

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480032532.8

[51] Int. Cl.  
A61B 8/00 (2006.01)  
A61K 9/127 (2006.01)

[43] 公开日 2007年1月10日

[11] 公开号 CN 1893877A

[22] 申请日 2004.11.1

[21] 申请号 200480032532.8

[30] 优先权

[32] 2003.10.31 [33] US [31] 60/517,219

[32] 2004.10.28 [33] US [31] 10/977,100

[86] 国际申请 PCT/US2004/036537 2004.11.1

[87] 国际公布 WO2005/041897 英 2005.5.12

[85] 进入国家阶段日期 2006.4.30

[71] 申请人 博英特生物医药股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 T·B·奥托波尼 R·E·肖特

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 张宜红

权利要求书 3 页 说明书 18 页 附图 8 页

[54] 发明名称

用作超声造影剂的可重建微球组合物

[57] 摘要

提供了用于制备易于重建的微球或纳米球的干燥组合物的方法和悬浮液。该干燥组合物可用于诊断应用如超声成像。该悬浮液包含特定量的叔丁醇和/或无定形糖(或无定形糖的混合物)作为关键成分,以降低构成悬浮液的颗粒的聚集。

1. 一种水性颗粒悬浮液，所述颗粒悬浮液包含：  
许多颗粒，量为 0.3-4 毫克/毫升悬浮液；
- 5 一种或多种无定形糖，与空芯颗粒的总重量比(无定形糖重量:颗粒重量)为 0.3:1 到 12:1(基于颗粒的壳重量)，或与实芯颗粒的总重量比为 0.02:1 到 0.86:1；和  
叔丁醇，与空芯颗粒的重量比(叔丁醇:颗粒)为 30:1 到 600:1，与实芯颗粒的重量比为 2:1 到 43:1。
- 10 2. 如权利要求 1 所述的颗粒悬浮液，其特征在于，所述无定形糖选自：  
蔗糖、海藻糖、乳糖及其组合。
3. 如权利要求 1 所述的颗粒悬浮液，还包含表面活性剂，所述表面活性剂与空芯颗粒的重量比(表面活性剂:颗粒)为 0.01:1 到 60:1，或与实芯颗粒的重量比为 0.01:1 到 4.5:1。
- 15 4. 如权利要求 1 所述的颗粒悬浮液，还包含水溶性聚合物，所述水溶性聚合物与空芯颗粒的重量比(水溶性聚合物:颗粒)为 6:1 到 300:1，或与实芯颗粒的重量比为 0.4:1 到 22:1。
5. 如权利要求 1 所述的颗粒悬浮液，还包含渗量浓度调节剂，所述渗量浓度调节剂与空芯颗粒的重量比(试剂:颗粒)为 0.01:1 到 75:1，或与实芯颗粒的  
20 重量比为 0.01:1 到 6:1。
6. 如权利要求 1 所述的颗粒悬浮液，其中所述颗粒是空芯的，所述组合物还包含：  
重量比(聚合物:颗粒)为 6:1 到 300:1 的水溶性聚合物；  
重量比(表面活性剂:颗粒)为 0:1 到 60:1 的表面活性剂；和  
25 重量比(试剂:颗粒)为 0:1 到 75:1 的渗量浓度调节剂。
7. 如权利要求 4 或 6 所述的颗粒悬浮液，其特征在于，所述水溶性聚合物选自：中等分子量的聚乙二醇、低到中等分子量的聚乙烯吡咯烷酮及其组合。
8. 如权利要求 3 或 6 所述的颗粒悬浮液，其特征在于，所述表面活性剂是泊洛沙姆。
- 30 9. 如权利要求 5 或 6 所述的颗粒悬浮液，其特征在于，所述渗量浓度调

节剂是甘氨酸。

10. 如权利要求 1 或 6 所述的颗粒悬浮液，其特征在于，所述颗粒是空芯双层颗粒。

11. 如权利要求 10 所述的颗粒悬浮液，其特征在于，所述空芯双层颗粒包括包封空芯的壳，其中，所述壳包括可生物降解聚合物的内层和交联两性材料的外层。

12. 如权利要求 11 所述的颗粒悬浮液，其特征在于，所述外层包含戊二醛交联白蛋白。

13. 如权利要求 11 所述的颗粒悬浮液，其特征在于，所述内层包含聚(D, L-丙交酯)。

14. 如权利要求 11 所述的颗粒悬浮液，其特征在于，所述空芯双层颗粒的平均粒径约为 1-10 微米。

15. 如权利要求 11 所述的颗粒悬浮液，其特征在于，所述空芯双层颗粒的平均粒径约为 200-800 纳米。

16. 如权利要求 11 所述的颗粒悬浮液，其特征在于，所述内层包含聚(D,L-丙交酯)；所述外层包含戊二醛交联白蛋白；和所述空芯双层颗粒的平均粒径约为 1-10 微米。

17. 如权利要求 11 所述的颗粒悬浮液，其特征在于，所述内层包括聚(D,L-丙交酯)；所述外层包括戊二醛交联白蛋白；和所述空芯双层颗粒的平均粒径约为 200-800 纳米。

18. 通过将权利要求 1-17 中任一项所述的颗粒悬浮液冷冻至干燥制备的颗粒组合物。

19. 一种干燥组合物，所述组合物包含：  
许多空芯微粒，含量为 3.3 重量%；  
聚乙二醇 3350，含量为 56.6 重量%；  
泊洛沙姆 188，含量为 11.7 重量%；  
蔗糖，含量为 4.9 重量%；和  
甘氨酸，含量为 23.5%。

20. 如权利要求 19 所述的干燥组合物，其特征在于，所述空芯微粒包括

双层壳，所述双层壳包括聚(D, L)丙交酯的内层和戊二醛交联白蛋白的外层。

21. 如权利要求 19 或 20 所述的干燥组合物，其特征在于，所述空芯微粒的空芯填充有气体或气体混合物。

22. 如权利要求 21 所述的干燥组合物，其特征在于，所述气体是氮气。

5 23. 如权利要求 22 所述的干燥组合物，其特征在于，所述干燥组合物被包装在氮气下密封的具塞玻璃小瓶中。

24. 如权利要求 23 所述的干燥组合物，其特征在于，所述玻璃小瓶包含 2.5-7 毫克微粒、86.7 毫克聚乙二醇 3350、18 毫克泊洛沙姆 188、7.5 毫克蔗糖和 36 毫克甘氨酸。

10 25. 制造聚合物和/或蛋白质颗粒的干燥组合物的方法，所述方法包括将权利要求 1-17 中任一项所述的颗粒悬浮液冷冻至干燥。

26. 一种制造适用于超声成像的空芯双层微球的干燥组合物的方法，所述方法包括以下步骤：

15 (i) 将包含 0.9 重量%聚(D,L-丙交酯)、12.9 重量%环辛烷和 86.2 重量%醋酸异丙酯的有机溶液用包含 5 重量%人血清白蛋白的第一水溶液乳化，得到水包油乳剂；

(ii) 将所述乳剂用包含戊二醛的第二水溶液稀释 3-18 倍，戊二醛的量足以使重量比(戊二醛重量:白蛋白重量)为 0.2:1；

(iii) 搅拌步骤(ii)的结果直到基本上除去醋酸异丙酯；

20 (iv) 将泊洛沙姆 188 加入到(iii)的结果中，加入的量足以产生 0.25 重量%的浓度；

(v) 用泊洛沙姆 188 的水溶液(0.25 重量%)对(iv)的结果进行渗滤，以除去戊二醛和未结合的白蛋白；

25 (vi) 用泊洛沙姆 188 的水溶液(0.25 重量%)稀释(v)的结果，以产生微球浓度为 2.5-7 毫克微球(基于其壳重量)/克悬浮液的悬浮液；

(vii) 在步骤(vi)的结果中加入包含 26.25 重量%叔丁醇、0.375 重量%蔗糖、1.8 重量%甘氨酸、4.335 重量%聚乙二醇 3350 和 0.775 重量%泊洛沙姆 188 的水性辅料溶液，加入量足以产生包含 1.7 毫克微粒(基于微球壳重量)/克悬浮液的水性微粒悬浮液；和

30 (viii) 将步骤(vii)的水性微粒悬浮液冷冻至干燥。

27. 如权利要求 26 所述的方法，还包括用氮气回填微球的步骤。

## 用作超声造影剂的可重建微球组合物

## 5 发明领域

本发明要求 2003 年 10 月 31 日提交的根据 35 U.S.C. § 119(e) 的美国临时专利申请 60/517,219 的优先权，其内容被纳入本文作为参考。

## 发明背景

10 实芯和空芯微米颗粒和纳米粒被越来越多地应用于医学、药学和诊断领域。当注入血流时，这些颗粒可用作超声回波描计成像造影剂，以帮助肉眼观察内部结构如心脏和血管。这种造影剂还可用于检查器官灌注例如评价梗死造成的损伤，用于检查器官如肝，或用于区分正常和异常组织如肿瘤和囊肿。

当两种材料间界面处的声阻抗不同时，可实现超声造影。超声成像法和用  
15 作造影剂的颗粒组合物更具体的描述参见(例如)，超声造影剂、基本原理与临床应用(Ultrasound Contrast Agents, Basic Principles and Clinical Applications), Golderg 等编，第 2 版, 2001, Martin Dunitz Ltd。描述了用作  
20 超声造影剂的实芯颗粒(也称为“骨架”颗粒)例如参见：美国专利 5,558,857、美国专利 5,670,135、美国专利 5,674,468、美国专利 6,264,959、美国专利 6,177,062 和美国专利 5,565,215。

用作造影剂的空芯颗粒参见(例如)美国专利 No.6,193,951、美国专利  
6,200,548、美国专利 6,123,922、美国专利 6,333,021、美国专利 6,063,362、  
美国专利 6,022,252、美国专利 6,569,405、美国专利 6,045,777 和目前待批  
25 美国专利申请序列号 09/637,516。空芯和实芯颗粒都可用于将药学产品如药物  
和/或其它治疗或诊断组合物递送至体内靶器官或组织。通过扩散、通过颗粒的  
降解和通过用超声能量原位破裂颗粒，药物从颗粒中释放。

用于可注射的超声造影剂及药物递送颗粒的公知稳定方法是冷冻干燥，也  
称为冻干法。过去已经描述了多种冷冻干燥然后稳定和储存颗粒悬浮液的方  
法，例如美国专利 6,165,442 中所述。然而，冻干过程中(或储存过程中)悬浮  
30 液中的颗粒常常聚集。这种聚集是不希望的，尤其是在将冻干颗粒组合物通过

静脉注射给予患者的情况下。

对于由蛋白质组成的颗粒，或具有蛋白质外包衣的颗粒来说，聚集问题尤其尖锐。由合成聚合物和/或合成聚合物与蛋白质的混合物构成的颗粒也会遇到聚集问题。制备和冻干注射用颗粒的其它固有问题包括：除去加工过程中使用的一种或多种有机溶剂。这在形成和制备空芯颗粒组合物中尤其重要。

因此，需要改进冻干微米颗粒和纳米粒的制备和处理的方法，以降低聚集并更有效和方便地提供可重建的组合物。

### 发明概述

10 本发明解决了这些和其它需要，在某些方面，提供了颗粒悬浮液和制备干燥颗粒组合物的方法，冻干、储存和重建期间降低颗粒聚集或“粘在一起”的倾向。还提供了用水重建时可容易地分散的干燥颗粒组合物。

本发明部分基于两个重要的发现。第一，申请人发现，在包含蛋白质外包衣的聚合物颗粒悬浮液中加入特定量的无定形糖可大大降低颗粒粘在一起的趋势，尤其是在颗粒悬浮液的冻干期间。然而，观察到如果无定形糖存在的浓度足以降低或避免冻干颗粒组合物冻干或储存时颗粒的聚集，阻碍了除去颗粒制造中使用的溶剂。第二，申请人发现在包含次优化浓度(浓度足够低以很好地除去溶剂，但太低以致于不完全抑制聚集)的无定形糖的颗粒悬浮液中加入特定量的叔丁醇有助于在颗粒悬浮液的冻干期间除去溶剂，尤其有助于从空芯颗粒的空芯中除去溶剂，并提供颗粒聚集极少或不聚集的稳定的干燥冻干颗粒组合物。包含特定量的叔丁醇和/或无定形糖的悬浮液制备的干燥颗粒组合物用水重建时可容易地分散，使其理想地适合于诊断和/或治疗应用。因为这种易分散性，本文所述冻干颗粒悬浮液制备的干燥颗粒组合物尤其适合通过静脉注射给予动物或人。

25 因此，一方面，本发明提供用于制备适合重建和体内给予动物或人的干燥颗粒组合物的水性颗粒悬浮液，与常规悬浮液相比，该水性颗粒悬浮液克服了冻干期间颗粒的聚集倾向。悬浮液通常包含 0.3-4mg 的空芯颗粒(基于壳材料重量的重量)/毫升(mL)悬浮液，或 0.3-56 mg 的实芯颗粒/毫升(mL)悬浮液，及一种或两种以下成分：叔丁醇和/或无定形糖(或两种或多种无定形糖的混合物)。

30 构成悬浮液的叔丁醇和/或无定形糖的量取决于悬浮液是空芯颗粒还是实芯颗粒。对于实芯颗粒，悬浮液通常包含重量比(叔丁醇:颗粒)范围约 2.14:1 到 43:1

的叔丁醇，和/或重量比(总的无定形糖:颗粒)范围约 0.02:1 到 0.86:1 的无定形糖(或无定形糖的混合物)。对于空芯颗粒，悬浮液通常包含重量比(叔丁醇:颗粒)范围约 30:1 到 600:1 的叔丁醇，和/或重量比(总的无定形糖:颗粒)范围约 0.3:1 到 12:1 的无定形糖(或无定形糖的混合物)。

- 5 一般来说，大部分悬浮液是水。然而，悬浮液也可包含其它溶剂，例如通常在制备颗粒期间使用的溶剂和/或溶剂混合物，和/或一种或多种辅料，例如，缓冲剂、调节渗量浓度和张力的试剂以及填充剂。悬浮液还可包含一种或多种表面活性剂。然而，本文所述悬浮液一个重要的优点是能够处理和冻干悬浮液而颗粒不明显聚集。因此，虽然悬浮液可包含表面活性剂和其它常规抗聚集剂，
- 10 这些试剂的使用不是必需的。

在一个实施方式中，悬浮液包含叔丁醇和无定形糖。

- 另一方面，本发明提供制备加水时容易重建和分散的干燥颗粒组合物的方法。一方面，该方法包括将包含叔丁醇和/或一种或多种无定形糖的水性颗粒悬浮液冷冻至干燥，如上所述。通常在形成聚合物颗粒和/或蛋白质颗粒之后和冻
- 15 干之前，将叔丁醇和/或无定形糖(及任何任选的辅料和/或表面活性剂)加入到颗粒悬浮液中。例如，可使用常规技术，结合包含叔丁醇、无定形糖和/或任何需要的任选辅料和/或表面活性剂的水性辅料组合物，它们的浓度适合产生上述水性颗粒悬浮液，并将该悬浮液冷冻至干燥，以制备实芯或空芯颗粒。需要时，可在与水性辅料组合物混合之前，通过过滤或其它方式(例如离心)收集颗粒。
- 20 需要或必需时，与水性辅料组合物混合之前，例如可通过渗滤或其它常规方式进行溶剂交换而不收集颗粒。

- 虽然该方法可用于具有聚集和/或粘在一起倾向的基本上任何类型的颗粒，发现该方法在制备双层、空芯颗粒干燥组合物，例如美国专利 6,193,951 和共同待批美国专利申请序列号 09/637,516 (WO01/12071)所述的聚合物纳米和/
- 25 或微米颗粒包覆的双层蛋白质中尤其有利，它们的内容被纳入本文作为参考。

- 在本发明一个具体的实施方式中，在冻干悬浮液之前，将叔丁醇和一种或多种无定形糖单独或与一种或多种辅料混合加入到上述形成的双层空芯颗粒的水性悬浮液中。然后，将该悬浮液冷冻至干燥，得到加水时易于分散的干燥的颗粒组合物。如本领域已知的那样，通过用特定气体或气体填充含干燥颗粒
- 30 组合物的冻干室，包含干燥组合物的空芯颗粒可填充有特定的气体或气体混合物，例如氮气(N<sub>2</sub>)、空气或全氟碳。

另一方面，本发明提供干燥、易于分散和/或可重建的颗粒组合物。通过冻干包含本文所述叔丁醇和/或无定形糖的水性颗粒悬浮液，形成干燥的组合物，该干燥组合物通常包含颗粒及无定形糖或重量比约为 0.3:1 到 12:1(对于空芯颗粒)或 0.02:1 到 0.86:1(对于实芯颗粒)的两种或多种无定形糖的混合物。干燥组合物可任选地包含一种或多种辅料和/或表面活性剂，如上所述。可在冻干之前将辅料加到悬浮液中，或将辅料加入到干燥、冻干的组合物中。当辅料包含在组合物中时，通常使用治疗和/或诊断应用的颗粒组合物中常规用量的辅料。在一个具体的实施方式中，组合物包含以下成分，并指明大约的重量比(成分重量:颗粒重量):

成分	重量比	
	空芯	实芯
蔗糖,NF	1.5:1	0.11:1
聚乙二醇 3350,NF	17.3:1	1.24:1
泊洛沙姆 188,NF	3.6:1	0.26:1
甘氨酸,USP	7.2:1	0.52:1

10

可将干燥组合物包装于任何方便的包装容器中，取决于具体应用。例如，可成批包装干燥组合物，允许根据需要测出所需的量。一般，将干燥组合物以单次用量包装于密封的玻璃小瓶中，该玻璃 XP 的尺寸和构型适合直接在小瓶中用水重建组合物以维持无菌条件。可将空芯、填充气体的颗粒的小瓶储存在含填充气体的顶空下的小瓶或其它类似容器中，以使芯中气体在储存期间不散出来。

15

#### 附图简要说明

图 1A 提供了柱形图，说明如实施例 1 所述制备的空芯微球组合物的峰直径；

20

图 1B 提供了柱形图，说明如实施例 1 所述制备的空芯微球组合物的平均直径；

图 1C 提供了柱形图，说明如实施例 1 所述制备的空芯微球组合物的中位直径；

图 1D 提供了柱形图，说明如实施例 1 所述制备的空芯组合物中直径大于 7 微米的微球的体积百分比；

图 2A 提供了柱形图，说明如实施例 2 所述制备的实芯微球组合物的峰直径；

5 图 2B 提供了柱形图，说明如实施例 2 所述制备的实芯微球组合物的平均直径；

图 2C 提供了柱形图，说明如实施例 2 所述制备的实芯微球组合物的中位直径；

10 图 2D 提供了柱形图，说明如实施例 2 所述制备的实芯组合物中直径大于 10 微米的微球的体积百分比；

#### 发明详述

本发明提供形成颗粒组合物的方法和悬浮液，其颗粒聚集倾向比目前使用的方法和/或组合物低。该方法和悬浮液在形成颗粒组合物中是有用的，用于诊断成像、药物递送及其它医学和药学应用。还提供了由这些方法形成的干燥颗粒组合物。这种干燥组合物在水中易于分散，使其理想地适用于诊断和治疗应用。这些方法尤其有利于处理含聚合物和/或蛋白质的颗粒悬浮液，以及其它冻干、储存和/或重建期间具有聚集或“粘在一起”倾向的颗粒。在它们的许多潜在应用中，方法和悬浮液可用于制备含聚合物和/或蛋白质的实芯或“骨架”颗粒，例如美国专利 5,558,857、美国专利 5,670, 135、美国专利 5,674, 468、美国专利 6,264, 959、美国专利 6,177,062 和美国专利 No.5,565,215 中所述，可用于制备含聚合物和/或蛋白质的空芯颗粒，例如美国专利 6,193,951、美国专利 6,200, 548、美国专利 6,123, 922、美国专利 6,333, 021、美国专利 6,063, 362、美国专利 6,022, 252、美国专利 6,569,405、美国专利 6,045, 777 及共同待批美国专利申请序列号 09/637,516(WO 01/12071)中所述。无论是实芯颗粒还是空芯颗粒，一般具有适合通过循环系统(避免被 RES 蓄积)的粒径范围。一般，颗粒粒径小于 10 $\mu$ m，收集构成一种组合物的颗粒将具有较窄的平均粒径分布。适合通过静脉注射给予的颗粒一般大于 95%的颗粒具有数均粒径 3-3.5 微米，优选大于 99%的颗粒粒径小于 7 微米。

30 这些方法广泛应用于制备含各种重建颗粒的干燥组合物。通常，提供了制备水性颗粒悬浮液的方法，该方法显著地降低了颗粒聚集问题。该方法可用于

冻干、储存和/或重建期间具有聚集倾向的任何颗粒，通常包括将每毫升悬浮液含约 0.3-4mg 空芯颗粒(重量基于材料的重量)、或每毫升悬浮液含约 0.3-56mg 实芯颗粒及特定重量比(取决于悬浮液含空芯颗粒还是含实芯颗粒)的叔丁醇和无定形糖(或两种或多种无定形糖的混合物)的一种或两种的水性悬浮液冷冻至干燥。对于空芯颗粒，悬浮液中通常含有重量比(总重量无定形糖:颗粒重量)约为 0.3:1 到 12:1 的无定形糖，和/或悬浮液中含有重量比(叔丁醇重量:颗粒重量)约为 30:1 到 600:1 的叔丁醇。在特定的实施方式中，总的无定形糖的重量比约为 0.75:1 到 3:1 和/或叔丁醇的重量比约为 60:1 到 150:1。

对于实芯颗粒，悬浮液中通常含有重量比约为 0.02:1 到 0.86:1 的无定形糖，和/或悬浮液中含有重量比约为 2.14:1 到 43:1 的叔丁醇。在特定的实施方式中，总的无定形糖的重量比约为 0.07:1 到 0.36:1 和/或叔丁醇的重量比约为 4:1 到 11:1。

在特定的实施方式中，悬浮液包含上述重量比的叔丁醇和无定形糖。

“无定形糖”在这里是指虽然能够结晶，但冻干时可获得非结晶、无定形状态的糖。如果暴露于超过其玻璃态转变温度( $T_g$ )的温度时，这些冻干的无定形糖自发地转化为结晶形式。因此，本发明使用的无定形糖是具有较高玻璃态转变温度( $T_g$ )，通常高于约 20°C 的无定形糖。适合用于本发明的无定形糖的具体例子包括但不限于，蔗糖、海藻糖和乳糖。颗粒形成或纯化过程期间，可将无定形糖和/或叔丁醇作为添加剂加入到一种或多种带有颗粒或其它形成颗粒的水性化合物的溶液中。更典型地，加入无定形糖和/或叔丁醇作为颗粒形成后与颗粒悬浮液混合的辅料或组合物溶液的一部分。

所述浓度范围内的无定形糖用作冻干、储存和/或重建过程中的聚集抑制剂。在显著低于所述范围的无定形糖浓度下，颗粒聚集可在形成离散、可重建的颗粒组合物时导致问题。如果无定形糖浓度太高，则不能接受地阻碍了溶剂的除去。溶剂除去困难是制备空芯颗粒，例如双层空芯蛋白质包衣的聚合物颗粒中主要考虑的问题，如美国专利 6,193,951 和共同待批美国专利申请序列号 09/637, 516 (WO01/12071)中所述。

使用所述浓度范围的叔丁醇具有双重优点。在所述浓度范围中，叔丁醇起降低颗粒聚集倾向同时增加溶剂除去的作用。当叔丁醇与上述无定形糖联用时，聚集效果降低最明显。通常，冻干期间，叔丁醇几乎可完全从悬浮液中除去，使其尤其适合用作制备适合动物和人体内给予的干燥颗粒组合物的非聚集

剂。也可使用 **DMSO**、或 **DMSO** 和叔丁醇的混合物，达到类似效果。

水性颗粒悬浮液中也可加入其它辅料，作为辅料溶液的另一组成，或在颗粒形成后、形成期间或形成前加入。这些辅料可包括表面活性剂，例如泊洛沙姆或吐温；填充剂如甘露醇、乳糖或甘氨酸；缓冲剂如醋酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐；坍塌温度改性剂如右旋糖酐、聚乙二醇或糖类；结晶骨架成分如甘露醇或甘氨酸；张力和渗量浓度调节剂如甘露醇、甘氨酸或氯化钠等。

可将形成的含上述重量比范围的无定形糖和/或叔丁醇的颗粒悬浮液冻干，以形成干燥的、可重建颗粒组合物。冻干除去大部分水和叔丁醇及悬浮液中或颗粒内存在的其它加工溶剂。通过将气体注入冻干室中，空芯颗粒可填充有气体或气体混合物。冻干组合物可方便地在小瓶或一些其它合适的容器中储存和/或运输。如果颗粒填充有气体，可在填充颗粒所使用的气体下储存颗粒。使用前，可用水重建组合物，以形成具有生理上相容的渗量浓度和 **pH** 的离散的颗粒悬浮液。

在一个实施方式中，重建的悬浮液宜包含每毫升约 **0.3-6mg** 空芯颗粒或每毫升约 **0.3-84mg** 实芯颗粒(对于空芯颗粒，重量基于颗粒壳重量)的悬浮的颗粒。在另一个实施方式中，水性颗粒悬浮液、干燥冻干颗粒组合物和重建的颗粒组合物除颗粒外，还包含以下浓度比例的无定形糖和/或叔丁醇(对于水性颗粒悬浮液)、甘氨酸、聚乙二醇和/或泊洛沙姆 **188**：

辅料	重量比(辅料重量:颗粒重量)	
	空芯颗粒	实芯颗粒
甘氨酸	<b>0:1-75:1</b>	<b>0:1-6:1</b>
聚乙二醇 (MW2000-6000)	<b>6:1-300:1</b>	<b>0.4:1-22:1</b>
泊洛沙姆	<b>0:1-60:1</b>	<b>0:1-4.5:1</b>

本文所述方法尤其适合用于制备具有蛋白质外层或壳的空芯、双层颗粒，例如美国专利 **6,193,951** 和共同待批美国专利申请序列号 **09/637,516** (WO01/12071)中所述，其内容被纳入本文作为参考。下述具体的示例性应用集中在上述参考文献中所述的可注射的微粒和纳米粒组合物。然而，一般来说，可制备易于受不良的颗粒聚集引起的问题的任何类型的颗粒悬浮液，尤其是任

何生物相容颗粒悬浮液，如本文所述。

5 在一个示范性实施方式中，构成可冻干的水性悬浮液和干燥、可重建的组合物的颗粒具有封装空芯的双层壳。壳的外层可由蛋白质或其它生物相容两亲材料如交联白蛋白构成。外层形成接触血液和体内组织的颗粒表面。内层可由合成聚合物或合成的可生物降解聚合物如聚(D,L-丙交酯)构成。为用作超声造影剂，用气体如空气、氮气、全氟碳填充颗粒的芯。构成颗粒，使得构成悬浮液或组合物的大部分颗粒具有约 1-10 微米范围内的粒径，以通过体内毛细血管系统。或者，可构成粒径低于 1 $\mu$ m 的颗粒，例如 200-800nm，用于成像或将药物活性剂递送至淋巴结系统。

10 由于这些颗粒具有构成外层和内层的壳，可处理层用作不同功能。暴露的外层用作颗粒与人体间的生物界面。因此，外层通常包含两性(即具有疏水性和亲水性)生物相容材料。外层也可由一种或多种合成的可生物降解聚合物构成。除具有两性外，外层还具有允许电荷和化学修饰的化学特征。内层包含可生物降解聚合物，可以是合成的可生物降解聚合物。内层提供或增加外层提供不足  
15 的颗粒的机械性质或药物递送性质。因为外层提供了生物相容界面，可选择聚合物而不受表面性质需要的限制。可根据限定所需机械性质的弹性模量和伸长度来选择聚合物。典型的适合用作双层颗粒内层的可生物降解聚合物如美国专利 6,193,951 和共同待批美国专利申请序列号 09/637,516 (WO 01/12071)所述，其内容被纳入本文作为参考。其它合适的可生物降解聚合物如 Langer 等  
20 (1983)Macromol. Chem. Phys. C23,61-125 所述，被纳入本文作为参考。这些聚合物也可用于制备实芯颗粒，任选地用上述生物相容、任选地两性材料的外层包覆。

对于用作超声造影剂或靶向、超声释放药物载体试剂的颗粒，内层厚度通常不大于满足最小机械性质或药物携带/递送性质的必需厚度。这可最大程度地  
25 增加颗粒的内部气体体积。颗粒内气体体积越大，颗粒回波发生性质越好。颗粒外层和内层的组合厚度部分取决于颗粒所需的机械性质和药物携带/递送性质，但一般总的壳厚度范围为 10-750nm。

简言之，可通过包括以下一般步骤的方法形成颗粒。制备两种溶液，第一种是外层生物材料的水溶液。第二种是用于形成内层的聚合物的溶液(“聚合物  
30 溶液”)，在用于聚合物的溶剂(“聚合物溶剂”)的相对挥发性水不混溶液体中，和用于聚合物的非溶剂(“聚合物非溶剂”)的相对非挥发性水不混溶液体中。

聚合物溶剂通常是 C5-C7 酯，例如醋酸异丙酯。聚合物非溶剂通常是 C6-C20 烃，例如癸烷、十三烷、环己烷、环辛烷等。在聚合物溶液中，将聚合物和水不混溶溶剂混合在一起，搅拌以使聚合物充分溶解且两种溶剂混溶。将聚合物溶液(有机相)缓慢加入生物材料溶液(水相)中，搅拌以形成乳剂。该步骤中采  
5 用的溶液的相对浓度和有机相与水相的比率以及搅拌程度基本上决定了最终的颗粒粒径和壳厚度。乳剂完全混合后，将其分散在水中，通常轻微搅拌下加热至约 30-35℃。将交联剂如碳二亚胺或双官能团醛如戊二醛加入到混合物中，与生物材料外膜反应，使其水不溶性并稳定外层。

新形成的外层的内芯包含含有聚合物、聚合物溶剂和聚合物非溶剂的溶  
10 液，各个具有不同的挥发性。挥发性更高的聚合物溶剂蒸发或被稀释，在挥发性较低的非溶剂存在下聚合物沉淀。因此，在具有生物材料(外)层的内表面的界面形成沉淀的薄膜。随着稀释、蒸发等导致挥发性更高的聚合物溶剂浓度的降低，沉淀形成颗粒的内层。形成的颗粒芯主要包含聚合物非溶剂。

在这一阶段，收集形成的颗粒，并将其配制入含有空芯颗粒所述浓度范围  
15 的叔丁醇和一种或多种无定形糖中的一种或两种、以及任何任选所需的辅料和/或表面活性剂的水悬浮液中。可将离心、过滤或其它方式收集的颗粒悬浮在含所需量的叔丁醇、无定形糖及任选地辅料和表面活性剂的水溶液中，制备水悬浮液。或者，例如通过渗滤或稀释(或其它方式或方式的组合)，将形成颗粒的溶剂系统改为悬浮介质，和溶解在水性溶剂系统中的叔丁醇、无定形糖和  
20 任何所需的辅料和/或表面活性剂，以提供本发明水性颗粒悬浮液。

然后冷冻干燥该水悬浮液，得到通常为冻干块形式的干燥、可重建的颗粒  
25 组合物。冻干的含水颗粒悬浮液中包括无定形糖可将冻干产物中的颗粒聚集减至最低程度。包含叔丁醇可进一步抑制冻干、干燥组合物重建后发生的颗粒聚集。无定形糖保留在干燥、冻干颗粒组合物中，而大部分叔丁醇被除去。无论是在颗粒形成、悬浮液加工期间或是刚好在冻干前加入到颗粒悬浮液中作为辅料，这些添加剂的使用倾向于提供具有高孔隙率和表面积冻干块。这些添加剂还可通过提供待除去的水和溶剂通道，增加冻干期间的干燥速率。它们还可使冻干块具有比不含它们制备的冻干产物高的表面积，有利于后续的重建步骤。

30 如美国专利 6,193,951 和共同待批美国专利申请序列号 09/637,516(WO 01/12071)所述，通过将形成外表面的生物材料的 pH 维持在高于或低于等电点

( $P_i$ )至少一个到两个 pH 单位,可进一步将形成颗粒期间这些双层颗粒的聚集减至最低程度。或者,可使用表面活性剂在  $P_i$  或接近  $P_i$  配制颗粒,以稳定抵抗过度聚集。在任一种情况下,注射入受试者的干燥、冻干组合物的缓冲系统应是生理学上相容的。

5 可以每容器含总重量约 1-50mg 空芯颗粒或 1-700mg 实芯颗粒的单位容器形式提供干燥、冻干的颗粒组合物。用作超声造影剂成像循环系统的颗粒通常具有平均粒径约 3 微米,粒径范围约 1-10 微米。通常,不到 5%的颗粒粒径大于约 10 微米。或者,用于超声成像淋巴系统的颗粒具有平均粒径范围约 200-800nm,如共同待批美国专利申请序列号 09/637,516 (WO01/12071)中所

10 述。

本发明一个具体实施例中的颗粒具有交联白蛋白的外层。白蛋白可以是与二醛交联剂如戊二醛交联的人血清白蛋白。颗粒还具有聚(D,L-丙交酯)的内层,包封填充有气体或气体混合物(例如,空气、氮气、全氟碳等)的空芯。为了诸如递送药物或一些其它药物活性剂的应用,芯可填充有药物。或者,内层还可

15 包含药物,如果药物可在形成内层期间与可生物降解的聚合物共沉淀,如下所述。

在一个具体的实施方式中,将戊二醛交联的白蛋白/聚丙交酯颗粒配制入含所述重量比的叔丁醇、所述重量比的蔗糖和聚乙二醇、甘氨酸和泊洛沙姆(重量比如下所述)的水性悬浮液中,使得冻干后,干燥冻干组合物中的颗粒包含在聚

20 乙二醇、甘氨酸、蔗糖和泊洛沙姆(如泊洛沙姆 188)的骨架中。泊洛沙姆是与数字后缀联用的非专有名词,用于食品、药品或化妆品中各种独特的产物鉴定。

重建时,产物通常每毫升包含约 0.3-6 mg 的空芯颗粒或 0.3-84 mg 的实芯颗粒,然而应理解,可加入任何量的重建介质以提供超过本文所述的浓度范围。重建介质还可以是等渗的,使得重建产物的最终渗量浓度基本上不取决于

25 使用的重建介质的体积。

在形成具有交联白蛋白外层和聚(D,L-丙交酯)内层的空芯颗粒的一个具体实施方式中,首先制备包含构成外层的白蛋白的 pH 调节的水溶液。在一个实施方式中,pH 约为 3-9,更优选约为 4。白蛋白可以是人血清白蛋白。可加入酸,例如盐酸来调节 pH。白蛋白浓度通常约为 4-10 重量%。白蛋白浓度超过

30 约 4 重量%时,有利于形成单分散乳剂。白蛋白浓度超过 10 重量%时,所得颗粒的聚集可成为问题。

然后,制备包含聚(D,L-丙交酯)和溶解在醋酸异丙酯(聚合物溶剂)中的环辛烷(聚合物非溶剂)的有机溶剂,并乳化入水溶液中。在一个具体的实施方式中,聚(D,L-丙交酯)的固有粘度应大于约  $0.15 \text{ dLg}^{-1}$  (0.5%氯仿溶液,  $30^\circ\text{C}$ ),以维持颗粒完整性。聚(D,L-丙交酯)的浓度约为溶液重量的 0.2-3%,以维持足够的颗粒壁强度,不导致冻干期间除去环辛烷聚合物非溶剂的过度困难。醋酸异丙酯与环辛烷的重量比约为 30:1 到 3:1。较高的比率有利于较厚和/或较强的颗粒壁。然而,比率太高可导致壁太厚而影响空芯颗粒的芯的形成。使用过量的环辛烷可导致过度易碎的颗粒壁,在循环系统的流体静力环境中破裂。

使用标准乳化技术如膜乳化,将有机溶液乳化入水溶液中。通常,约  $30^\circ\text{C}$ ,在足以提供约 4 微米大小(测量容积的)微滴的流速和压力条件下进行乳化。有机与水成分的比率约为 0.3:1 到 3:1,更优选约为 1.62:1。接近该范围上限的比率有利于颗粒单分散性。然而,使用过高的比率可产生对于加工来说是太厚的乳剂。在下限以下,所需容器的体积成为限制因素,虽然如果可获得合适的容器,可使用更低的比率。

然后,将该乳剂稀释约 3-18 倍,优选约 4-6 倍(搅拌),形成含交联剂如戊二醛的第二水溶液。第二水溶液中包含的交联剂的浓度足以使所得稀释的悬浮液中重量比(交联剂:白蛋白)约为 0.05:1 到 1:1。对于戊二醛,最终交联剂与白蛋白的重量比约为 0.2:1 产生良好结果。将该水溶液的 pH 调节至所需用途,例如 pH 约为 6-10,优选约为 pH 7-8。

稀释后,  $30^\circ\text{C}$  下继续搅拌直到醋酸异丙酯通过蒸发基本上除去。然后,将泊洛沙姆 188 溶解在水悬浮液中,一般溶解到浓度约为 0.25 重量%。

然后,将悬浮液最后过滤以除去聚集物和聚合物碎片,并用含水泊洛沙姆 188 溶液(0.25 重量%)渗滤以除去未反应的戊二醛和未结合的白蛋白。

可用含水泊洛沙姆 188 溶液稀释来调节悬浮液的体积,以达到所需的颗粒浓度范围 0.09-1.2 重量%(0.9-12 mg/ml 悬浮液)。在一个具体的实施方式中,将颗粒浓度调节至 0.5 重量%。

单独制备浓缩的水性辅料溶液,并加入到颗粒悬浮液中,产生本发明水性颗粒悬浮液。水性辅料溶液包含叔丁醇和/或一种或多种无定形糖,在一个具体的实施方式中是蔗糖,浓度足以使所得重量比(成分重量:颗粒重量)为 30:1 到 600:1(叔丁醇)和 0.3:1 到 12:1(蔗糖),如上所述。在一个具体的实施方式中,水性辅料溶液包含重量比分别为 105:1 和 1.5:1 的叔丁醇和蔗糖。

水性辅料溶液还包含一种或多种辅料和/或表面活性剂，如上所述。在一个具体的实施方式中，浓缩的水性辅料溶液还包含平均分子量约为 2200-8000(优选约为 3400; PEG3350)的聚乙二醇(PEG)、泊洛沙姆(优选泊洛沙姆 188)和甘氨酸，浓度足以使所得水性悬浮液中的重量比 (成分:颗粒)分别约为 6:1 到 300:1(PEG)，0:1 到 60:1(泊洛沙姆)和 0:1 到 75:1 (甘氨酸)。在一个具体的实施方式中，浓缩的水性辅料溶液中包含这些辅料，以使所得水性颗粒悬浮液中的重量比分别为 17.3:1(PEG)、3.6:1(泊洛沙姆)和 7.2:1(谷氨酸)。

冷却条件下，按照约 1 份悬浮液对 2 份浓缩的辅料溶液的比例，将颗粒悬浮液和浓缩的辅料溶液混合到一起。然而，将悬浮液分装入容器如小瓶中，冷冻至干燥，降低的氮气压力下塞盖。小瓶通常包含有用单位量的颗粒，通常约为 2-200mg 的空芯颗粒或 2-2800mg 的实芯颗粒/克干燥、冻干组合物。

加水(或其它生理学上可接受的缓冲液)可重建冻干组合物，形成渗量浓度约为 200-300mOs/kg 的生理学上可接受的、可注射的微粒悬浮液。包含空芯颗粒的本实施方式干燥、冻干的组合物具有以下组分的浓度比率：

成分	成分重量/颗粒重量的比率		
	低	高	具体实施方式
聚乙二醇, NF	6:1	300:1	17.3:1
泊洛沙姆, NF	0:1	60:1	3.6:1
无定形糖	0.3:1	12:1	1.5:1
甘氨酸, USP	0:1	75:1	7.2:1

15

典型的包含有用单位量的空芯颗粒的干燥、冻干组合物具有以下组成：

成分	mg/小瓶	重量%
聚丙烯交酯/白蛋白颗粒	5.0	3.3
聚乙二醇 3350, NF	86.7	56.6
泊洛沙姆 188, NF	18.0	11.7
蔗糖, NF	7.5	4.9
甘氨酸, USP	36.0	23.5
总计	153.2	100.0

小瓶或其它包含干燥、冻干颗粒组合物的封闭和/或密封容器具有良好的储存期，用水易于重建以形成可注射的超声成像剂。对于空芯颗粒来说，重建的悬浮液可包含以下浓度的以下成分：

成分	mg/ml
聚丙烯交酯/白蛋白颗粒	1.5-2.5
聚乙二醇 3350, NF	43.35
泊洛沙姆 188, NF	9.0
蔗糖, NF	3.75
甘氨酸, USP	18.0
注射用水, USP	适量

5 优选通过推注或通过输注将重建的产物注射入受试者的血流中，然后与一种或多种诊断成像和/或靶向药物或药物递送方法联合使用。

#### 实施例

以示例性方式提供下面的实施例，而不是限制本发明。

#### 实施例 1

10 本实施例说明无定形糖蔗糖和/或叔丁醇降低空芯的戊二醇交联的白蛋白/聚丙烯交酯微球在冻干和重建期间聚集的能力。

制备环辛烷填充的空芯白蛋白/聚丙烯交酯微球

15 通过将聚合物溶解在溶剂混合物中，制备包含 48.4 gm 聚(D, L-丙交酯) (0.5%氯仿中的固有粘度 0.41dL/gm, 30°C)、0.666 kg 环辛烷和 4.450 kg 醋酸异丙酯的有机溶液。搅拌下，将该有机溶液缓慢加入到 3.25 kg 已用 10% HCl 调节 pH 至 4.0 的 5 重量% USP 级人血清白蛋白溶液中。保持温度 30°C，将所得混合液循环通过烧结的不锈钢过滤器板(frit)。该过程产生平均体积液滴大小约为 4 微米的水包油乳剂。制备含 30kg 0.1% 戊二醛水溶液的水溶液。用 1N NaOH 将 pH 调节至 7.2-8.0。然后，搅拌下，将约 6.8 kg 乳剂加入到浴中。于 20 30°C 连续搅拌浴，干燥氮气流越过混合物，直到通过蒸发基本上除去醋酸异丙酯(过夜)。除去醋酸异丙酯后，将悬浮液冷却至 18°C，将泊洛沙姆 188 加入到所得悬浮液中，加入的量足以产生最终浓度 0.25 重量%。深层过滤该悬浮液，以除去微囊聚集物和聚合物碎片。为除去过量的戊二醛、形成的盐和未结合的

白蛋白，浓缩悬浮液，然后使用 0.65 微米中空纤维 TFF，通过对约 7 体积 0.25 重量%的泊洛沙姆 188 水溶液进行渗滤来洗涤。用水性泊洛沙姆 188(0.25 重量%)稀释渗滤的悬浮液，产生微球浓度为 5mg 微球壳重量/克悬浮液的悬浮液。用 Malvern 2000 粒径分析仪测定稀释的悬浮液中微球的粒径分布，发现体积

5 峰粒径为 3.86 微米。

#### 空芯微球制剂和冻干

使用下表所列的成分和浓度(按重量计)，分别制备四种不同的水溶液用作冻干辅料。

冻干辅料溶液	制剂名称			
	1	2	3	4
叔丁醇	26.25%	26.25%	0%	0%
聚乙二醇	4.34%	4.34%	4.34%	4.34%
甘氨酸	1.8%	1.8%	1.8%	1.8%
泊洛沙姆 188	0.9%	0.9%	0.9%	0.9%
蔗糖	0.38%	0%	0.38%	0%
去离子水	66.3%	66.7%	92.6%	93.0%

然后，以 1 份重量悬浮液对 2 份重量辅料溶液的比率，用四种制备的辅料

10 配制稀释的微球悬浮液。将所得制剂各自以 3ml/小瓶分装入 10ml 血清瓶中，然后用 FTS Dura-Stop 冻干机且氮气下加盖，冻干形成干燥块。该冻干过程中，微球的环辛烷芯被除去，形成空芯氮气填充的微球。

现在干燥的悬浮物的小瓶在 2ml 去离子水中重建，然后用 Malvern 2000 粒径分析仪测定悬浮液中微球的粒径分布。粒径测定的结果如下表所示。表中

15 衍生的统计学数据是基于微球粒径的体积频率直方图并代表 3 个小瓶的平均值。

	制剂#1	制剂#2	制剂#3	制剂#4
模式粒径	3.68 $\mu$ m	3.86 $\mu$ m	4.07 $\mu$ m	5.21 $\mu$ m
平均粒径	3.78 $\mu$ m	4.08 $\mu$ m	4.25 $\mu$ m	8.18 $\mu$ m
90 <sup>th</sup> 百分位 d(v,0.9)	5.61 $\mu$ m	6.52 $\mu$ m	6.71 $\mu$ m	13.63 $\mu$ m
微球体积直径>7 $\mu$ m 的百分比	2.18%	7.17%	8.23%	34.38%

## 结果

微球的聚集物将被粒径分析仪表示为单个较大的微球。如果微球的聚集物减少,这将被粒径测定反映为向下位移。比较表中的粒径直方图统计学数据(见图 1A-1D),揭示向较小粒径微球的趋势,因而在含蔗糖或叔丁醇的悬浮液制剂(制剂 2 和 3)中的聚集比不含上述成分的制剂(制剂 4)中的聚集少。而且,当同时存在蔗糖和叔丁醇(制剂 1)时,对降低微球聚集似乎有附加的作用。

对制剂 1 和制剂 4 的显微镜观察定性地证实制剂 4 中存在的微球聚集度比制剂 1 要大得多。

## 10 实施例 2

本实施例证明无定形糖蔗糖和/或叔丁醇降低实芯、白蛋白包覆的聚丙交酯微球在冻干和重建期间聚集的能力。

### 制备白蛋白包覆的实芯聚丙交酯微球

15 用去离子水稀释,从 25% USP 级人血清白蛋白(HAS)溶液制备 6%水溶液。用 6M HCl 将溶液的 pH 调节至 4。独立地,通过将聚合物溶解于醋酸异丙酯中,制备 10%的聚(D,L-丙交酯)溶液。保持温度 30℃,搅拌下将 42mL 有机溶液缓慢加入到 25ml 制备的 HAS 溶液中。然后,将所得粗 o/w 乳剂循环通过不锈钢烧结的金属滤器。接着,用去离子水将乳剂稀释成 4 倍体积,搅拌下加入到  
20 400ml 保持于 30℃的去离子水中。加入稀释的乳剂时,将 1ml 25%的戊二醛和 2ml 1 当量的 NaOH 立即加入到搅拌浴中。继续搅拌约 3 小时,直到醋酸异丙酯蒸发。3 小时后,将 5ml 15%的泊洛沙姆 188 溶液加入到微球悬浮液中。离心收集微球,并用 0.25%泊洛沙姆 188 水溶液洗涤 3 次。用 Malvern 2000 粒径分析仪测定微球的粒径,发现体积峰粒径为 4.34 微米。

25

### 实芯聚丙交酯微球制剂和冻干

用 0.25%泊洛沙姆 188 稀释实芯聚丙交酯微球悬浮液,得到浓度约为 2.5E+9 颗粒/ml 的微球。独立地,用下表所列的成分和浓度(按重量计),制备 4 种不同的水溶液用作冻干辅料。

30

冻干辅料溶液	制剂名称			
	1	2	3	4
叔丁醇	26.25%	26.25%	0%	0%
聚乙二醇	4.34%	4.34%	4.34%	4.34%
甘氨酸	1.8%	1.8%	1.8%	1.8%
泊洛沙姆 188	0.9%	0.9%	0.9%	0.9%
蔗糖	0.38%	0%	0.38%	0%
去离子水	66.3%	66.7%	92.6%	93.0%

然后，以 1 份重量悬浮液对 2 份重量辅料溶液的比率，用 4 种制备的辅料配制稀释的微球悬浮液。将所得制剂各自分装入 10ml 血清瓶中，然后用 FTS Dura-Stop 冻干机且氮气下加盖，冻干形成干燥块。

## 5 粒径测定

冻干后，将小瓶在 2ml 去离子水中重建，用 Malvern 2000 粒径分析仪测定悬浮液中微球的粒径分布。粒径测定的结果如下表所示。表中衍生的统计学数据是基于微球粒径的体积频率直方图并代表 3 个小瓶的平均值。

	制剂名称			
	1	2	3	4
模式粒径	5.66 $\mu\text{m}$	5.99 $\mu\text{m}$	7.28 $\mu\text{m}$	9.48 $\mu\text{m}$
平均粒径	6.22 $\mu\text{m}$	7.77 $\mu\text{m}$	8.06 $\mu\text{m}$	12.75 $\mu\text{m}$
90 <sup>th</sup> 百分位 d(v,0.9)	10.57 $\mu\text{m}$	12.23 $\mu\text{m}$	13.82 $\mu\text{m}$	23.24 $\mu\text{m}$
微球体积直径 >7 $\mu\text{m}$ 的百分比	12.2%	17.6%	25.2%	45.4%

## 10 结果

微球的聚集物将被粒径分析仪表示为单个较大的微球。如果微球的聚集物减少，这将被粒径测定反映为向下位移。比较表中的粒径直方图统计学数据(见图 2A-2D)，揭示向较小粒径微球的趋势，因而在含蔗糖或叔丁醇的悬浮液制剂(制剂 2 和 3)中的聚集比不含上述成分的制剂(制剂 4)中的聚集少。而且，当同

15 时存在蔗糖和叔丁醇(制剂 1)时，对降低微球聚集似乎有附加的作用。

### 实施例 3

本实施例证明蔗糖浓度对从空芯微球的芯中除去残留溶剂的作用。

如实施例 1 所述制备环辛烷填充的微球。使用下表所列成分和浓度(按重量计), 蔗糖浓度增加, 分别制备 4 种水溶液用作冻干辅料。

冻干辅料溶液	制剂名称			
	1	2	3	4
叔丁醇	26.25%	26.25%	26.25%	26.25%
聚乙二醇	4.34%	4.34%	4.34%	4.34%
甘氨酸	1.8%	1.8%	1.8%	1.8%
泊洛沙姆 188	0.78%	0.78%	0.78%	0.78%
蔗糖	0.0%	0.15%	0.38%	0.6%
去离子水	66.83%	66.68%	66.45%	66.23%

- 5 然后, 以 1 份重量悬浮液对 2 份重量辅料溶液的比率, 用 4 种制备的辅料配制稀释的微球悬浮液。将所得制剂各自以 3ml/小瓶分装入 10ml 血清瓶中, 然后用 FTS Dura-Stop 冻干机且氮气下加盖, 冻干形成干燥块。该冻干过程中, 微球的环辛烷芯被除去, 形成空芯氮气填充的微球。

- 10 气相色谱法分析产物小瓶中残留的环辛烷。结果如下表所示:

制剂编号	残留环辛烷(微克/小瓶)
1	10.6 $\mu$ g
2	13.4 $\mu$ g
3	274 $\mu$ g
4	926 $\mu$ g

### 实施例 4

本实施例证明叔丁醇对从空芯微球的芯中除去残留溶剂的作用。

- 15 如实施例 1 所述制备环辛烷填充的微球。使用下表所列成分和浓度(按重量计), 叔丁醇浓度增加, 分别制备 5 种水溶液用作冻干辅料。

冻干辅料溶液	制剂名称				
	1	2	3	4	5
叔丁醇	0%	15%	26.25%	30%	37.5%
聚乙二醇	4.34%	4.34%	4.34%	4.34%	4.34%
甘氨酸	1.8%	1.8%	1.8%	1.8%	1.8%
泊洛沙姆 188	0.78%	0.78%	0.78%	0.78%	0.78%
蔗糖	0.38%	0.38%	0.38%	0.38%	0.38%
去离子水	92.58%	77.58%	66.33%	62.58%	55.08%

然后，以 1 份重量悬浮液对 2 份重量辅料溶液的比率，用 5 种制备的辅料配制稀释的微球悬浮液。将所得制剂各自以 3ml/小瓶分装入 10ml 血清瓶中，然后用 Virtis Ultra-35XL 冻干机且氮气下加盖，冻干形成干燥块。该冻干过程中，微球的环辛烷芯被除去，形成空芯氮气填充的微球。

气相色谱法分析产物管中残留的环辛烷。结果如下所示：

制剂编号	残留环辛烷(微克/小瓶)
1	1654 $\mu$ g
2	483 $\mu$ g
3	152 $\mu$ g
4	92 $\mu$ g
5	79 $\mu$ g

提出上述本发明具体实施方式和实施例是为了示例和说明的目的，虽然已由某些上述实施例阐明本发明，不应理解为被这些实施例所限制。它们不是排它性的或将本发明限于所述的精确形式，很明显根据上述说明，许多改进、实施方式和变化是可能的。本发明的范围包括本文所述类别领域，由所附权利要求书及其等价形式限定。

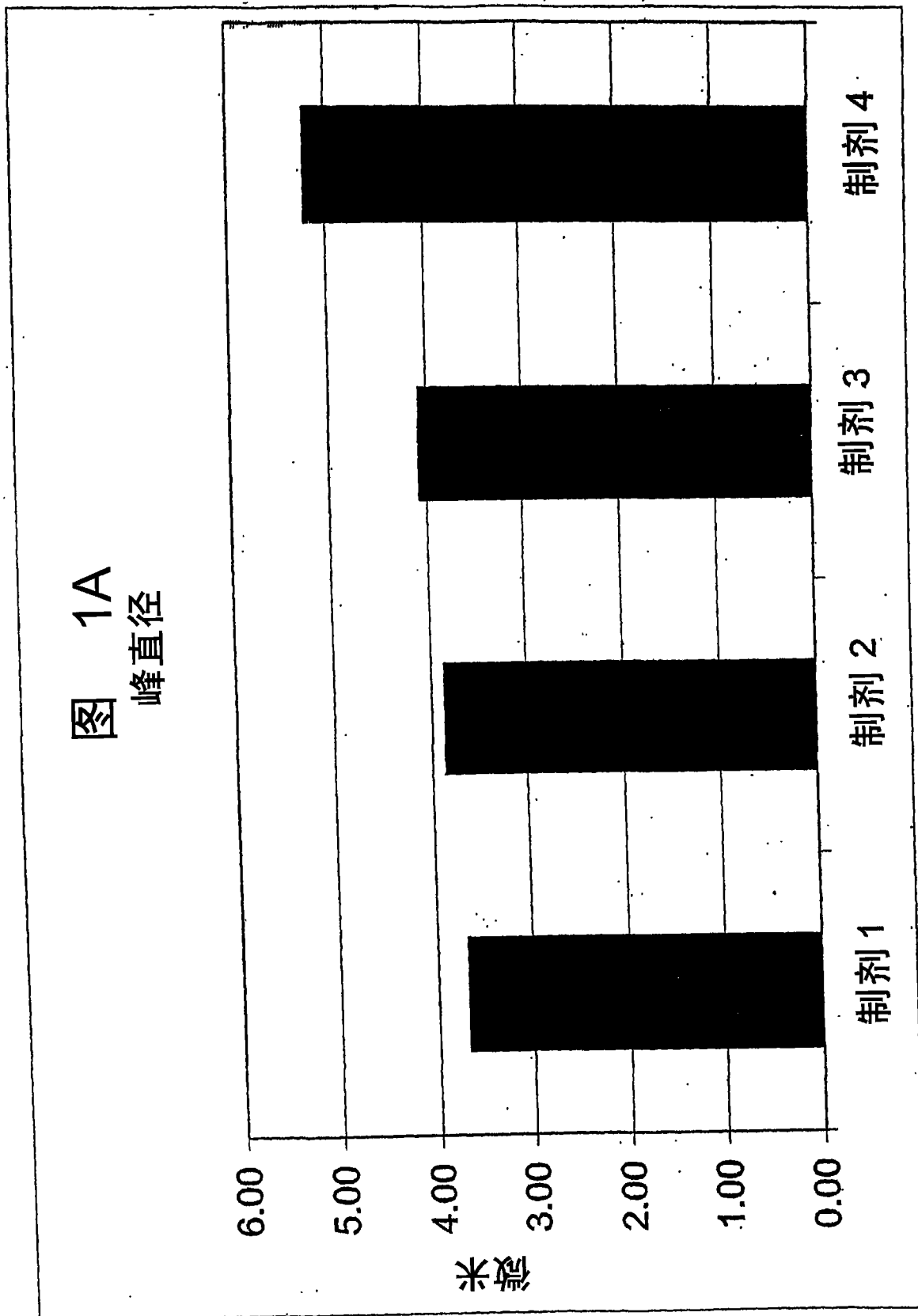
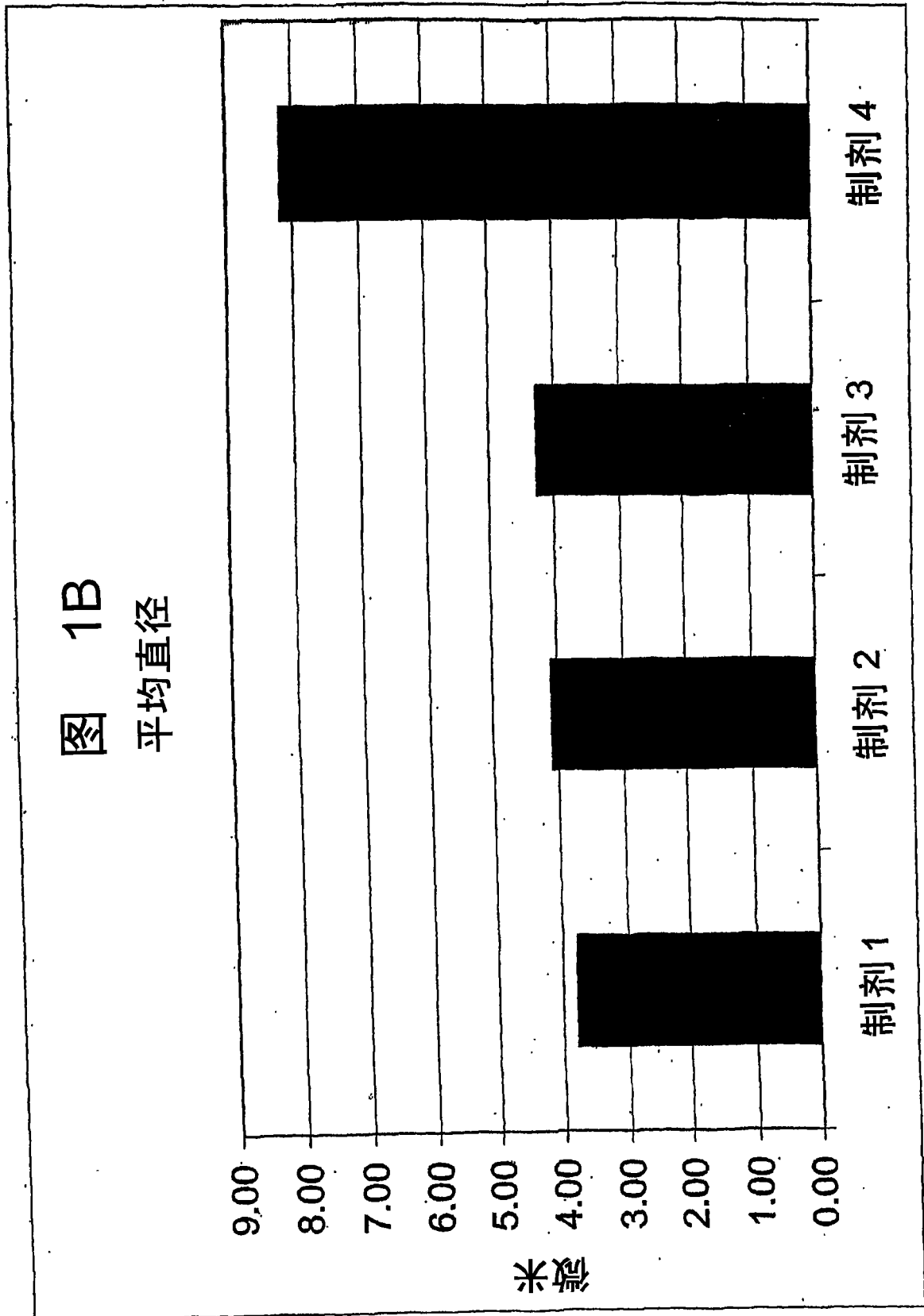
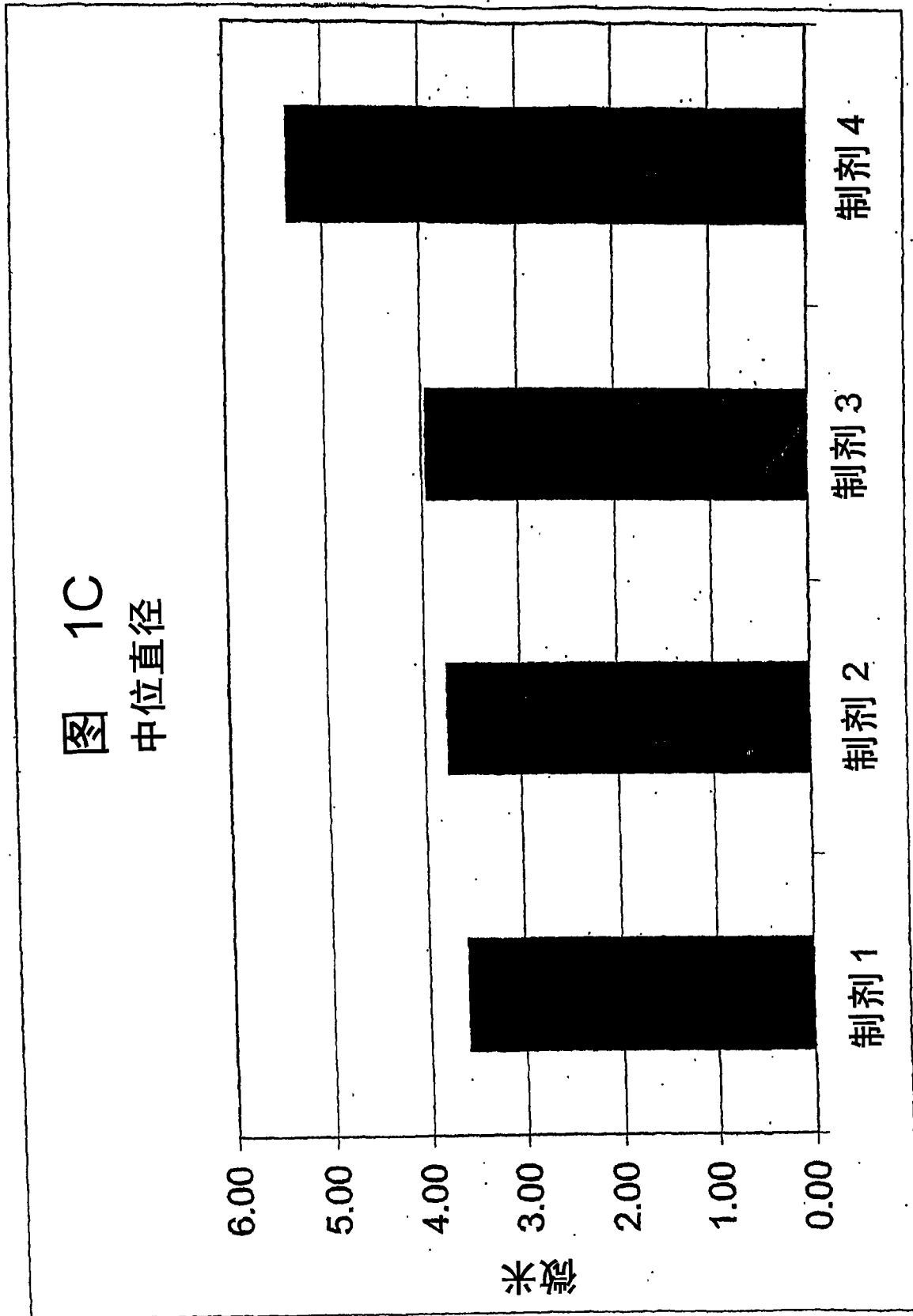
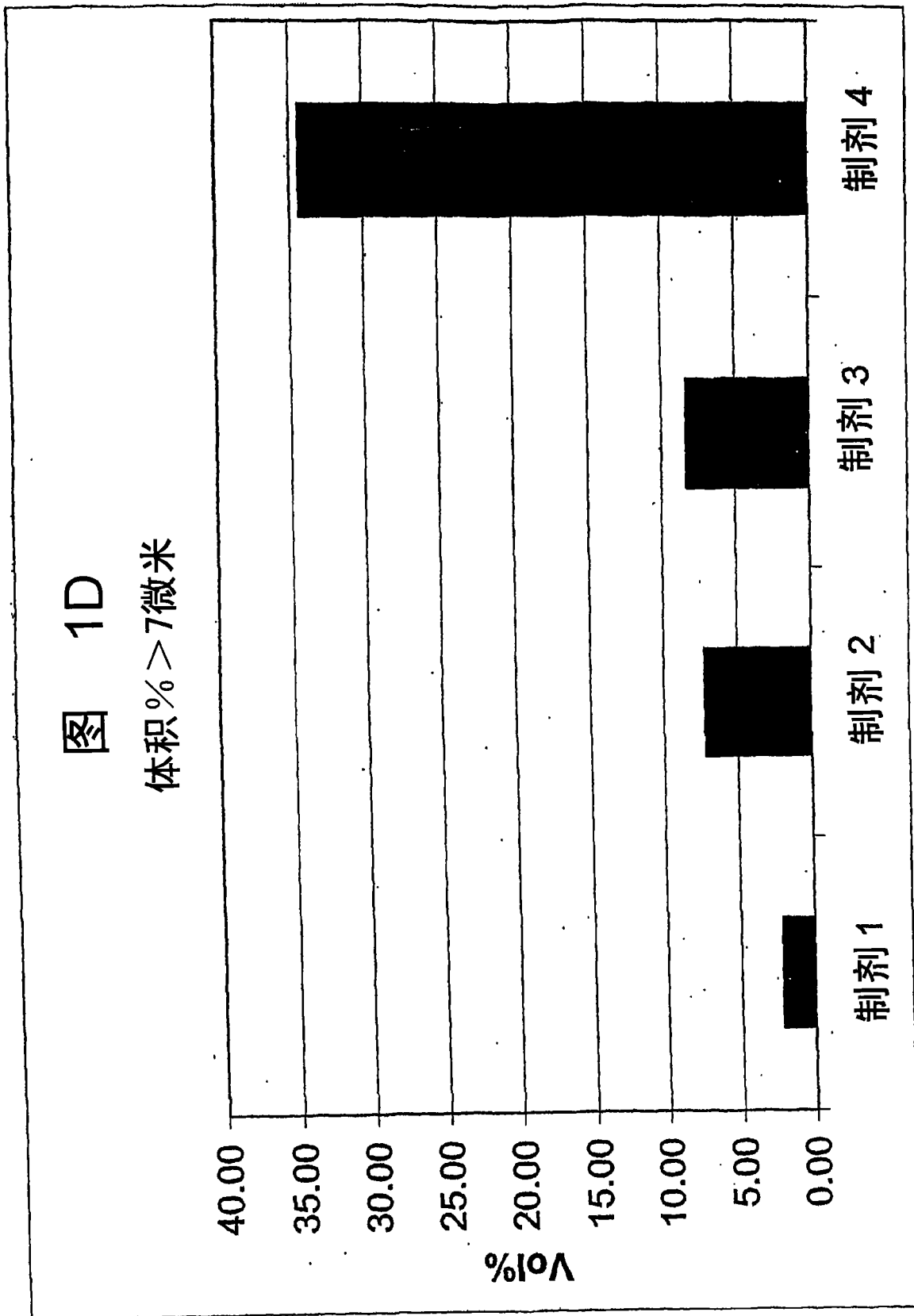


图 1B  
平均直径







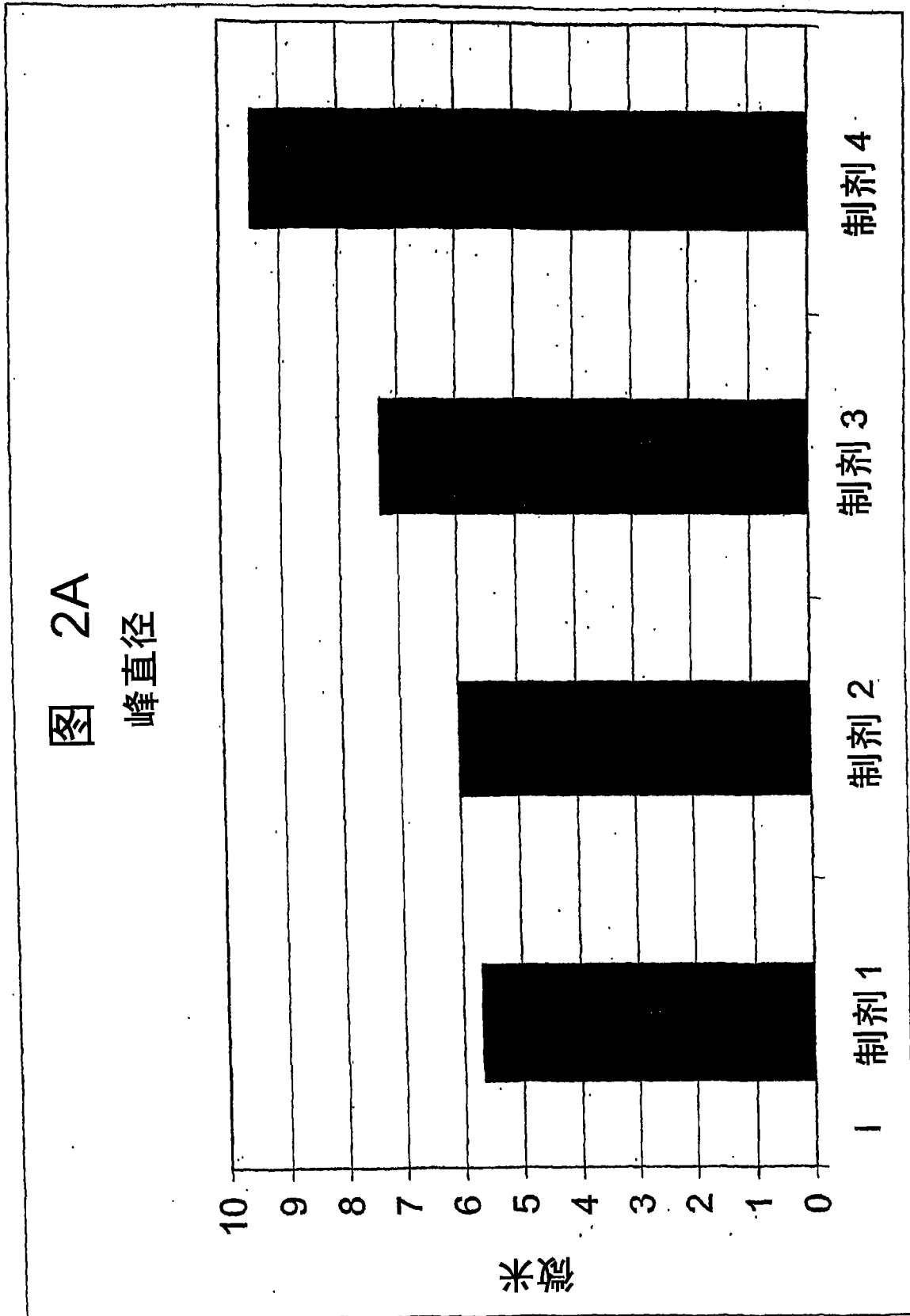
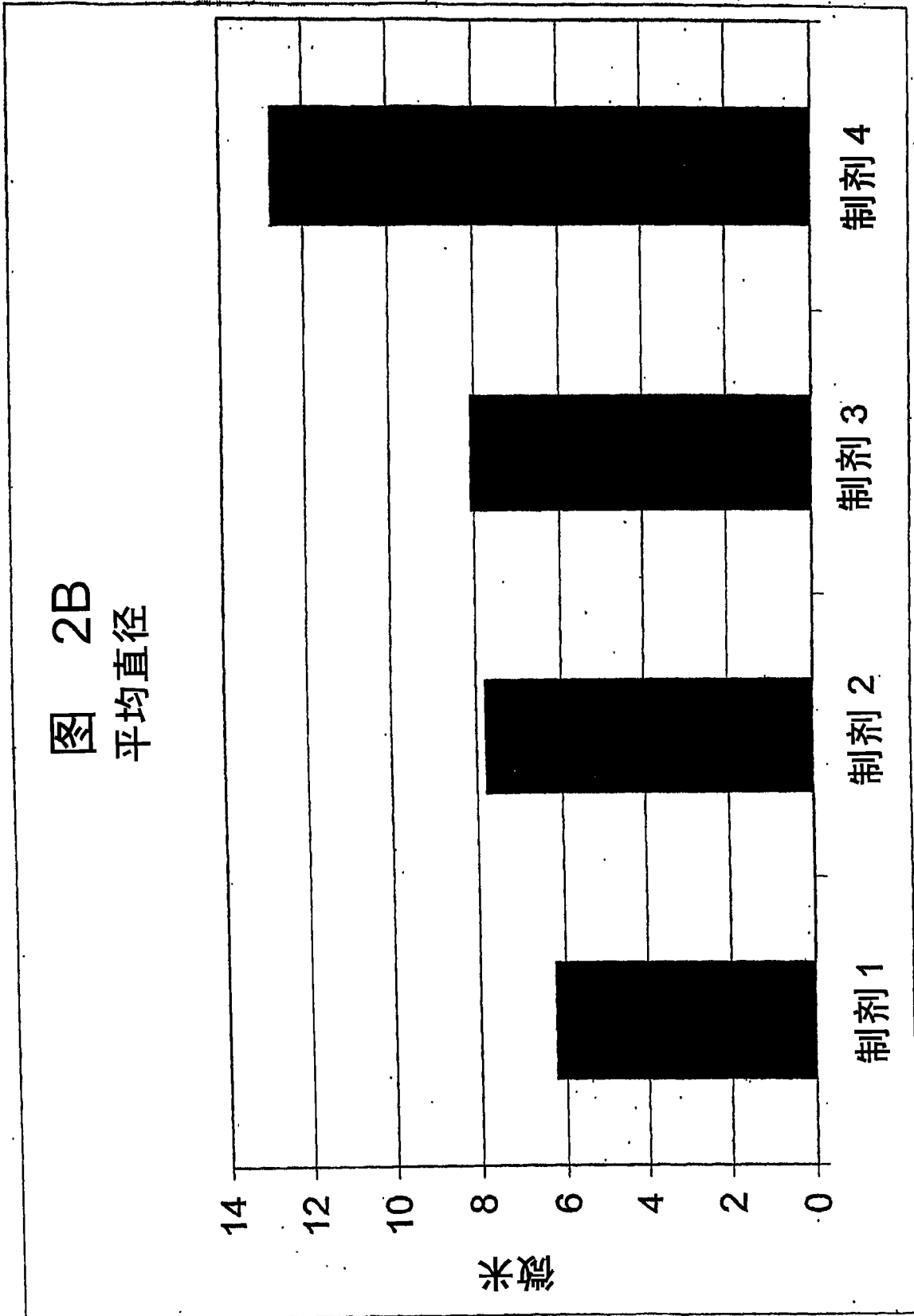
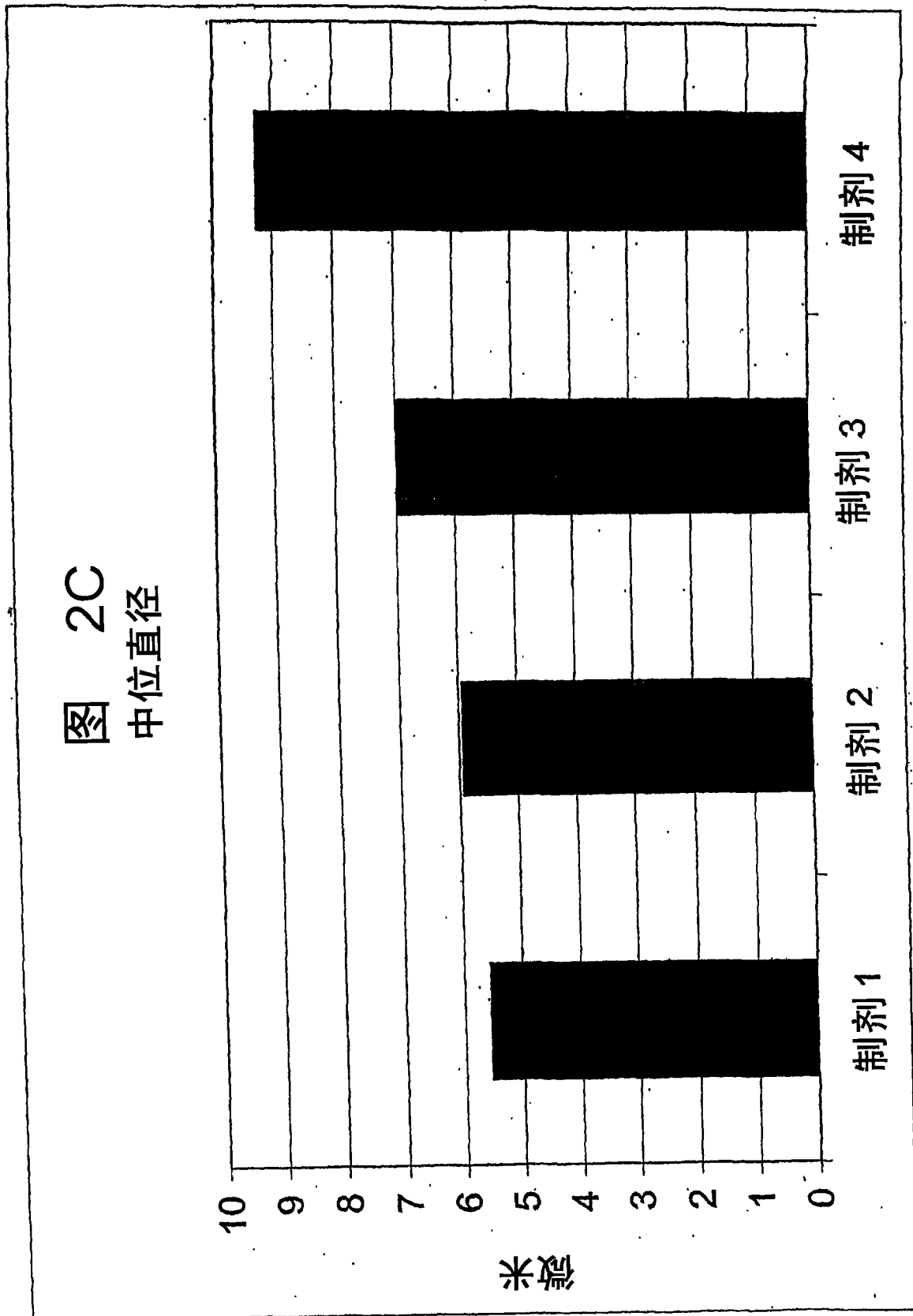
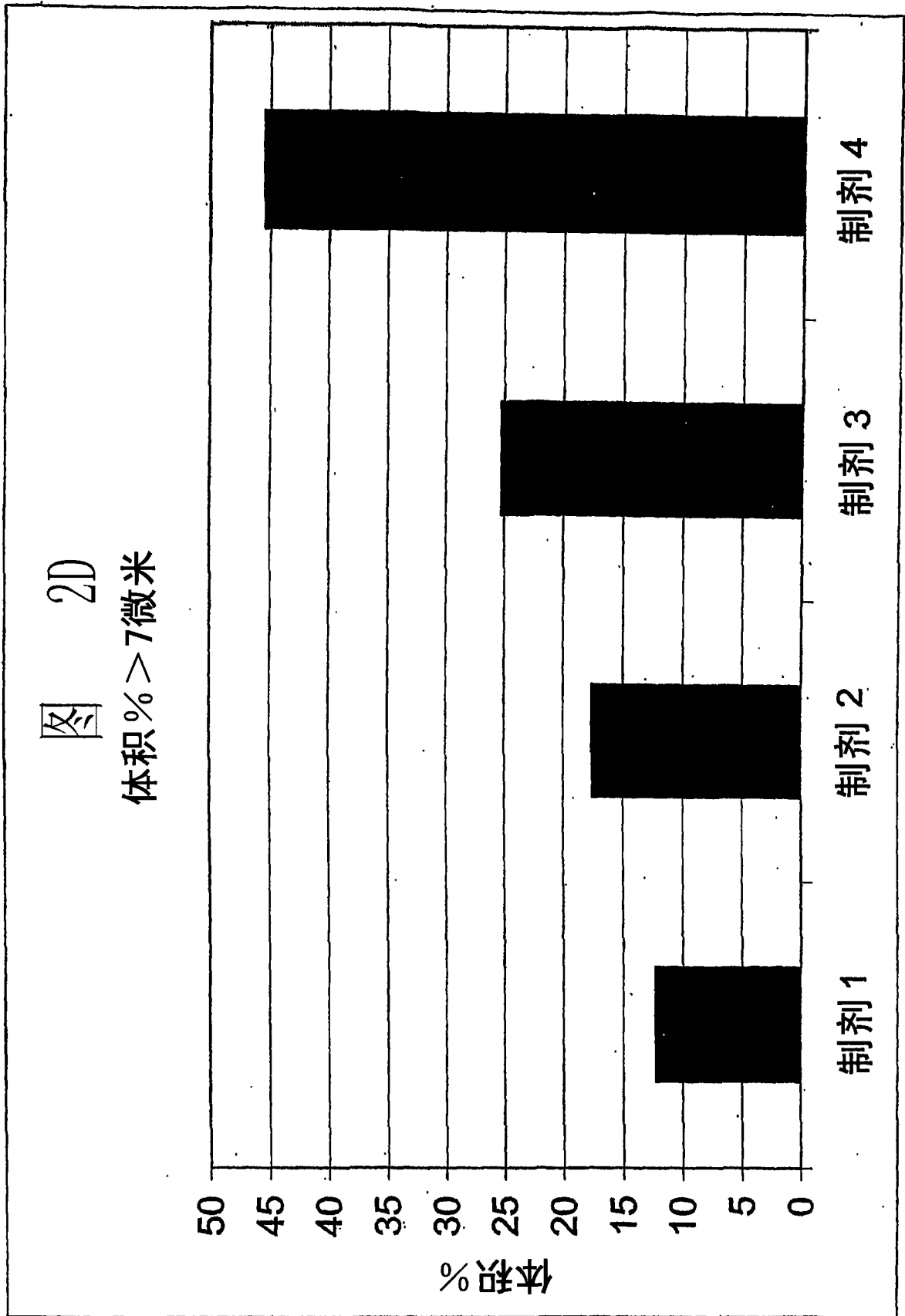


图 2B  
平均直径







专利名称(译)	用作超声造影剂的可重建微球组合物		
公开(公告)号	<a href="#">CN1893877A</a>	公开(公告)日	2007-01-10
申请号	CN200480032532.8	申请日	2004-11-01
[标]发明人	TB奥托波尼 RE肖特		
发明人	T·B·奥托波尼 R·E·肖特		
IPC分类号	A61B8/00 A61K9/127		
优先权	60/517219 2003-10-31 US 10/977100 2004-10-28 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

提供了用于制备易于重建的微球或纳米球的干燥组合物的方法和悬浮液。该干燥组合物可用于诊断应用如超声成像。该悬浮液包含特定量的叔丁醇和/或无定形糖(或无定形糖的混合物)作为关键成分，以降低构成悬浮液的颗粒的聚集。

