的类脂悬浮液随后将 50 μL 的全
 10 氟戊烷室温下注入溶液中。管形瓶上方空间在环境压力下填充空气并将管形瓶用聚
 四氟乙烯塞和铝密封(VWR, Albuquerque, New Mexico)。将管形瓶在 121 $^{\circ}\text{C}$ 加热消
 毒 15 分钟(Barnstead Thermolyne, Dubuque, Iowa)。得到半透明均匀悬浮液。将管形
 瓶从加热消毒器中取出, 并冷却至室温, 然后在 Wig-L-Bug 振荡器(Crescent Dental
 Manufacturing Corp. Lyons, Ill)上振荡 2 分钟。整个管形瓶充满泡沫, 然后将管形瓶
 15 置于冰箱中在 4 $^{\circ}\text{C}$ 并保持泡沫。通过比较, 在相同的类脂混合物中制得空气或单独
 氮气的泡沫, 即没有加入全氟戊烷, 并不是只有用全氟戊烷才能产生泡沫。用全氟
 戊烷和空气混合物制备泡沫有意想不到的持久性; 特别是在全氟戊烷的沸点约 27.5
 $^{\circ}\text{C}$ 时。在该实验条件下室温约 20 $^{\circ}\text{C}$, 并且在 4 $^{\circ}\text{C}$ 时预计泡沫将破裂。该实验证明
 全氟化碳的存在有意想不到的发现, 尽管处于液态, 也能使泡沫稳定。

20

实施例 5

该实施例说明全氟己烷在制备含类脂质层微球体中的应用。

25 为了进一步说明液态全沸化碳可以使气体填充微球体泡沫稳定, 评估用全氟己
 烷(b.p.56 $^{\circ}\text{C}$)所得结果。用前面实施例 4 所述方法制备类脂悬浮液, 但用 50 μL
 全氟己烷代替全氟戊烷加入管形瓶中。将悬浮液加热得到半透明至云状类脂悬浮
 液。将材料在 Wig-L-Bug (Crescent Dental Mtg. Corp., Lyons, Ill.) 上振荡 2 分钟又
 得到泡沫。泡沫体积比单独使用空气的对照样品要大。再做一次, 泡沫保持稳定并
 30 比空气样品维持的时间长。这清楚地说明全氟己烷的存在(在人体生理温度下为液

体)，可用作稳定气体填充微球体泡沫。

实施例 6

5 该实施例用以说明海藻糖对含类脂双层的气体填充微球体的稳定作用。

10 将由含生理盐水：甘油：丙二醇(8:1:1,V:V:V)组成的稳定化合物载体和前面实施例 4 提供的类脂制备的气体填充微球体泡沫在 Wig-L-Bug 上按在此叙述的方法振荡 2 分钟，在室温得到大约 6mL 泡沫。4 天后，发现泡沫不再存在。当用同样的类脂重复上述实验，但是将海藻糖，D-吡喃葡萄糖（一种双糖）按海藻糖 1:1 摩尔比加入类脂中，发现泡沫比对照组持久。重复实验得到相似的结果。该实验清楚地证明海藻糖可用以辅助稳定化合物以延长本发明气体填充微球体的持久性。

15 每一个专利的公开、专利申请和引用的出版物或该文献中的描述在此作为整体参考。

除了在此叙述的之外，本领域普通技术人员从前面的叙述可以容易地对本发明作出各种改进。这种改进也应落入所附的权利要求的范围内。

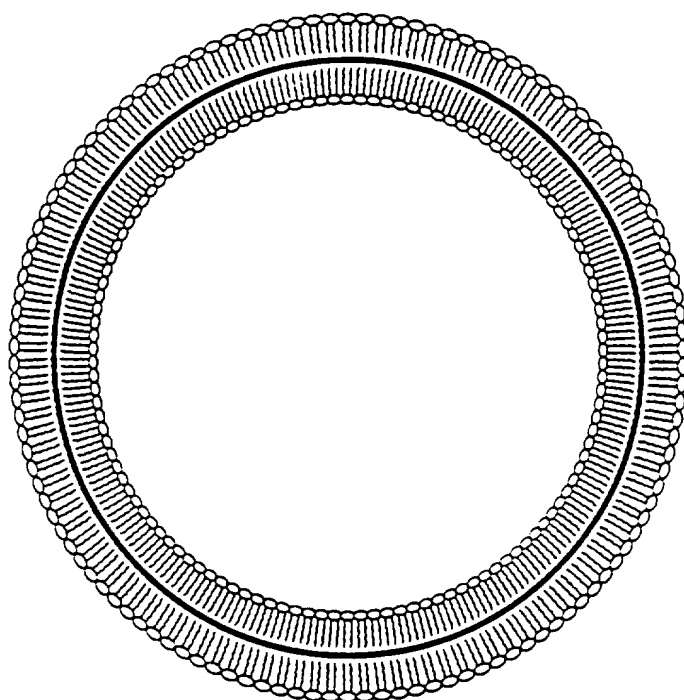


图 1

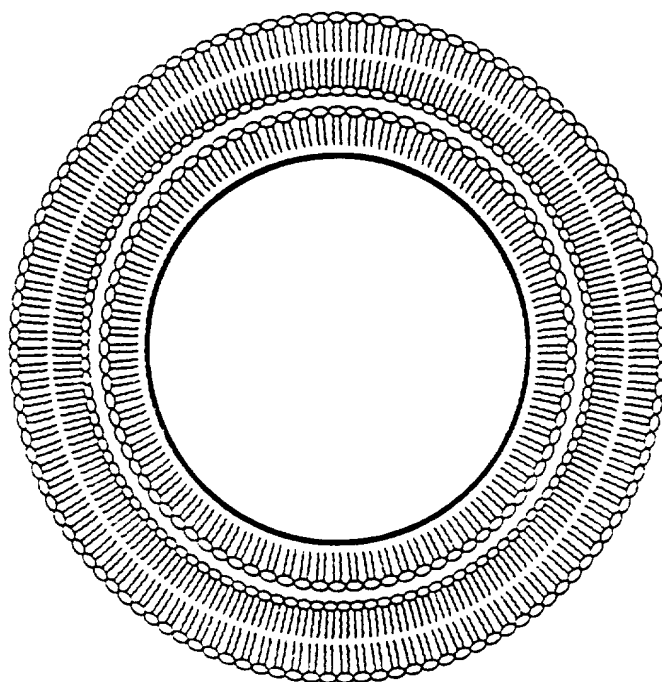


图 2

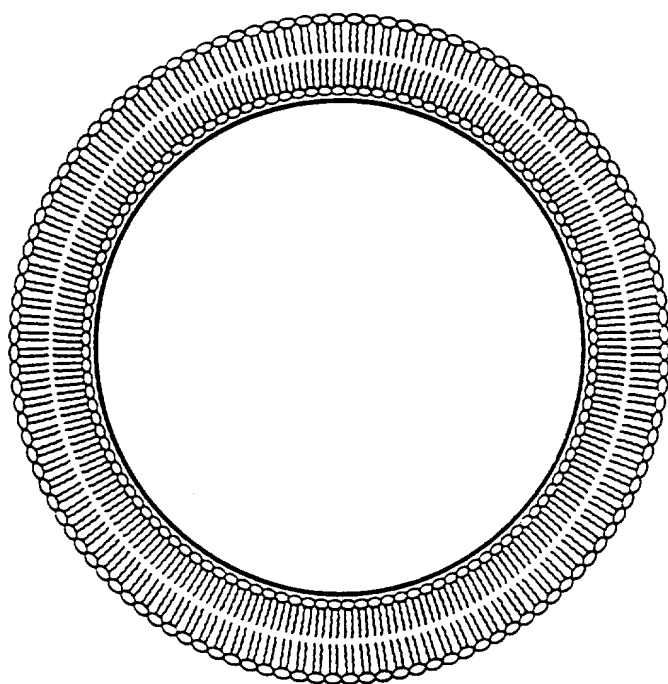


图 3

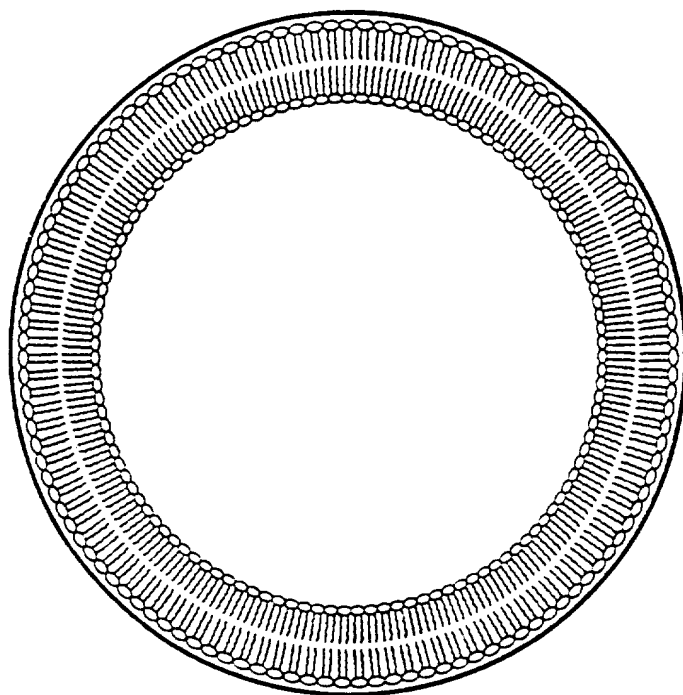


图 4

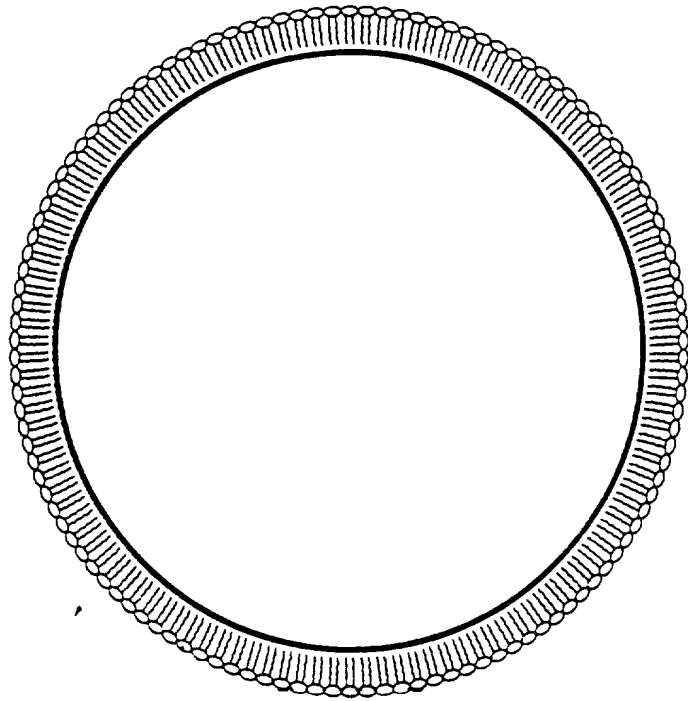


图 5

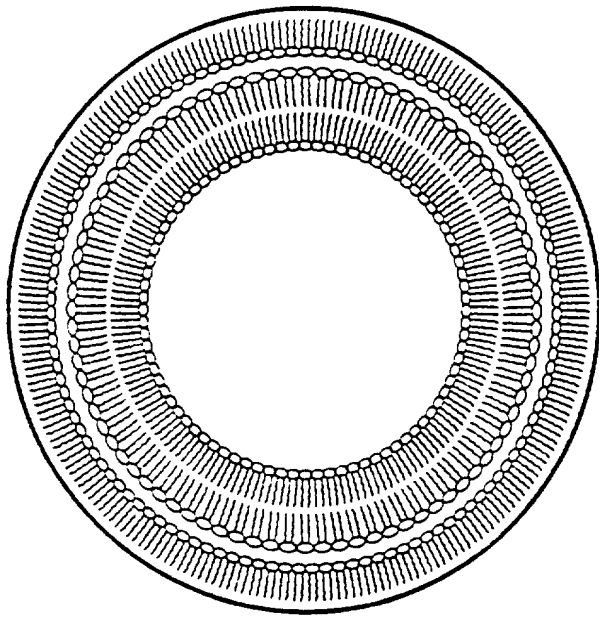


图 6