

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS  
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN  
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 910596 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS  
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG  
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE  
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 910596

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -  
International patent classification  
A61K 49/00  
A61K 9/16  
A61K 47/30  
A61K 39/44

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 07.02.1991

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 07.02.1991

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 10.08.1991

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

09.02.1990 DE 4004430

(71) Hakija - Sökande - Applicant

**1 • Schering Aktiengesellschaft**, Müllerstrasse 178, 13353 Berlin, SAKSA, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

**1 • Rössling, Georg**, Berlin 28, SAKSA, (DE)

**2 • Albayrak, Celal**, Germany, SAKSA, (DE)

**3 • Rothe, Matthias**, Germany, SAKSA, (DE)

**4 • Siegert, Joachim**, Germany, SAKSA, (DE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

**Kolster Oy Ab**, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

**Polyaldehydeistä syntetisoituja varjoaineita**

**Syntetiserade kontrastmedel av polyaldehyd**

## Polyaldehydeistä syntetisoituja varjoaineita

5 Keksintö koskee patenttivaatimuksista tunnettua kohdetta eli uusia mikrohiukkasia, näitä sisältäviä farmaseuttisia aineita, niiden käyttöä ultraäänidiagnostiikassa sekä menetelmää näiden mikrohiukkasten ja farmaseuttisten aineiden valmistamiseksi.

10 On tunnettua, että injektoimalla perifeerisesti liuoksia, jotka sisältävät hienoja kaasurakkuloita, voidaan saada aikaan kardiaalisiä kaikukontrasteja (Roelandt J., Ultrasound Med. Biol. 8 (1982) 471-492). Nämä kaasurakkulat saadaan fysiologisesti siedettäväksi liuoksiksi esimerkiksi ravistelemalla, käyttämällä perinpohjaista sekoitusta tai lisäämällä hiilidioksidia. Ne eivät kuiten-  
15 kaan ole lukumäärän ja koon suhteen yhtenäisiä eikä niitä voida tuottaa riittävän toistettavasti. Ne eivät tavallisesti ole myöskään stabiloituja, niin että niiden kestoikä on vähäinen. Niiden keskimääräiset halkaisijat ovat enim-  
20 mäkseen suurempia kuin erytrosyytit, niin että niiden ei ole mahdollista päästä keuhkokapillaareihin, joten niiden avulla ei ole mahdollista varjostaa sellaisia elimiä kuten sydämen vasenta puolta, maksaa, munuaisia tai pernaa. Sitä paitsi ne eivät sovi kvantitatiivisiin määrityksiin, koska niiden tuottama ultraäänikaiku muodostuu useista, toisis-  
25 taan erottumattomista prosesseista kuten rakkuloiden muodostumisesta, yhteensulautumisesta ja hajoamisesta. Niinpä näiden ultraäänivarjoaineiden avulla ei ole esimerkiksi mahdollista saada selville varjostuksen kulun mittausta käyttäen siirtoaikoja sydänlihaksessa.

30 EP 0 131 540:ssä on kuvattu kaasurakkuloiden stabilointia sokerin avulla. Sen avulla paranee tosin varjostusilmiön toistettavuus ja homogeenisuus, mutta nämä rakkulat eivät pääse keuhkoihin.

35 EP 0 122 624:ssä ja 0 123 235:ssä on kuvattu, että sokerien, sokerialkoholien ja suolojen kaasurakkuloita

stabiloiva vaikutus paranee lisättäessä tensidejä. Näillä ultraäänivarjoaineilla on saavutettu keuhkokapillaareihin pääsy ja mahdollisuus kuvata valtimon suonihaaraa ja erilaisia elimiä kuten maksaa ja pernaa. Varjovaikutus on  
5 tällöin kuitenkin rajoittunut suoniaukkoon, koska rakkulat eivät pääse kudossoluihin.

Mikään tähän asti tunnetuista ultraäänivarjoaineista ei jää pitemmäksi ajaksi muuttumattomana kehoon. Elin-  
ten kuvaaminen, niin että signaali-intensiteetti on riit-  
10 tävä selektiivisen rikastumisen vaikutuksesta i.v. -annon jälkeen, tai kvantitatiivinen määrittäminen ei ole sen vuoksi mahdollista.

Kaasujen kuten esimerkiksi ilman kapselointia ultraäänivarjoaineeksi kuvataan DE-hakemusjulkaisussa  
15 3 803 972. Tässä yhteydessä käytetty seinämämateriaali koostuu biologisesti hajoavasta synteettisestä materiaalista kuten ennen kaikkea syanakrylaatista ja polylaktidista.

Nämä mikrohiukkaset ovat kuitenkin - erityisesti  
20 suurehkoissa mittakaavassa sekä niiden työstettävyyden suhteen - vaikeasti valmistettavissa. Ennen kaikkea hiukkasten laaja kokojakauma on haittana.

Sen vuoksi oli olemassa tarve saada aikaan ultraäänivarjoaineita, joilla ei ole näitä haittoja. Tämä tehtävä  
25 ratkaistaan tämän keksinnön avulla eli valmistamalla keksinnön mukaisia mikrohiukkasia.

Nämä mikrohiukkaset, jotka koostuvat biologisesti hajoavista polymeereistä, ovat tunnettuja siitä, että ne  
30 syntetisoidaan polymeroituvista aldehydeistä, jotka sisältävät haluttaessa kopolymeroitumiskykyisiä lisäaineita ja/tai ristiliittäjiä, mahdollisesti tensideistä tai tensidiseoksista, kaasuista ja/tai helposti haihtuvista nesteistä vapaana tai sidottuna, kytkentäaineista, mahdollisesti näiden kytkentäaineiden välityksellä liittyneistä

bio- tai makromolekyyleistä sekä mahdollisesti diagnosti-  
sesti tai terapeuttisesti vaikuttavista aineosista.

Mikrohiukkasten rakentumiseen pääasiassa osallistu-  
vat polymeroidut aldehydit valikoidaan seuraavista poly-  
meroituvista aldehydeistä:

I.  $\alpha, \beta$ -tyydyttymättömät aldehydit kuten esimerkiksi  
akroleiini, krotonialdehydi, propionaldehydi

II.  $\alpha$ -substituoidut akroleiinijohdannaiset kuten  
esimerkiksi  $\alpha$ -metyyliakroleiini,  $\alpha$ -klooriakroleiini,  $\alpha$ -  
fenyliakroleiini,  $\alpha$ -etyyliakroleiini,  $\alpha$ -isopropyliakro-  
leiini,  $\alpha$ -n-butyliakroleiini,  $\alpha$ -n-propyyliakroleiini

III. dialdehydit kuten esimerkiksi glutaarialdehy-  
di, sukkinialdehydi tai niiden johdannaiset tai niiden se-  
okset kopolymeroitumiskykyisten lisäaineiden kanssa kuten  
esimerkiksi  $\alpha$ -substituoidut akroleiinit,  $\beta$ -substituoidut  
akroleiinit, etyyliakrylaattit, metyyliakrylaattit, buty-  
yliakrylaattit, heksyyliakrylaattit, metakrylihapot, metak-  
rylihapot, akrylihappokloridit, metakrylihappokloridit,  
akryliinitriili, metakryliinitriilit, akryliamidit, subs-  
tituoidut akryliamidit, hydroksimetakrylaattit, mesityylioksidi,  
dimetyliaminoetyylimetakrylaatti-2-vi-  
nylipyridiinit, N-vinyli-2-pyrrolidinoni

Edullisia ovat tällöin akroleiini ja glutaarialde-  
hydi.

Mahdollisesti mikrohiukkasten rakentumiseen osal-  
listuvat tensidit valikoidaan ionisista tai ionittomista  
pinta-aktiivisista aineista (tensidit) kuten esimerkiksi

polyetyleenioksidi, polyoksietyleenipolyoksipropy-  
leenit kuten Pluronic® F 68, Pluronic® F 108, Pluronic®  
F 127, polyetyleeniglykoli, Poloxamin 908, Polaxamer 407  
karboksyylihapposuolat kuten esimerkiksi natriumo-  
leaatti

polyoksietyleenirasvahappoesterit kuten esimerkik-  
si: polyoksietyleenistearaatti

natriumdioktyylisulfosukkinaatti, polyglutaarialdehydinatriumvetysulfiitti-liitännäinen, polyakroleiininatriumvetysulfiitti-liitännäinen, polyvinyylisulfonihappo. Niitä voidaan käyttää yksin tai seoksinaan.

- 5            Näistä edullisia ovat: polyglutaarialdehydinatriumsulfiitti-liitännäinen, polyakroleiininatriumvetysulfiittiliitännäinen, Pluronic® F 68, Pluronic® F 108 ja Pluronic® F 127.

- 10           Jos mikrohiukkasten rakentumiseen käytetyillä polymeroituvilla aldehydeilla on pinta-aktiivisia ominaisuuksia, voidaan välttyä tensidien käytöltä. Esimerkkinä sellaisista aldehydeista mainittakoon glutaarialdehydi.

- 15           Mikrohiukkasten vapaassa tai sidotussa muodossa sisältämiksi kaasuiksi tai helposti haihtuviksi nesteiksi - edullisia ovat tällöin nesteet, joiden kiehumispiste on alle 60 °C - sopivat mm.:

- 20           ammoniakki, ilma, jalokaasut tai jalokaasuyhdisteet (helium, neon, argon, ksenon, krypton), rikkihalogenidit kuten esimerkiksi rikkiheksafluoridi, typpi, hiilen oksidit, happi, vety,

- 25           hiilivedyt tai niiden seokset kuten esimerkiksi: metaani, etaani, propaani, butaani, pentaani, neopentaani, isopentaani, syklopentaani, eteeni, propeeni, asetyleeni, 3,3-dimetyyli-1-butyyni, 2,3-pentadieeni, 2-metyyli-2-buteeni, 2-metyyli-1,3-butadieeni, 2-butyyni, 2-metyyli-1-buteeni, 3-metyyli-1-buteeni,

- 30           halogenoidut hiilivedyt tai seokset, kuten esimerkiksi: dikloorimetaani, 1,1-dikloorieteeni, isopropyylikloridi, dibromidifluorimetaani, bromimetaani,

- 35           eetterit kuten esimerkiksi: dimetyylieetteri, dietyylieetteri tai fluoratut eetterit,

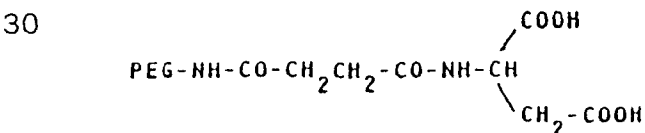
- tai yhdisteet kuten esimerkiksi: dimetyyliaminoasetoni, propyleenioksidi, N-etyylimetyyliamiini, N-etyylidimetyyliamiini, furaani.

Edullisia ovat tällöin: ilma, argon, ksenon, rikkiheksafluoridi, propaani, butaani ja furaani.

Mikrohiukkasten rakentumiseen osallistuviksi kyt-kentäreagensseiksi sopivat ennen kaikkea:

- 5 I. aminoryhmiä sisältävät yhdisteet kuten esimerkiksi hydroksyyliamiini, butyyliamiini, allyyliamiini, etanoliamiini, trishydroksimetyyliaminometaani, 3-amino-1-propaanisulfonihappo, 5-aminovaleriaanahappo,  $\beta$ -amino-oktaanihappo, D-glukosamiinihydrokloridi, aminogalaktoosi, 10 aminosorbiitti, aminomanniitti, dietyyliaminoetyyliamiini, aniliini, sulfoniilihappoamidi, koliini, N-metyylyglukamiini, piperatsiini, 1,6-heksaanidiamiini, urea, hydratsiini, glysiini, alaniini, lysiini, seriini, valiini, leusiini, peptidit, proteiinit, albumiini, ihmisseerumalbumiini, 15 polylysiini, gelatiini, polyglykoli-amiinit, aminopolyalkoholit, dekstraanisulfaatit, joissa on aminoryhmiä, N-aminopolyetyleeniglykoli ( $\text{HO-PEG-NH}_2$ ), N,N'-diaminopolyetyleeniglykoli ( $\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$ ), vasta-aineet, immunoglobuliinit

- 20 II. happoryhmiä sisältävät yhdisteet kuten esimerkiksi: karboksyylihapot etikkahappo, propionihappo, voi-happo, valeriaanahappo, kapronihappo, kapryylihappo, kapriinihappo, lauriinihappo, myristiinihappo, palmitiinihappo, 25 steariinihappo, öljyhappo, linolihappo, linoleenihappo, sykloheksaanikarboksyylihappo, fenyylietikkahappo, bentsyylietikkahappo, klooribentsoehappo, bromibentsoehappo, nitro-bentsoehappo, ortoftaalihappo, metaftaalihappo, paraftaalihappo, salisyyliahappo, hydroksibentsoehappo, aminobentsoehappo, metoksibentsoehappo,



(PEG-kytkijä-asparagiinihappo)

- 35 PEG-kytkijä-glutamiinihappo, PEG-kytkijä-DTPA, PEG-kytkijä-EDTA

III. hydroksyyliiryhmiä sisältävät yhdisteet kuten esimerkiksi alkoholit metanoli, etanoli, propanoli, butanoli, pentanoli, heksanoli, heptanoli, oktanoli, dekanoli, dodekanoli, tetradekanoli, heksadekanoli, oktadekanoli, isopropyylialkoholi, isobutyylialkoholi, isopentyylialkoholi, syklopentanoli, sykloheksanoli, krotyylialkoholi, bentsyylialkoholi, fenyylialkoholi, difenyylietanoli, trifenyylietanoli, kanelialkoholi, etyleeniglykoli, 1,3-propaanidioli, glyseriini, pentaerytriitti

IV. polymeroitumiskykyiset aineet kuten  $\alpha$ , $\beta$ -tyydyttymättömät aldehydit kuten esimerkiksi akroleiini, krotonialdehydi, propionaldehydi

$\alpha$ -substituoidut akroleiinijohdannaiset kuten esimerkiksi  $\alpha$ -metyyliakroleiini,  $\alpha$ -klooriakroleiini,  $\alpha$ -fenyyliakroleiini,  $\alpha$ -etyyliakroleiini,  $\alpha$ -isopropyyliakroleiini,  $\alpha$ -n-butyyliakroleiini,  $\alpha$ -n-propyyliakroleiini

dialdehydit kuten esimerkiksi glutaarialdehydi, sukkinaldehydi tai niiden johdannaiset tai niiden seokset kopolymeroitumiskykyisten lisäaineiden kanssa kuten esimerkiksi  $\alpha$ -substituoidut akroleiinit,  $\beta$ -substituoidut akroleiinit, etyyliisyaaniakrylaattit, metyyliisyaaniakrylaattit, butyyliisyaaniakrylaattit, heksyyliisyaaniakrylaattit, metyyliimetakrylaattit, vinyylialkoholit, akryylihapot, metakryylihapot, akryylihappokloridit, akryliinitriili, metakryliinitriilit, akryyliamidit, substituoidut akryyliamidit, hydroksimetyyliimetakrylaattit, mesityylioksidi, dimetyyliaminoetyyliimetakrylaatti-2-vinyylipyridiinit, N-vinyyli-2-pyrrolidinoni

Näistä edullisia ovat: hydroksyyliamiini, trishydroksimetyyliaminometaani, 3-amino-1-propaanisulfonihappo, D-glukosamiinihydrokloridi, aminomanniitti, urea, ihmisalbumiini, hydratsiini, proteiinit, polyglykoliamiinit, aminopolyalkoholit kuten esimerkiksi HO-PEG-NH<sub>2</sub> tai NH<sub>2</sub>-PEG-NH<sub>2</sub> tai happoryhmiä sisältävät yhdisteet kuten esimerkiksi PEG-kytkijä-asparagiinihappo, PEG-kytkijä-glutamiinihappo,

PEG-kytkijä-DTPA ja PEG-kytkijä-EDTA, jolloin polyetyleeniglykolin (PEG) molekyylipaino on korkeintaan 100 000 d, edullisesti alle 40 000 d.

5 Kohdassa I mainitut kytkentäreagenssit ovat kondensoituneet aminoryhmänsä välityksellä polymeroituneista aldehydeistä ja mahdollisesti tensideistä rakentuneiden mikrohiukkasten pinnalla oleviin formyyliiryhmiin.

10 Samoin formyyliiryhmien välityksellä ovat liittyneet kohdassa IV esitetyt monomeerit, jotka ovat polymeroituneet muiden monomeerien kanssa.

Kohdissa II ja III mainitut hapot ja alkoholit ovat sitä vastoin kytkeytyneet vasta aiemmin tapahtuneen aldehydiryhmän muuttumisen jälkeen mikrohiukkasiin.

15 Valitsemalla sopivia, näiden kytkentäreagenssien välityksellä liittyneitä bio- tai makromolekyyliä kuten esimerkiksi entsyymejä, dekstraaneja, immunoglobuliineja, monoklonaalisia vasta-aineita (ks. myöhemmin), saadaan keksinnön mukaisia mikrohiukkasia, joilla on yllättävän suuri kudos- ja elinspesifisyys.

20 Keksinnön mukaiset mikrohiukkaset sisältävät mahdollisesti diagnostisesti tai terapeuttisesti tehokkaita aineosia tuumorien diagnoosiin ja hoitoon, kuten esimerkiksi doksorubisiiniä, aktinomysiiniä, magnetiittiä, mitomysiini C:tä, triamkinolonia.

25 Keksinnön mukaisilla mikrohiukkasilla on alussa kuvatut halutut ominaisuudet. Ne ovat valmistettavissa yksinkertaisesti ja saanto on hyvä. Valmistuksen mittakaavan suurennus (up-scaling) kuten myös mikrohiukkasten puhdistus on myös ongelmatonta.

30 Hiukkasilla on kapea kokojakauma (monodisperssi); tällöin on mahdollista vaihdella hiukkasten kokoa aina lähtöaineiden käytetyn pitoisuuden mukaan suurella alueella (ks. myöhemmin). Säättämällä valmistusolosuhteita (esimerkiksi pH-arvoa) on mahdollista vaihdella myös molekyylipainoa laajalla alueella.

35



Toinen etu on siinä, että reaktio mikrohiukkasten syntetisoimiseksi voidaan suorittaa monia eri vaihtoehtoja käyttäen, esimerkiksi: anioninen polymerointi muuttamalla pH-arvoa, kationinen polymerointi esimerkiksi rautasuolilla, radikaalipolymerointi UV-valolla ja ionisoivalla säteilyllä.

Mikrohiukkasten valmistukseen käyttökelpoinen laaja lämpötila-alue (-5 - +80 °C) tekee mahdolliseksi yksinkertaisen kokeen ohjauksen optimaalisin saannoin käyttämällä hyvin erilaisia kaasuja tai helposti kiehuvia nesteitä.

Hiukkaset sisältävät vapaita aldehydiryhmiä, jotka voidaan kemiallisten reaktioiden avulla kytkeä muihin molekyyliin kovalenttisesti. Tämä mahdollisuus tekee mahdolliseksi muuttaa hiukkasten pinnan ominaisuuksia halutulla tavalla vaikuttamatta kaikuominaisuuksiin. Valitsemalla sopivia molekyylejä voidaan vaikuttaa kolloidiseen pysyvyyteen. Siten estetään erityisesti kolloidisissa systeemeissä usein esiintyvä aglomeroitumisilmiö. Tämä taas on suureksi eduksi stabiilin formuloinnin kehittämiseksi.

Stabiilisuuteen vaikuttamisen lisäksi tarjoutuu mahdollisuuksia muuttaa hiukkasten pintaa niin, että lääkeaineiden vastaanotto (drug-targeting) on mahdollista. Tämä tapahtuu liittämällä sopivia bio- tai makromolekyylejä (esimerkiksi monoklonaalisia vasta-aineita), jotka saavat aikaan suuren kudosisäilytyksen (G. Gregoriadis, G. Poste, Targeting of Drugs, Plenum Press 1988, New York) tai vaikuttamalla hiukkasten pintaominaisuuksiin molekyylien adsorption avulla (esimerkiksi tensidit).

Riippuen näiden molekyylien valinnasta ja mikrohiukkasten koosta voidaan saada aikaan hiukkasten rikastuminen tuumoreihin/tuumoreille ja esimerkiksi keuhkoihin, maksaan, pernaan ja luuytimeen. Rikastuminen luuytimeen saavutetaan erityisesti siten, että pieniä hiukkasia (< 100 nm) päällystetään esimerkiksi Poloxamer 407:llä. Jos hiukkaset on päällystetty esimerkiksi Poloxamin

908:lla, näiden hiukkasten RES-systeemi voitetaan ja ne jäävät verenkiertoon (blood pool agent).

5 Vasta-aineiden avulla kytkettyjen osasten välityksellä voidaan saavuttaa hiukkasten rikastuminen tuumoreihin/tuumoreille.

Aktiivinen vastaanotto voidaan saada aikaan myös magneettiä sisältävillä mikrohiukkasilla. Käyttämällä ulkoista magneettikenttää hiukkaset rikastuvat haluttuihin paikkoihin suonensisäisessä systeemissä. Näin on olemassa  
10 mahdollisuus tutkia virtausolosuhteita esimerkiksi verisuonissa.

Magneetiilla kuormitettujen hiukkasten avulla on myös mahdollista tuottaa ulkopuolelta säteilevän muuttuvan magneettikentän avulla paikallisesti korkeita lämpötiloja.  
15 Tätä voidaan käyttää terapeuttisesti hyväksi esimerkiksi tuumoreiden hajottamiseen (hypertermiaterapia). Muuttuvan magneettikentän käytön lisäksi voidaan käyttää ultraäänikenttää. Myös tällöin syntyy voimakkaita paikallisia lämpötilankohoamisia.

20 Keksinnön mukaisten mikrohiukkasten valmistus tapahtuu siten, että 0 - 40 %, edullisesti 0,01 - 10 % w/v tensidiä (tensidejä) ja 0 - 10 % w/v diagnostisesti tai terapeuttisesti tehokkaita aineosia ja kaasuja tai helposti haihtuvia nesteitä sisältävä vesiliuos saatetaan reagoimaan samalla sekoittaen lämpötilassa -5 °C - +80 °C,  
25 edullisesti 0 °C - 40 °C, pH-arvon ollessa 7 - 14, edullisesti 9 - 13, 1 min - 24 tunnin aikana, edullisesti 1 tunnin - 10 tunnin aikana, ja mahdollisesti johtamalla samalla kaasua kopolymeroitumiskykyis(t)en aldehydi(e)n kanssa,  
30 jo(i)ta on pitoisuuteen 0,1 - 50 %, edullisesti 3 - 20 % w/v saakka reaktioseoksesta, sekä kopolymeroitumiskykyisten lisäaineiden kanssa, joita on 0 - 20 %, edullisesti 1 - 5 % w/v reaktioliuoksesta, ristiliittäjän/-liittäjien kanssa, jo(i)ta on 0 - 5 %, edullisesti 0,1 - 1 % w/v reaktioseoksesta, sen jälkeen - mahdollisesti puhdistuksen  
35

jälkeen - niin saadut mikrohiukkaset saatetaan reagoimaan vesiliuoksen kanssa, joka sisältää - aldehydin määrän suhteen - korkeintaan ekvimolaarisen määrän kytkentäainetta sekä 0 - 20 %, edullisesti 0,01 - 10 % w/v tensidiä (tensidejä) kokonaistilavuuden suhteen, samalla sekoittaen 3 päivään asti, edullisesti 2 päivään asti, lämpötiloissa 0 °C - 60 °C, edullisesti 5 °C - 30 °C, pH-arvon ollessa 3 - 9, edullisesti 5 - 8, ja - haluttaessa puhdistuksen jälkeen - nämä sidotaan mahdollisesti bio- tai makromolekyyleihin.

Ensimmäisen reaktiovaiheen jälkeen saaduilla polymeerialdehydihiukkasilla on pinnalla aldehydiryhmiä. Näiden aldehydiryhmien avulla voidaan toteuttaa aldehydeille tyypilliset reaktiot (R.C. Schulz, Kolloidzeitschrift und Zeitschrift für Polymere, 182 (1-2), 99 (1961); Lehrbuch der organischen Chemie "Organicum", VEB Verlag der Wissenschaften, Berliini 1984). Siten on mahdollista liittää hiukkasten pinnalle molekyylejä, jotka muuttavat pintaominaisuuksia.

Esimerkkejä aldehydiryhmien mahdollisista reaktioista:

pelkistys alkoholiksi

hapetus hapoiksi

oksiimin muodostus

imiinin muodostus, mahdollisesti sen jälkeinen hydraus ja mahdollisesti sen jälkeinen N-alkylointi

hydratsonin muodostus, mahdollisesti sen jälkeinen hydraus

merkaptalisointi

asetalisointi

disproportointi NaOH:lla (Cannizzaro-reaktio)

aldolikondensaatio

Aminoryhmäpitoisten molekyylien kytkeminen ensimmäisessä reaktiovaiheessa muodostuneisiin hiukkasiin suoritetaan saattamalla reagoimaan aldehydiryhmien kanssa.

Tällöin valitaan esimerkiksi seuraavat kokeelliset olosuhteet:

5 1000 mg polyakroleiinihiukkasia suspendoidaan tislattuun veteen. Tähän hiukkassuspensioon lisätään 5000 mg reagoivia aineita ja sekoitetaan huoneenlämpötilassa. Sekoitusta jatketaan reagoinnin reaktionopeutta vastaavasti; pienillä reaktionopeuksilla 48 tuntiin saakka. Sen jälkeen hiukkassuspensio dialysoidaan (molekyyllipainoraja 10000 d).

10 Jos esimerkiksi edellä esitetyissä reaktioissa liitetyt substituentit sisältävät (mahdollisesti väliaikaisesti suojattuja) funktionaalisia ryhmiä, nämä voidaan muuttaa alan ammattilaisen tuntemin menetelmin bio- tai makromolekyyliin liittämiseen sopiviksi reaktiivisiksi

15 ryhmiksi. Edullisia sellaisia ryhmiä ovat esimerkiksi maleimidobentsyyli-, 3-sulfomaleimidobentsyyli-, 4-(maleimidometyyli)sykloheksyylikarbonyyli-, 4-[3-sulfo(maleimidometyyli)sykloheksyylikarbonyyli-, 4-(p-maleimidofenyyli)-

20 butyryyli-, 3-(2-pyridyyliditio)propionyyli-, metakryloyyli(pentametyyleeni)amido-, bromiasetyyli-, jodiasetyyli-, 3-jodipropyli-, 2-bromimetyyli-, 3-merkaptopropyli-, etyyliesteri-, t-butyliesteri-, amino-, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alkyyliamino-, aminokarbonyyli-, hydratsiino-, hydratsiinokarbonyyli-, maleimido-, metakryyliamido-, metakryloyylihydratsiinokarbonyyli-,

25 maleimidamidokarbonyyli-, halogeeni-, merkapto-, hydratsiinotrimetyyleenihydratsiinokarbonyyli-, aminodimetyleeniamidokarbonyyli-, bromikarbonyyli-, fenyleenidiatsonium-, isotiosyanaatti-, semikarbatsidi-, tiosemikarbatsidi-, isosyanaattiryhmä.

30 Aminoryhmä voidaan muuttaa esimerkiksi kirjallisuudesta tunnettujen menetelmien avulla (esimerkiksi tiofosgeenilla kaksifaasisysteemissä, S. Scharma, Synthesis 1978, 803, D.K. Johnson, J. Med. Chem. 1989, vol. 32, 236) isotiosyanaattiryhmäksi.

Saattamalla aminoryhmä reagoimaan halogeenietikka-happohalogenidin kanssa voidaan saada aikaan  $\alpha$ -halogeeni-asetamidirymä (JACS 1969, vol. 90, 4508; Chem. Pharm. Bull. 29 (1), 128, 1981), joka sopii samoin kuin esimerkiksi isotiosyanaattiryhmä bio- ja makromolekyylien kyt-

5 kenttään.

Substituentiksi, joka voidaan muuttaa makro- tai biomolekyyliin sitomiseen sopivaksi funktionaaliseksi ryhmäksi, sopivat muun muassa hydroksyyli- ja nitrobentsyyli-,

10 li-, hydroksyyli- ja karboksialkyyli- sekä tioalkyyli-ryhmät, joissa on korkeintaan 20 hiiliatomia. Ne muutetaan alan ammattilaisen tuntemin kirjallisuudessa esitetyin menetelmin [Chem. Pharm. Bull. 33, 674 (1985), Compendium of Org. Synthesis Vol. 1-5, Wiley and Sons, Inc., Houben-

15 Weyl, Methoden der organischen Chemie, osa VIII, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, J. Biochem. 92, 1413 (1982)] halutuiksi substituentteiksi (esimerkiksi amino-, hydratsiino-, hydratsiinokarbonyyli-, epoksidi-, anhydridi-, metakryloyylihydratsiinokarbonyyli-, maleimidamidokarbonyyli-,

20 nyyli-, halogeeni-, halogeenikarbonyyli-, merkapto-, isotiosyanaattoryhmä funktionaalisena ryhmänä), jolloin nitrobentsyyli-ryhmän tapauksessa täytyy ensin suorittaa katalyyttinen hydraus (esimerkiksi viitteen P.N. Rylander, Catalytic Hydrogenation over Platinum Metals, Academic

25 Press 1967) aminobentsyylijohdannaiseksi.

Esimerkkejä aromaattisiin tai alifaattisiin ryhmiin liittyneiden hydroksyyli- tai aminoryhmien muuttamiseksi ovat sopivissa liuottimissa kuten tetrahydrofuraanissa, dimetoksietaanissa tai dimetyylisulfoksidissa, kaksifaasisissa vesipitoisissa systeemeissä, kuten esimerkiksi vesi/dikloorimetaani, happoa sitovan aineen kuten esimerkiksi natriumhydroksidin, natriumhydridin tai alkali- tai maa-alkalikarbonaatin kuten esimerkiksi natrium-, magnesium-, kalium-, kalsiumkarbonaatin tai poly-(4-vinyylipyridiinin) Reillex<sup>®</sup> läsnä ollessa lämpötiloissa, jotka ovat

30

35

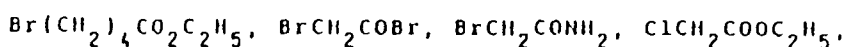
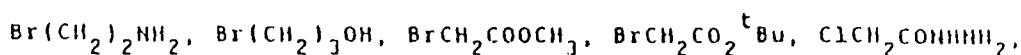
lämpötilan 0 °C ja kulloinkin käytetyn liuottimen kiehumispisteen välillä, edullisesti kuitenkin välillä 20 °C - 60 °C, suoritettut reaktiot substraatin kanssa, jolla on yleinen kaava I

5

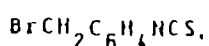
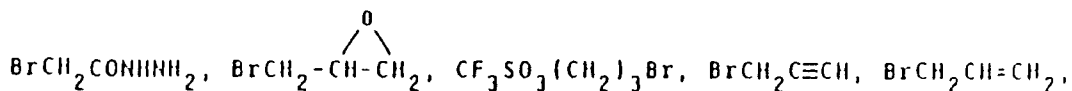


jossa Nf on nukleofiili kuten esimerkiksi Cl, Br, I, CH<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>SO<sub>3</sub> tai CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>, L on alifaattinen, aromaattinen, aryy-lialifaattinen, haaroittunut, suoraketjuinen tai syklinen  
10 hiilivetyryhmä, jossa on korkeintaan 20 hiiliatomia ja Fu on haluttu funktionaalinen ryhmä, mahdollisesti suojatussa muodossa (DE-hakemusjulkaisu 34 17 413).

15 Esimerkkeinä yleisen kaavan I mukaisista yhdisteistä mainittakoon



20



25 Karboksyyliiryhmien muuttaminen voidaan suorittaa esimerkiksi karbodi-imidimenetelmän mukaisesti (Fieser, Reagents for Organic Syntheses 10, 142), seka-anhydridin välityksellä [Org. Prep. Int. 7, 215 (1975)] tai aktivoi-dun esterin välityksellä (Adv. Org. Chem. Part B, 472).

30 Niin saadut kytkentäaineita sisältävät mikrohiukka-set voivat olla liittyneinä myös bio- tai makromolekyylei-hin, joista on tunnettua, että ne rikastuvat erityisesti tutkittavaan elimeen tai elimen osaan. Sellaisia molekyy-lejä ovat esimerkiksi entsyymit, hormoonit, polysakkaridit kuten dekstraanit tai tärkkelykset, porfyriini, bleomysii-ni, insuliini, prostaglandiinit, steroidihormoonit, amino-  
35

sokerit, aminohapot, peptidit kuten polylyysiini, proteiinit (kuten esimerkiksi immunoglobuliinit, monoklonaaliset vasta-aineet, lektiini), lipidit (myös liposomien muodossa) ja DNA- tai RNA-tyyppiä olevat nukleotidit. Erityisesti on huomattava albumiinin kanssa muodostuneet konjugaatit kuten ihmisseerumalbumiini, vasta-aineet kuten esimerkiksi monoklonaaliset, tuumoreihin liittyneille antigeeneille spesifiset vasta-aineet tai antimyosiini. Biologisten makromolekyylien sijasta voidaan liittää myös sopivia synteettisiä polymeerejä kuten polyetyleenimiinejä, polyamideja, polyureoita, polyeettereitä kuten polyetyleeniglykoleja ja polytioureoita. Näistä muodostuneet farmaseuttiset aineet sopivat esimerkiksi käytettäväksi tuumori- ja infarktidiagnostiikassa sekä tuumoriterapiassa.

Monoklonaalisisilla vasta-aineilla (esimerkiksi Nature 256 (1975) 495) on polyklonaalisiin vasta-aineisiin verrattuna sellaiset edut, että ne ovat spesifisiä yhdelle antigeeniselle determinantille, niillä on määrätty sitoutumisaffiniteetti, ne ovat homogeenisia (siten niiden puhdasvalmistus tulee oleellisesti yksinkertaisemmaksi) ja ne ovat valmistettavissa soluviljelmissä suurina määrinä. Sellaisinaan ovat tuumorikuvaukseen sopivia monoklonaaliset vasta-aineet tai niiden fragmentit Fab ja F(ab')<sub>2</sub>, jotka ovat spesifisiä esimerkiksi ihmisen maha-suolialueen, rinnan, maksan, virtsarakon ja sukurauhasten tuumoreille sekä melanoomille [Cancer Treatment Repts. 68 (1984) 317, Bio Sci 34 (1984) 150] tai ovat suuntautuneet karsinoembryonaalisesta antigeeniä (CEA), ihmisen koriogonadotropiinia (β-HCG) tai muita tuumoriin liittyviä antigeenejä kuten glykoproteiineja vastaan [New Engl. J. Med. 298 (1973) 1384, US-P 4 331 647]. Sopivia ovat muun muassa myös antimyosiini, anti-insuliini- ja antifibriinivasta-aineet (US-P 4 036 945).

Paksunsuolen syövät voidaan osoittaa diagnostisesti vasta-aineen 17-1A (Centocor, USA) mikrohiukkaskonjugaattien avulla.

Vasta-ainekonjugaattien tapauksessa vasta-aineen sitominen mikrohiukkaseen ei saa johtaa vasta-aineen anti-geeniin tapahtuvan sitoutumisaffiniteetin tai sitoutumisspesifisyyden häviämiseen tai vähenemiseen. Tämä voi tapahtua joko sitomalla glykoproteiinin Fc-osan tai Fab- tai F(ab')-fragmenttien hiilihydraattiosuuteen tai sitomalla vasta-aineen rikkiatomeihin tai vasta-ainefragmentteihin.

Ensimmäisessä tapauksessa täytyy ensin suorittaa sokeriyksiköiden hapettava lohkaus kytkeytymiskykyisten formyyli-ryhmien synnyttämiseksi. Tämä hapetus voidaan suorittaa kemiallisesti hapettimilla kuten esimerkiksi perjodihapolla, natriummetaperjodaatilla tai kaliummetaperjodaatilla kirjallisuudesta tunnettujen menetelmien avulla (esimerkiksi J. Histochem. and Cytochem. 22 (1974) 1084) vesiliuoksessa pitoisuuksilla 1 - 100, edullisesti 1 - 20 mg/ml, hapettimen pitoisuudella välillä 0,001 - 10 mmol, edullisesti 1 - 10 mmol, pH-alueella n. 4 - 8 lämpötilassa 0 - 37 °C ja reaktion keston ollessa 15 min - 24 tuntia. Hapetus voidaan suorittaa myös entsymaattisesti, esimerkiksi galaktoosioksidaasin avulla, entsyymipitoisuuden ollessa 10 - 100 yksikköä/ml, substraattipitoisuuden 1 - 20 mg/ml, pH-arvon ollessa 5 - 8, reaktion keston ollessa 1 - 8 tuntia ja lämpötilan välillä 20 - 40 °C (esimerkiksi J. Biol. Chem. 234 (1959) 445).

Hapettamalla synnytettyihin aldehydeihin liitetään mikrohiukkasia, joissa on sopivia funktionaalisia ryhmiä, kuten esimerkiksi hydratsiini, hydratsidi, hydroksyyliamiini, fenyylihydratsiini, semikarbatsidi ja tiosemikarbatsidi, antamalla reaktion tapahtua välillä 0 - 37 °C reaktion kestäessä 1 - 65 tuntia, pH-arvon ollessa välillä n. 5,5 - 8, vasta-ainepitoisuuden ollessa 0,5 - 20 mg/ml ja kompleksinmuodostajan molaarinen suhde vasta-ainealde-



hydiin 1:1 - 1000:1. Sen jälkeinen konjugaatin stabilointi suoritetaan pelkistämällä kaksoissidos esimerkiksi natriumboorihydridillä tai natriumsyaaniboorihydridillä; pelkistintä käytetään tällöin 10-100 -kertainen ylimäärä (esimerkiksi J. Biol. Chem. 254 (1979) 4359).

Toinen mahdollisuus vasta-ainekonjugaattien muodostamiseen alkaa immunoglobuliinimolekyylin disulfididisiltojen säästävästä pelkistyksestä; tällöin lohkeavat herkemät disulfididisillat vasta-ainemolekyylin H-ketjujen välillä, kun taas antigeenejä sitovan alueen S-S-sidokset jäävät koskemattomiksi, niin että käytännössä ei esiinny vasta-aineen sitomisaffiniteetin ja -spesifisyyden vähenemistä (Biochem. 18 (1979) 2226, Handbook of Experimental Immunology, Vol. 1, 2. painos, Blackwell Scientific Publications, Lontoo 1973, kappale 10). Nämä inter-H-ketjujen alueella olevat vapaat sulfhydryyliryhmät saatetaan sitten reagoimaan sopivien mikrohiukkasten funktionaalisten ryhmien kanssa lämpötilassa 0 - 37 °C pH-arvon ollessa n. 4 - 7 ja reaktion kestäessä 3 - 72 tuntia, jolloin muodostuu kovalenttinen sidos, joka ei vaikuta vasta-aineen antigeenejä sitovalla alueella. Sopivina reaktiivisina ryhminä mainittakoon esimerkiksi: halogeenialkyyli-, halogeeniase-  
tyyli-, p-elohopea(II)bentsoaatti-, isotiosyanaatti-, tio-  
li-, epoksidiryhmät sekä ryhmät, jotka voivat ottaa osaa  
Michael-additioreaktioon, kuten esimerkiksi maleiini-imidi,  
metakryyliryhmät (esimerkiksi J. Amer. Chem. Soc. 101 (1979) 3097).

Vasta-ainefragmenttien liittämiseen mikrohiukkasiin on olemassa vielä joukko sopivia, usein myös kaupallisesti saatavia kaksifunktionaalisia "kytkijöitä" (ks. esimerkiksi Pierce, Handbook and General Catalogue 1986), jotka ovat reaktiivisia sekä fragmenttien SH-ryhmien suhteen että mikrohiukkasten amino- ja hydratsiiniryhmien suhteen.

Esimerkkeinä mainittakoon: m-maleimidobentsyyli-N-hydroksisukkinimidiesteri (MBS), m-maleimidobentsyyli-N-

sulfosukkinimidiesteri (sulfo-MBS), N-sukkinimidyyli-[4-(jodiasetyyli)amino]bentsoehappoesteri (SIAB), sukkinimidyyli-4-(N-maleimidometyyli)sykloheksaani-1-karboksyylihappoesteri (SMCC), sukkinimidyyli-4-(p-maleimidofenyyli)-  
 5 voihappoesteri (SMPB), N-sukkinimidyyli-3-(2-pyridyyliiditio)propionihappoesteri (SDPD), 4-[3-(2,5-diokso-3-pyrrolinyyli)propionyylioksi]-3-okso-2,5-difenyyli-2,3-dihydrotiofeeni-1,1-dioksidi, asetyyli-alanyylileusyyli-alanyyli-amino-p-bentsyyli, asetamido-p-tioureidobentsyyli.

10 Bio- tai makromolekyyliin kytkemiseksi voidaan käyttää hyväksi myös ei-kovalenttisia sidoksia, jolloin sitomisessa voi olla mukana sekä ionisia että van der Waals- ja vetysiltasidoksia vaihtelevina osuuksina ja vah-  
 15 vuuksina (avain-lukko -periaate). Makromolekyylin suurehkoissa onkaloissa olevat pienempien kompleksien sulkeumayhdisteet ovat myös mahdollisia.

KytKentäperiaatteena on valmistaa ensin kaksifunktionaalinen makromolekyyli, niin että joko liitetään tuumoriantigeenin vastainen vasta-ainehybridomi keksinnön  
 20 mukaisen mikrohiukkasen vastaisen toisen vasta-ainehybridomin kanssa tai molemmat antigeenit sidotaan kemiallisesti kytkijän (esimerkiksi julkaisussa J. Amer. Chem. Soc. 101 (1979) 3097 esitetyllä tavalla) välityksellä toisiinsa  
 25 liittyneinä tai tuumoriantigeeniä vastaan suunnatun vasta-aineen avulla, mahdollisesti kytkijän välityksellä, avidiiniin (tai biotiiniin) [D.J. Hnatowich et al., J. Nucl. Med. 28 (1987) 1294]. Vasta-aineiden sijasta voidaan käyttää myös niiden vastaavia F(ab)- tai F(ab')<sub>2</sub>-fragmentteja. Farmaseuttista käyttöä varten injektoidaan ensin kaksifunktionaalinen makromolekyyli, joka rikastuu kohteeseen,  
 30 ja sen jälkeen jonkin ajan kuluttua keksinnön mukaiset mikrohiukkaset [mahdollisesti biotiiniin (tai avidiiniin) sidottuina], jotka sidotaan in vivo kohteeseen ja voivat siellä vapauttaa diagnostisen tai terapeuttisen vaikutuk-  
 35 sensa. Sitä paitsi voidaan käyttää myös muita kytkentäme-

netelmiä kuten esimerkiksi julkaisussa Protein Tailoring Food Med. Uses [Am. Chem. Soc. Symp.] (1985) 349 kuvattua "Reversible Radiolabeling" -menetelmää.

5 Niin kutsutun kiinteäfaasikytkennän avulla on käytettävissä erityisen yksinkertainen menetelmä vasta-ainekonjugaattien tai vasta-ainefragmenttikonjugaattien valmistamiseksi: Vasta-aine kytketään stationaariseen faasiin (esimerkiksi ioninvaihtaja), joka on esimerkiksi lasipylväässä. Käyttämällä pylvään peräkkäisiä huuhteluja aldehydiryhmien synnyttämiseen sopivalla liuoksella, pesua, 10 huuhtelua funktionalisoitujen mikrohiukkasten liuoksella, pesua ja lopuksi konjugaatin eluointia saadaan hyvin suuria konjugaattisaantoja.

Tämä menetelmä tekee mahdolliseksi automaattisen ja 15 jatkuvan konjugaattien valmistuksen haluttuina määrinä.

Myös muita kytkentävaiheita voidaan toteuttaa tällä tavalla.

20 Niinpä voidaan esimerkiksi käyttämällä yhdistelmää papaiinipelkistys/kaksifunktionaalinen kytkijä/funktionalisoidut mikrohiukkaset valmistaa fragmenttikonjugaatteja.

Niin muodostuneet yhdisteet puhdistetaan sen jälkeen edullisesti kromatografisesti.

25 Voidaan valmistaa hiukkasia, jotka ovat kooltaan 0,04 - 100 µm, edullisesti 0,1 - 40 µm. Hiukkasten kokoon voidaan oleellisesti vaikuttaa muuttamalla monomeerin alkupitoisuutta, tensidiä ja pH-arvoa.

Esimerkkejä tietyn suuruisten hiukkasten valmistuksesta:

30 1) Akroleiinipitoisuus: 10 % (w/v)  
Tensidipitoisuus: 1,5 % (w/v)  
pH-arvo: 10,0  
Lämpötila: 4 °C

Jos valitaan nämä olosuhteet, saadaan hiukkasia, joiden keskimääräinen halkaisija on 750 nm.

- 2) Akroleiinipitoisuus: 20 % (w/v)  
 Tensidipitoisuus: 0,2 % (w/v)  
 pH-arvo: 10,0  
 Lämpötila: 2 °C

5 Näissä olosuhteissa saadaan hiukkasia, joiden keskimääräinen halkaisija on 40 µm.

3) Samoissa olosuhteissa kuin kohdassa 2), mutta käyttämällä akroleiinipitoisuutta 10 % (w/v), saadaan hiukkasia, joiden keskimääräinen halkaisija on 8 µm.

- 10 4) Akroleiinipitoisuus: 10 % (w/v)  
 Tensidipitoisuus: 0,5 % (w/v)  
 pH-arvo: 11,0

Keskimääräinen hiukkasten halkaisija 560 nm

15 5) Samoissa olosuhteissa kuin kohdassa 4), mutta käyttämällä pH-arvoa 9,0, saadaan keskimääräinen hiukkaskoko 3,2 µm.

Tensidinä käytetään polyglutaarialdehydinatriumvetysulfiittiliitännäistä (PGL).

20 Polyglutaarialdehydinatriumvetysulfiittiliitännäisen (PGL) sijasta voidaan käyttää myös polyakroleiininatriumvetysulfiittiliitännäistä (PAC-SO<sub>3</sub>), ilman että on havaittavissa vaikutusta hiukkaskokoon.

PGL:n synteesi

25 Glutaarialdehydin 25-prosenttinen vesiliuos puhdistetaan aktiivihiilellä. Sen jälkeen liuoksesta poistetaan happi johtamalla vesiliuokseen typpeä. Lisäksi puskuriliuos (fosfaattipuskuri, 1 M) säädetään pH-arvoon 11. Myös puskuriliuoksesta poistetaan happi johtamalla typpeä. Puskuriliuos ja glutaarialdehydiliuos yhdistetään ja polymeroidaan typpi-atmosfäärissä 72 tuntia. Sen jälkeen polymerraatti suodatetaan ja pestään asetonilla ja vedellä. Pesty polymerraatti kuivataan alipainelämpökaapissa lämpötilassa 45 °C. 5 g polyglutaarialdehydiä liuotetaan 30 ml:aan vettä, joka sisältää 12,5 g NaHSO<sub>3</sub>:a. Liuos dialysoidaan tislattua vettä vastaan. Sen jälkeen liuos pakastekuivataan.

30

35

Keksinnön mukaiset hiukkaset voidaan suspendoida vesiliuokseen, ilman että muodostuu hiukkasten aggregaattia. Parenteraalisesti annettavissa olevien lääkevalmiste-  
muotojen valmistamiseksi voidaan käyttää vesiliuoksia,  
5 jotka sisältävät isotoniseksi tekeviä lisäaineita kuten natriumkloridia, sokerialkoholeja (manniitti, sorbiitti, ksyliitti jne.) tai sokeria (glukoosi, fruktoosi). Liuoksen pH-arvon säätämiseksi voidaan valita puskureita kuten Trometamol/HCl, sitruunahappo/NaOH jne.

10 PAC-SO<sub>3</sub>:n synteesi:

A. Kolmikaupalliseen, jossa on tiputussuppilo ja sekoitin, lisätään 100 ml tislattua vettä ja poistetaan happi johtamalla tyyppeä. Sen jälkeen tähän veteen lisätään  
1,829 g K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> ja liuotetaan. Kun K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> on liuennut täydellisesti,  
15 tähän liuokseen lisätään 20 ml juuri tislattua akroleiinia. Sen jälkeen lisätään 1,14 g AgNO<sub>3</sub>:a liuotettuna 5 ml:aan vettä ja polymeroidaan 2 tunnin ajan samalla sekoittaen. Saostunut polymeraatti erotetaan suodattamalla, pestään useita kertoja vedellä ja sen jälkeen hopeai-  
20 onien poistamiseksi suspendoidaan 1 tunnin ajan 1 l:aan vettä, johon on liuotettu 1,63 g natriumtiosulfaattia. Polymeraatti erotetaan suodattamalla ja kuivataan alipainelämpökaapissa lämpötilassa 45 °C. Kuivattu polymeraatti hienonnetaan karkeaksi huhmareessa. 10 g hienonnettua po-  
25 lymeraattia liuotetaan 100 ml:aan natriumvetysulfiittia (37 %). Sen jälkeen liuos dialysoidaan tislattua vettä vastaan (molekyylipainoraja 5000 d). Dialyssaattia käytetään tensidinä polyakroleiinimikrohiukkasten valmistukseen.

B. Pyörökolviin laitetaan 100 ml tislattua vettä. Samalla sekoittaen lisätään 20 ml juuri tislattua akrolei-  
30 inia. Sen jälkeen reaktioseoksen pH säädetään arvoon 10,5 lisäämällä NaOH-liuosta (2 M) ja tätä polymeroidaan koko ajan sekoittaen 2 tunnin ajan. Saostunut polymeraatti erotetaan suodattamalla, pestään useita kertoja vedellä ja  
35

kuivataan alipainelämpökaapissa lämpötilassa 45 °C. 10 g polymeraattia liuotetaan 100 ml:aan NaHSO<sub>3</sub>-liuosta (37 %). Liuos dialysoidaan tislattua vettä vastaan (molekyylipainoraja 5000 d). Jäännös käytetään tensidinä polyakroleiini-

5

#### Esimerkkejä

1) 100 ml valmistemuotoa sisältää:

Hiukkasia: 100 ml

Trometamolia: 2,4 mg

10

+ HCl, jotta pH = 7,4

Manniittia: 5500 mg

Vettä: ad 100 ml

2) 100 ml valmistemuotoa sisältää:

Hiukkasia: 50 mg

15

Natriumkloridia: 860 mg

Vettä: ad 100 ml

Hiukkasten kelluminen voidaan estää niin, että hiukkasten keskimääräinen tiheys tehdään ympäröivän väliaineen kanssa yhtäläiseksi.

20

Tämä voidaan saada aikaan lisäämällä aineita, joilla on suurempi tiheys (röntgenvarjoaineet, magnetiitit). Tämä mahdollisuus on käytettävissä erityisesti hiukkasilla, joissa on pieni polyaldehydipitoisuus.

25

Keksinnön mukaiset farmaseuttiset aineet sisältävät 0,1 µg - 100 mg mikrohiukkasia/ml, edullisesti 10 µg - 1 mg mikrohiukkasia/ml lääkevalmistemuotoa, ja niitä annostellaan tavallisesti annoksina 0,01 ml - 10 ml/kg, edullisesti 0,1 - 1 ml/kg ruumiinpainoa. Ne on tarkoitettu enteraaliseen ja parenteraaliseen käyttöön.

30

Hypertermiaterapiassa käyttöä varten keksinnön mukaisia farmaseuttisia aineita käytetään tavallisesti määrinä 0,001 - 10 mg, edullisesti 0,01 - 1 mg grammaa kohti tuumoria.

35

Seuraavien esimerkkien tarkoituksena on selventää keksintöä sitä kuitenkaan rajoittamatta.

## Menetelmiä varjoaineen valmistamiseksi

## 1. reaktiovaihe

5 A) Tensidiä sisältävä (0,01 - 5 % w/v) vesiliuos jäähdytetään samalla sekoittaen lämpötilaan 0 °C. Tällöin liuokseen johdetaan kaasua. Liuoksen pH säädetään NaOH:lla haluttuun arvoon (edullisesti 9 - 13). Tähän liuokseen lisätään monomeeri tai monomeeriseos. 30 min:n kuluttua sekoitusnopeutta vähennetään. Tunnin kuluttua reaktioseos laimennetaan edellä esitetyllä tensidipitoisella vesiliuoksella. Sekoitusnopeutta alennetaan vielä lisää. Neljän

10 tunnin kuluttua saostuneet kaasua sisältämättömät mikrohiukkaset dekantoidaan muusta suspensiosta erilleen ja heitetään pois. Dekantoitu suspensio dialysoidaan varjoaineen puhdistamiseksi jäljellä olevista monomeereistä.

15 Saanto: 80 - 90 %

B) Vesiliuos, joka sisältää halutun tensidi- ja monomeerimäärän, jäähdytetään lämpötilaan 0 °C. Tällöin liuoksen läpi johdetaan haluttua kaasua samalla sekoittamisen. Sen jälkeen liuoksen pH säädetään edullisesti arvoon

20 9 - 13 NaOH:lla. Tunnin kuluttua reaktioseos laimennetaan. 3 - 4 tunnin kuluttua mikrohiukkasia sisältävä suspensio erotetaan saostuneesta polymeraatista, joka heitetään pois. Suspensio puhdistetaan dialysoimalla:

Saanto: 80 - 90 %

25 Esimerkki 1

Kolviin laitetaan 91 ml 0,5-prosenttista vesipitoista tensidiliuosta. Liuoksen pH säädetään 0,2 M NaOH:lla arvoon 11. Liuoksen läpi johdetaan typpeä. Lämpötilaan 0 °C jäähdytettyyn 0,5-prosenttiseen tensidiliuokseen tiputetaan 9,5 ml juuri tislattua akroleiinia. Tunnin kuluttua reaktioseokseen lisätään vielä 100 ml 0,5-prosenttista tensidiliuosta. Kolmen tunnin kuluttua mikrohiukkaset sisältävä suspensio dekantoidaan erilleen saostuneesta polymeristä ja puhdistetaan dialysoimalla.

Esimerkki 2

Kolviin laitetaan 82 ml 0,08-prosenttista vesipitoista tensidiliuosta. Liuos jäädytetään lämpötilaan 0 °C. Jäädytettyyn liuokseen lisätään 18 ml juuri tislattua akroleiiniä. Liuokseen johdetaan koko ajan sekoittaen argonia. Tunnin kuluttua liuoksen pH säädetään 0,2 M NaOH-liuoksella arvoon 12. Kahden tunnin kuluttua lisätään 100 ml 0,08-prosenttista tensidiliuosta. Kolmen tunnin kuluttua suspensio dekantoidaan ja dialysoidaan.

Esimerkki 3

Kolviin laitetaan 70 ml 0,08-prosenttista vesipitoista tensidiliuosta, joka sisältää 10 % dimetyyliformamidia. Liuoksen pH säädetään 0,2 M NaOH-liuoksella arvoon 11,5. Liuos jäädytetään lämpötilaan 0 °C. Tällöin liuokseen johdetaan typpeä. Tähän liuokseen tiputetaan 30 ml juuri tislattua akroleiiniä. Tunnin kuluttua liuokseen lisätään 100 ml 0,08-prosenttista tensidiliuosta. Neljän tunnin kuluttua suspensio erotetaan saostuneesta polymeeristä ja puhdistetaan.

Esimerkki 4

91 ml 0,5-prosenttista vesipitoista tensidiliuosta, joka sisältää 5 % magnetiittiä, jäädytetään kolvissa lämpötilaan 0 °C. Liuoksen pH säädetään 0,2 M NaOH:lla arvoon 12. Liuoksen läpi johdetaan typpeä. Lämpötilaan 0 °C jäädytettyyn liuokseen tiputetaan 9 ml juuri tislattua akroleiiniä. Tunnin kuluttua reaktioseokseen lisätään 100 ml 0,5-prosenttista tensidiliuosta. Mikrohiukkasia sisältävä suspensio erotetaan dekantoimalla erilleen saostuneista polymeereistä ja dialysoidaan.

Esimerkki 5

Kolviin laitetaan 91 ml 0,5-prosenttista tensidiliuosta. Liuoksen pH säädetään arvoon 12 lisäämällä 0,2 M NaOH-liuosta. Liuos jäädytetään lämpötilaan 0 °C. Liuoksen läpi johdetaan argonia. Tähän liuokseen tiputetaan 9 ml juuri tislattua akroleiiniä, joka sisältää 5 % butyy-



lisyaaniakrylaattia. Tunnin kuluttua lisätään vielä 100 ml 0,5-prosenttista tensidiliuosta. Suspensio erotetaan pohjasakasta ja puhdistetaan.

#### Esimerkki 6

- 5 Kolviin laitetaan 91 ml 0,08-prosenttista vesipitoista tensidiliuosta. Liuoksen pH säädetään arvoon 10,5 lisäämällä 0,2 M NaOH-liuosta. Liuos jäädytetään lämpötilaan 0 °C. Liuoksen läpi johdetaan typpeä. Tähän liuokseen tiputetaan 9 ml juuri tislattua akroleiinia, joka sisältää
- 10 20 %  $\alpha$ -metyyliakroleiinia. Tunnin kuluttua lisätään vielä 100 ml 0,08-prosenttista tensidiliuosta. Kahden tunnin kuluttua mikropallosuspensio erotetaan pohjasakasta ja puhdistetaan.

#### Esimerkki 7

- 15 Kolviin laitetaan 91 ml 0,08-prosenttista vesipitoista tensidiliuosta, joka sisältää 25 % isopentaania. Liuos jäädytetään lämpötilaan 0 °C. Tähän liuokseen lisätään 9 ml juuri tislattua akroleiinia samalla sekoittaen. Kahden tunnin kuluttua reaktioseos suodatetaan. Mikrohiukkaset puhdistetaan pesemällä vedellä. Mikropallot suspendoidaan uudelleen veteen.
- 20

Tensidiliuos: polyglutaarialdehydinatriumvetysulfiittiliitännäinen

#### 2. reaktiovaihe

- 25 Polyakroleiinimikrohiukkasten tislattuun veteen muodostetun suspension pH säädetään arvoon 6,5 lisäämällä 0,01 M HCl-liuosta. Tähän suspensioon lisätään samalla sekoittaen huoneenlämpötilassa ylimäärin amiinipitoista ligandia. Tämän liuoksen pH säädetään ensin arvoon 8 lisäämällä 0,01 M NaOH-liuosta.
- 30

Sekoitusta jatketaan huoneenlämpötilassa reaktionopeudesta riippuen 48 tuntiin saakka. Ylimääräisen amiinipitoisen ligandin poistamiseksi dialysoidaan vettä vastaan.

Muodostuneet Schiff-emäkset mahdollisesti pelkistetään lisäämällä amiineihin pelkistimiä.

#### Esimerkki 8

1000 mg esimerkin 1 mukaisia polyakroleiinimikro-  
5 hiukkasia suspensoidaan 50 ml:aan vettä. Tähän suspensioon lisätään 1000 mg 3-aminopropaani-1-sulfonihappoa ja sekoitetaan 48 tuntia huoneenlämpötilassa. Sen jälkeen suspensio dialysoidaan vettä vastaan.

Sitten sekoitetaan 150 mg:n kanssa  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ :a ja sekoitetaan pH-arvossa 7,5 24 tuntia. Tämä suspensio dialysoidaan sen jälkeen vettä vastaan.

Amiini voidaan mahdollisesti alkyloida tai asetyloida kloorietikkahapolla, asetanhydridillä tai diglykolihappoanhydridillä.

#### Esimerkki 9

1000 mg esimerkin 2 mukaisia polyakroleiinimikro-  
20 hiukkasia suspensoidaan 50 ml:aan vettä. Tähän suspensioon lisätään 1000 mg 3-aminopropaanifosfaattia ja sekoitetaan 48 tuntia huoneenlämpötilassa. Sen jälkeen suspensio dialysoidaan vettä vastaan.

Sitten sekoitetaan 150 mg:n kanssa  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ :a ja sekoitetaan pH-arvossa 7,5 24 tuntia. Tämä suspensio dialysoidaan sen jälkeen vettä vastaan.

Amiini voidaan mahdollisesti alkyloida tai asetyloida kloorietikkahapolla, asetanhydridillä tai diglykolihappoanhydridillä.

#### Esimerkki 10

1000 mg esimerkin 3 mukaisia polyakroleiinimikro-  
30 hiukkasia suspensoidaan 50 ml:aan vettä. Tähän suspensioon lisätään 1000 mg 8-amino-oktaanihappoa ja sekoitetaan 24 tuntia huoneenlämpötilassa. Sen jälkeen suspensio dialysoidaan vettä vastaan.

Sitten sekoitetaan 150 mg:n kanssa  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ :a ja sekoitetaan pH-arvossa 7,5 24 tuntia. Tämä suspensio dialysoidaan sen jälkeen vettä vastaan.

Amiini voidaan mahdollisesti alkyloida tai asetyloida kloorietikkahapolla, asetanhydridillä tai diglykolihappoanhydridillä.

#### Esimerkki 11

5           1000 mg esimerkin 4 mukaisia polyakroleiinimikrohiukkasia suspensoidaan 50 ml:aan vettä. Tähän suspensioon lisätään 1000 mg 5-aminovaleriaanahappoa ja sekoitetaan 36 tuntia huoneenlämpötilassa. Sen jälkeen suspensio dialysoidaan vettä vastaan.

10           Sitten sekoitetaan 150 mg:n kanssa  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ :a ja sekoitetaan pH-arvossa 7,5 24 tuntia. Tämä suspensio dialysoidaan sen jälkeen vettä vastaan.

15           Amiini voidaan mahdollisesti alkyloida tai asetyloida kloorietikkahapolla, asetanhydridillä tai diglykolihappoanhydridillä.

#### Esimerkki 12

20           1000 mg esimerkin 5 mukaisia polyakroleiinimikrohiukkasia suspensoidaan 50 ml:aan vettä. Tähän suspensioon lisätään 1000 mg D-glukoosiاميinihydrokloridia ja sekoitetaan 30 tuntia huoneenlämpötilassa. Sen jälkeen suspensio dialysoidaan vettä vastaan.

            Sitten sekoitetaan 150 mg:n kanssa  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ :a ja sekoitetaan pH-arvossa 7,5 24 tuntia. Tämä suspensio dialysoidaan sen jälkeen vettä vastaan.

25           Amiini voidaan mahdollisesti alkyloida tai asetyloida kloorietikkahapolla, asetanhydridillä tai diglykolihappoanhydridillä.

#### Esimerkki 13

30           1000 mg esimerkin 6 mukaisia polyakroleiinimikrohiukkasia suspensoidaan 50 ml:aan vettä. Tähän suspensioon lisätään 1000 mg heksametyleenidiاميinia ja sekoitetaan 24 tuntia huoneenlämpötilassa. Sen jälkeen suspensio dialysoidaan vettä vastaan.

Sitten sekoitetaan 150 mg:n kanssa  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ :a ja sekoitetaan pH-arvossa 7,5 24 tuntia. Tämä suspensio dialysoidaan sen jälkeen vettä vastaan.

Amiini voidaan mahdollisesti alkyloida tai asetyyloida kloorietikkahapolla, asetanhydridillä tai diglykolihappoanhydridillä.

#### Esimerkki 14

1000 mg esimerkin 7 mukaisia polyakroleiinimikrohiukkasia suspensoidaan 50 ml:aan vettä. Tähän suspensioon lisätään 1000 mg polylysiiniä (molekyyllipaino = 32600 Daltonia) ja sekoitetaan 30 tuntia huoneenlämpötilassa. Sen jälkeen suspensio pestään vedellä.

#### Esimerkki 15

15 100 mg esimerkin 5 mukaisia polyakroleiinimikrohiukkasia suspensoidaan 2,5 ml:aan vettä. Tähän suspensioon lisätään 250 mg 2,5 ml:aan vettä liuotettua ihmisserumalbumiinia ja sekoitetaan 8 tuntia huoneenlämpötilassa. Sen jälkeen suspensio dialysoidaan tislattua vettä vastaan (molekyyllipainoraja 100 000).

#### Esimerkki 16

20 1000 mg esimerkin 4 mukaisia polyakroleiinimikrohiukkasia suspensoidaan 50 ml:aan vettä. Tähän suspensioon lisätään 1000 mg (2-dietyyliamino)etyyliamiinia ja sekoitetaan 20 tuntia huoneenlämpötilassa. Sen jälkeen suspensio dialysoidaan vettä vastaan.

#### Esimerkki 17

30 300 mg esimerkin 1 mukaisia polyakroleiinimikrohiukkasia suspensoidaan 7,5 ml:aan tislattua vettä. Tähän suspensioon lisätään 750 mg 7,5 ml:aan vettä liuotettua 3-aminopropaani-1-sulfonihappoa ja sekoitetaan 24 tuntia huoneenlämpötilassa. Sen jälkeen suspensio dialysoidaan tislattua vettä vastaan (molekyyllipainoraja 1000 d).

#### Esimerkki 18

35 200 mg esimerkin 7 mukaisia polyakroleiinimikrohiukkasia suspensoidaan 5 ml:aan vettä. Tähän suspensioon

lisätään 500 mg 5 ml:aan vettä liuotettua lyysiiniä ja sekoitetaan 24 tuntia huoneenlämpötilassa. Sen jälkeen suspensio dialysoidaan tislattua vettä vastaan (molekyyllipainoraja 5000 d).

#### 5 In vitro -kokeita

In vitro -kokeissa todetaan esimerkeiksi valittujen keksinnön mukaisten mikrohiukkasten suspensioiden kaikuamplitudien takaisinsirontamittausten avulla niiden erittäin hyvät akustiset ominaisuudet.

#### 10 In vitro -kokeiden ja niistä tehtyjen kuvien selityksiä:

Mittalaitteisto koostuu ultraäänilähettimestä, joka on yhdistetty ultraäänivastaanottoon, ja mittauskyvetistä, jossa on näyte. Näytteen akustisten ominaisuuksien mittaamiseksi lähetetään ultraääni-impulssi. Impulssi siroaa kyvetin lasiseinään, lävistää näytteen ja sen jälkeen, jos näyte ei synnytä kaikua, siroaa kyvetin takaseinälle. Ultraääni-impulssin takaisinsironta mitataan vastaanottimen avulla ja amplitudin muutos osoittaa sen (ks. 20 kuvia).

Kuviossa 1 on esitetty veden takaisinsirontakäyttäytyminen (esimerkkinä kaikua synnyttämättömästä näytteestä). Kyvetin etuseinän (3  $\mu$ s) ja takaseinän (n. 16  $\mu$ s) takaisinsironta-amplitudi on selvästi tunnistettavissa.

25 Jos mitataan kaikua synnyttävää näytettä, saadaan takaisinsirontakäyttäytyminen, jollainen on kuvattu kuvissa 2 - 4. Kyvetin seinän takaisinsirontasignaalia ei saada, koska ultraääni-impulssi häviää tai muuttuu kaikua synnyttävän näytteen vuorovaikutuksesta niin, että vastaanottoon ei enää tule takaisinsirontaa.

30 Määritettiin takaisinsironta-amplitudit esimerkkien 8 (kuvio 2), 11 (kuvio 3) ja 15 (kuvio 4) mukaisista vesipitoisista hiukkassuspensioista käyttäen kulloinkin pitoisuuksia 0,5 mg/ml.

## In vivo -kokeita

Kaikukardiografisen tutkimuksen suorittamiseksi n. 10 kg painavalla koiralla (beagle) käytetään keksinnön mukaisia varjoaineita seuraavalla tavalla: Näytepullosta, jossa on käyttövalmista suspensiota, otetaan 1 ml liuosta, joka sisältää 40 µg/ml albumiiniin kytkettyjä hiukkasia (esimerkki 15) 5-prosenttisessa glukoosiliuoksessa. Tämän varjoaineen injektointi suoritetaan vena saphena ramus caudalukseen joka puolelta avoimen kolmitiehanan kautta käyttäen injektointinopeutta vähintään 1 ml/s, edullisemmin kuitenkin nopeutta 3 ml/s, ja sen jälkeen injektoidaan 5 ml fysiologista keittosuolaliuosta (0,9-prosenttinen). Jälkimmäinen injektointi suoritetaan, jotta saataisiin mahdollisimman pitkään pysyvä vasta-aineisuus. Ennen injektiota (kuvio 5) koe-eläimelle asetetaan "apikaalinen nelikammiosondi", jossa on kaupallinen äänipää, kaikukardiografiaa varten rintakehän seinämään (transtorakaalinen kanavointi) ja kiinnitetään hakasella. Ennen injektiota, sen aikana ja sen jälkeen saadaan ultraäänitutkimuslaitteen kuvaruudulle kuva ja se tallennetaan mahdollisesti videonauhalle tai videotulostimen avulla. Täm koejärjestely vastaa tekniikan tasoa ja on alan ammattilaisen tuntema.

Ultraäänivarjoaineen saavuttaessa sydämen oikean puolen kaikuvaikutuksia voidaan seurata väridopplerina, 2-dimensioisena kaikukuvana tai M-tyypin kaikukuvana. Varjoaine merkitsee ensin oikean eteisen veren, sen jälkeen varjostuu oikea kammio ja lopuksi keuhkovaltimo. Tällöin tapahtuu homogeeninen täyttyminen, joka kestää diagnostiseen tutkimukseen riittävän ajan. Sillä aikaa kun sydämen oikean puolen ontelot täyttyvät jälleen varjoaineettomalla verellä (kaiun väheneminen ja häviäminen sydänonteloissa), ilmestyy varjoaine keuhkoihin tulon jälkeen (transkapillaarinen) keuhkolaskimoihin, täyttää sitten vasemman eteisen, vasemman kammion ja seuraavan korkeapainesysteemin

homogeenisesti. Varjostusvaikutukset sydämen vasemman puolen onteloissa kestävät pitempään kuin sydämen oikealla puolella. Sydämen vasemman puolen onteloiden vajostumisen lisäksi tapahtuu myös muiden elinten varjostuminen, joka  
5 heijastelee veren virtaamista.

Kuvio 6 esittää vasemman kammion täyttymistä varjoaineella.

Keksinnön mukaisten ultraäänivarjoaineiden käyttö ei rajoitu vain verivirtausten havainnollistamiseen verisuonistossa, vaan myös ruumiin onteloiden varjostaminen on  
10 mahdollista. Verivirtauskuvauksen ansiosta näillä varjoaineilla voidaan myös menestyksekkäästi suorittaa muiden elinten tutkimista.

Patenttivaatimukset

edullisesti  
alle 60°C  
5. Y  
Krom?

1. Ultraäänidiagnostiikassa käyttökelpoiset, kaasua tai helposti haihtuvia nesteitä sisältävät mikrohiukkaset, jotka muodostuvat biologisesti hajoavista polymeereistä, t u n n e t u t siitä, että mikrohiukkaset rakentuvat polymeroituvista aldehydeistä, jotka sisältävät haluttaessa kopolymeroitumiskykyisiä lisäaineita ja/tai silloitusaineita sekä tensidejä tai tensidiseoksia, ja ovat mahdollisesti kytkentäaineiden välityksellä liittyneet bio- tai makromolekyyliin, jolloin mikrohiukkasten läpimitta on 0,1 - 40 µm.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset mikrohiukkaset, t u n n e t u t siitä, että polymeroituva aldehydi on

I.  $\alpha$ , $\beta$ -tyydyttymätön aldehydi, esimerkiksi akroleiini, krotonialdehydi tai propionaldehydi,

II.  $\alpha$ -substituoitu akroleiinijohdannainen, esimerkiksi  $\alpha$ -metyyliakroleiini,  $\alpha$ -klooriakroleiini,  $\alpha$ -fenyyliakroleiini,  $\alpha$ -etyyliakroleiini,  $\alpha$ -isopropyyliakroleiini,  $\alpha$ -n-butyyliakroleiini tai  $\alpha$ -n-propyyliakroleiini,

III. dialdehydi, esimerkiksi glutaarialdehydi tai sukkinaldehydi tai niiden johdannainen tai niiden seos kopolymeroitumiskykyisten lisäaineiden kanssa, esimerkiksi  $\alpha$ -substituoitu akroleiini,  $\beta$ -substituoitu akroleiini, etyyliisyaaniakrylaatti, metyyliisyaaniakrylaatti, butyyliisyaaniakrylaatti, heksyyliisyaaniakrylaatti, metyylietakrylaatti, vinyylialkoholi, akryylihapo, metakryylihapo, akryylihappokloridi, metakryylihappokloridi, akryylinitriili, metakryylinitriili, akryyliamidi, substituoitu akryyliamidi, hydroksimetyylietakrylaatti, mesityylioksidi, dimetyyliaminoetyylietakrylaatti-2-vinyylipyridiini ja/tai N-vinyyli-2-pyrrolidinoni.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset mikrohiukkaset, t u n n e t u t siitä, että niiden mahdollisesti sisältämä tensidi on ioninen tai ioniton pinta-aktiivinen aine



(tensidi), esimerkiksi polyetyleenioksidi, polyoksietyleenipolyoksipropyleeni, Pluronic® F 68, Pluronic® F 108, Pluronic® F 127, polyetyleeniglykoli, Poloxamin 908, Polaxamer 407, karboksyylihapposuola, esimerkiksi natriumoleaatti, polyoksietyleenirasvahappoesteri, esimerkiksi polyoksietyleenistearaatti, natriumdioktyylisulfosukkinaatti, polyglutaarialdehydinatriumvetysulfiittiaddukti, polyakroleiininatriumvetysulfiittiaddukti ja/tai polyvinyyliisulfonihappo.

10 4. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset mikrohiukkaset t u n n e t u t siitä, että kaasuina tai helposti haihtuvina nesteinä käytetään ammoniakkia, ilmaa, jalokaasuja, rikkihalogenidejä, esimerkiksi rikkiheksafluoridia, typpeä, hiilen oksideja, happea, vetyä, hiilivetyjä, halogeenoitua hiilivetyä, eettereitä tai fluorattuja eettereitä, dimetyyliaminoasetonia, propyleenioksidia, N-etyyliaminyyliamiinia, N-etyylidimetyyliamiinia ja/tai furaania.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset mikrohiukkaset, t u n n e t u t siitä, että kytkentäaineina käytetään

20 I. aminoryhmiä sisältäviä yhdisteitä, esimerkiksi hydroksyyliamiinia, butyyliamiinia, allyyliamiinia, etanoliamiinia, trishydroksimetyyliaminometaania, 3-amino-1-propaanisulfonihappoa, 5-aminovaleriaanahappoa, 8-amino-oktaanihappoa, D-glukosamiinihydrokloridia, aminogalaktoosia, aminosorbitolia, aminomannitolia, dietyyliaminoetyyliamiinia, aniliinia, sulfoniilihappoamidia, koliinia, N-metyyliglukamiinia, piperatsiinia, 1,6-heksaanidiamiinia, ureaa, hydratsiinia, glysiiniä, alaniinia, lysiiniä, seriiniä, valiinia, leusiinia, peptidejä, proteiineja, 30 albumiinia, ihmisen seerumin albumiinia, polylysiiniä, gelatiinia, polyglykoliamineja, aminopolyalkoholeja, dekstraanisulfaatteja, joissa on aminoryhmiä, N-aminopolyetyleeniglykolia (HO-PEG-NH<sub>2</sub>), N,N'-diaminopolyetyleeniglykolia (NH<sub>2</sub>-PEG-NH<sub>2</sub>), vasta-aineita tai immunoglobuliineja, 35

II. happoryhmiä sisältäviä yhdisteitä, esimerkiksi (PEG-kytkijä-asparagiinihappo), PEG-kytkijä-glutamiinihappo, PEG-kytkijä-DTPA tai PEG-kytkijä-EDTA,

5 III. hydroksyyliiryhmiä sisältäviä yhdisteitä, esimerkiksi etyleeniglykoli, 1,3-propaanidoli, glyseriini ja/tai pentaerytritoli.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset mikrohiukkaset tunnetut siitä, että bio- tai makromolekyyleinä käytetään monoklonaalisia vasta-aineita.

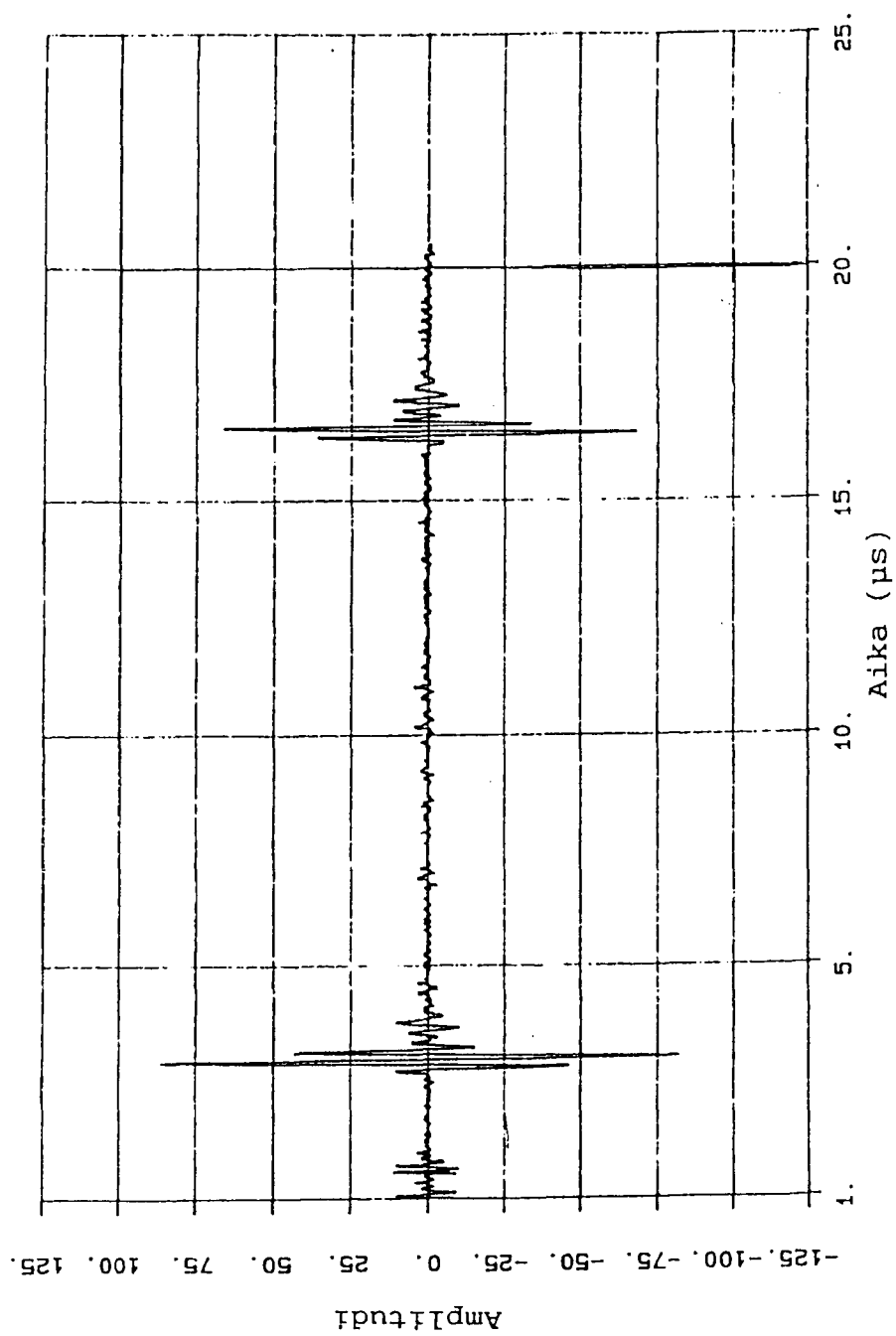
10 7. Varjoaineet, tunnetut siitä, että ne sisältävät patenttivaatimuksen 1 mukaisia mikrohiukkasia ja nestemäistä kantajaa.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukaiset varjoaineet, tunnetut siitä, että mikropartikkelipitoisuus on 15 1 µm - 100 mg, edullisesti 10 µg - 100 mg, yhtä millilitraa kohti nestemäistä kantajaa.

9. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisten mikrohiukkasten valmistamiseksi, tunnettu siitä, että 0 - 40 %, edullisesti 0,01 - 10 % w/v, tensidiä (tensidejä) ja 0 - 10 % w/v diagnostisesti tehokkaita aineosia ja kaasuja tai helposti haihtuvia nesteitä sisältävä vesiliuos saatetaan reagoimaan samalla sekoittaen lämpötilassa -5 °C - +80 °C, edullisesti 0 °C - 40 °C, pH-arvon ollessa 7 - 14, edullisesti 9 - 13, 1 min - 24 tunnin aikana, edullisesti 1 tunnin - 10 tunnin aikana, ja mahdollisesti johtamalla samalla kaasua kopolymeroituskykyis(t)en aldehydi(e)n kanssa, jo(i)ta on pitoisuuteen 0,1 - 50 %, edullisesti 3 - 20 % w/v saakka reaktioseoksesta, sekä kopolymeroituskykyisten lisäaineiden kanssa, joiden pitoisuus on 0 - 20 %, edullisesti 1 - 5 % w/v reaktioliuoksesta, silloitusaineen (-iden) kanssa, jo(i)ta on 0 - 5 %, edullisesti 0,1 - 1 % w/v reaktioseoksesta, sen jälkeen - mahdollisesti puhdistuksen jälkeen - niin saadut mikrohiukkaset saatetaan reagoimaan vesiliuoksen kanssa, joka sisältää - aldehydin määrän suhteen - 35

korkeintaan ekvimolaarisen määrän kytkentäainetta sekä 0 - 20 %, edullisesti 0,01 - 10 % w/v tensidiä (tensidejä) kokonaistilavuuden suhteen, samalla sekoittaen korkeintaan 3 päivää, edullisesti korkeintaan 2 päivää, lämpötiloissa 5 0 °C - 60 °C, edullisesti 5 °C - 30 °C, pH-arvon ollessa 3 - 9, edullisesti 5 - 8, ja - haluttaessa puhdistuksen jälkeen - nämä sidotaan mahdollisesti bio- tai makromolekyyleihin.

Fig. 1



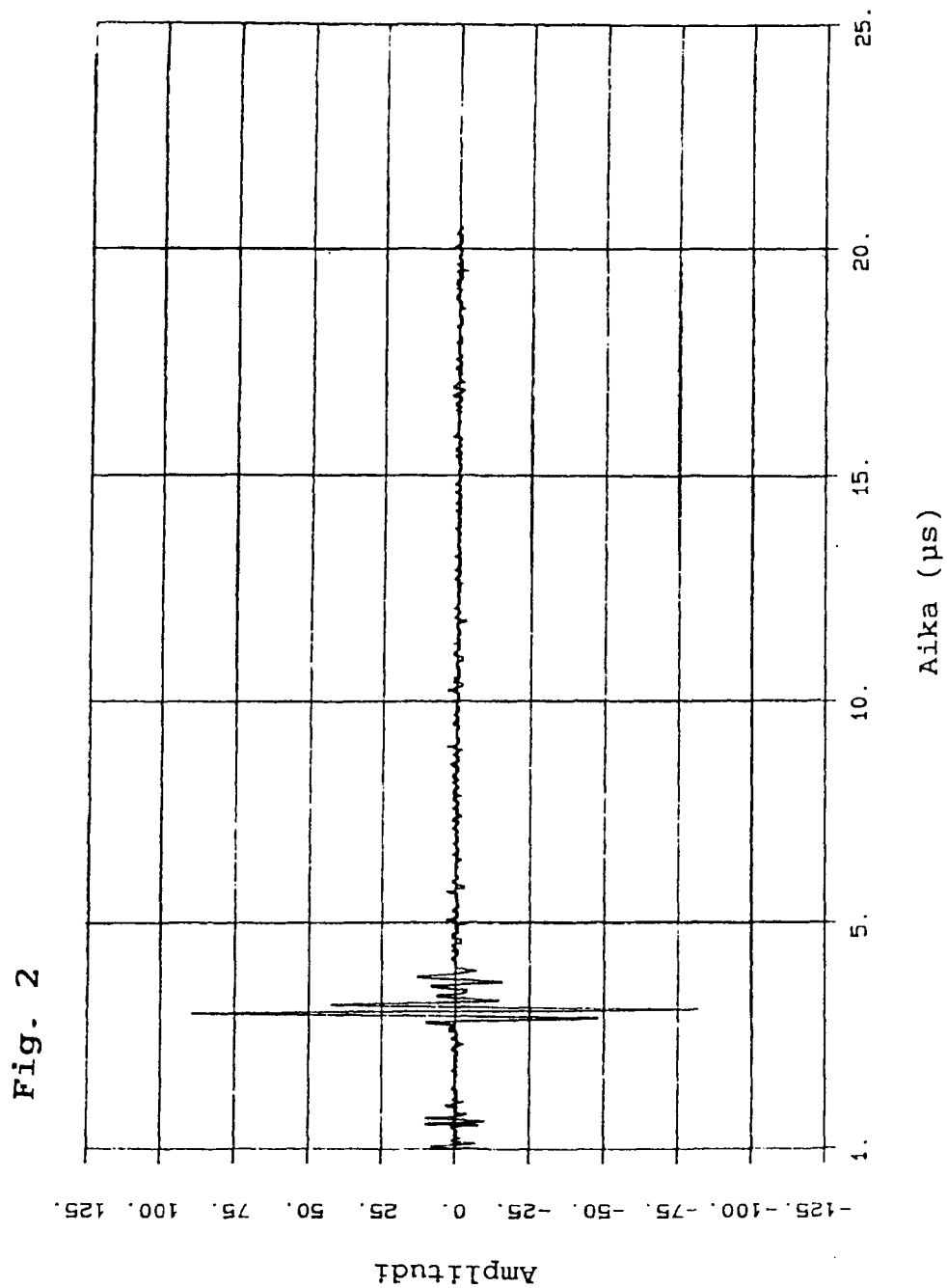


Fig. 3

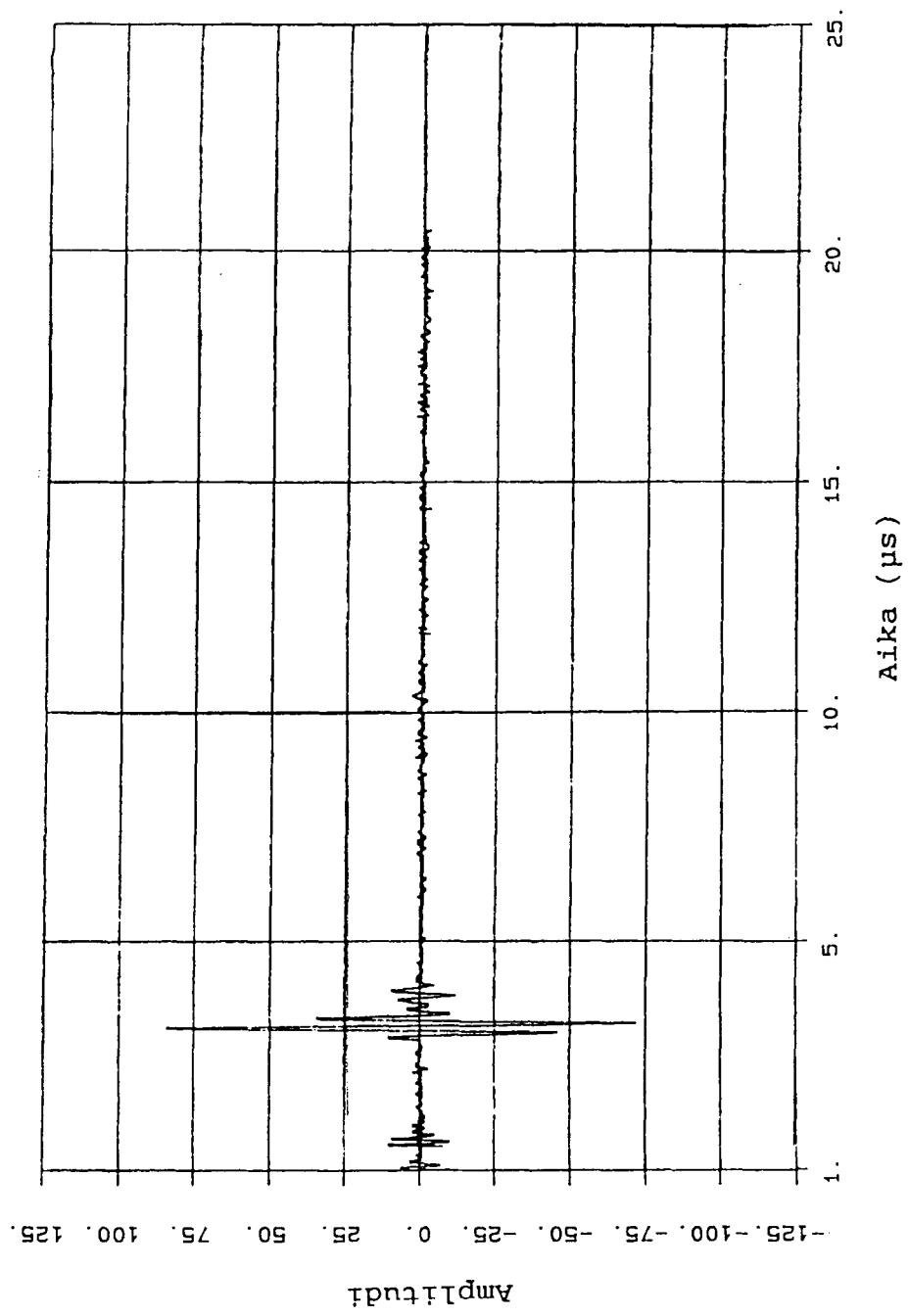


Fig. 4

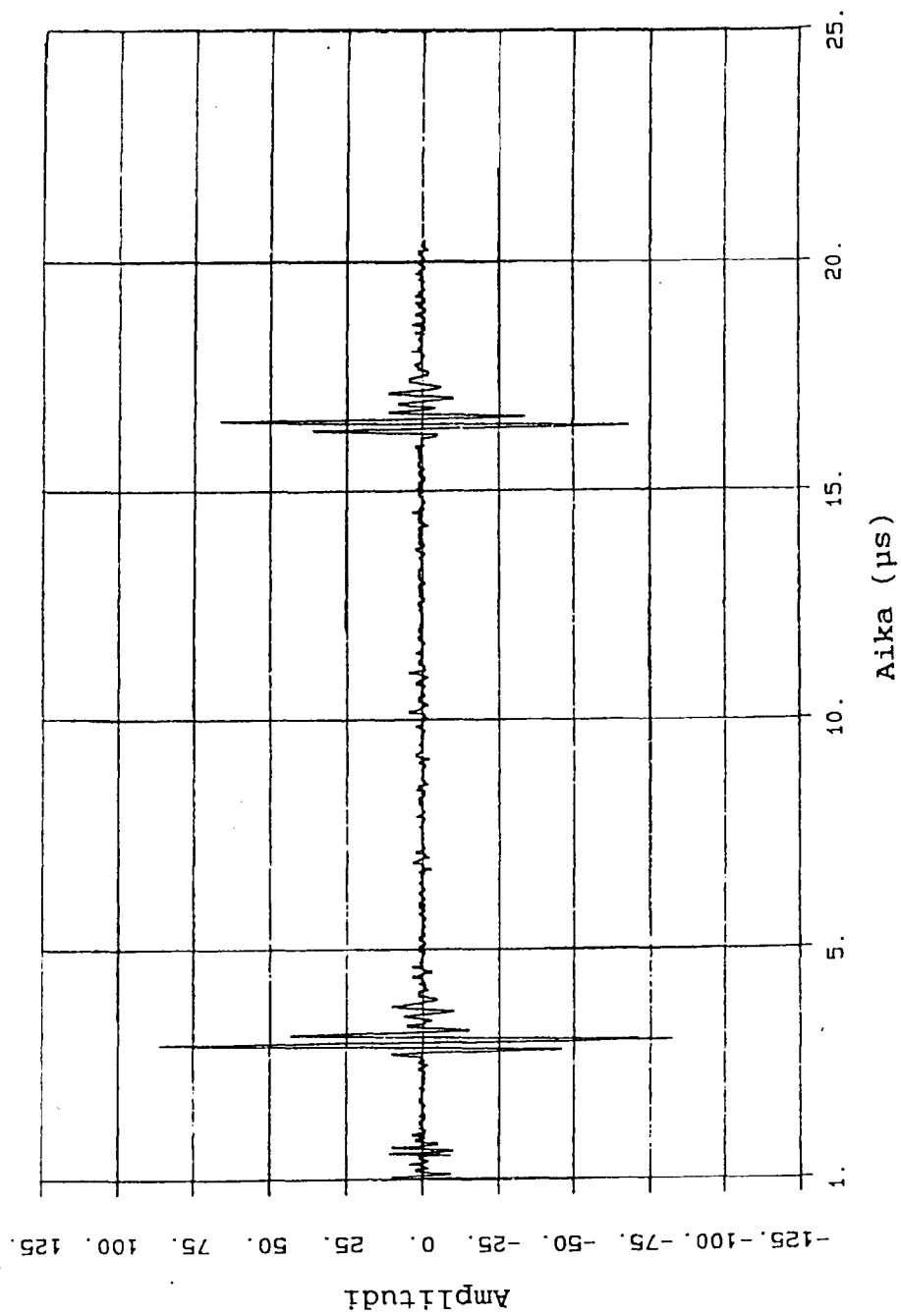
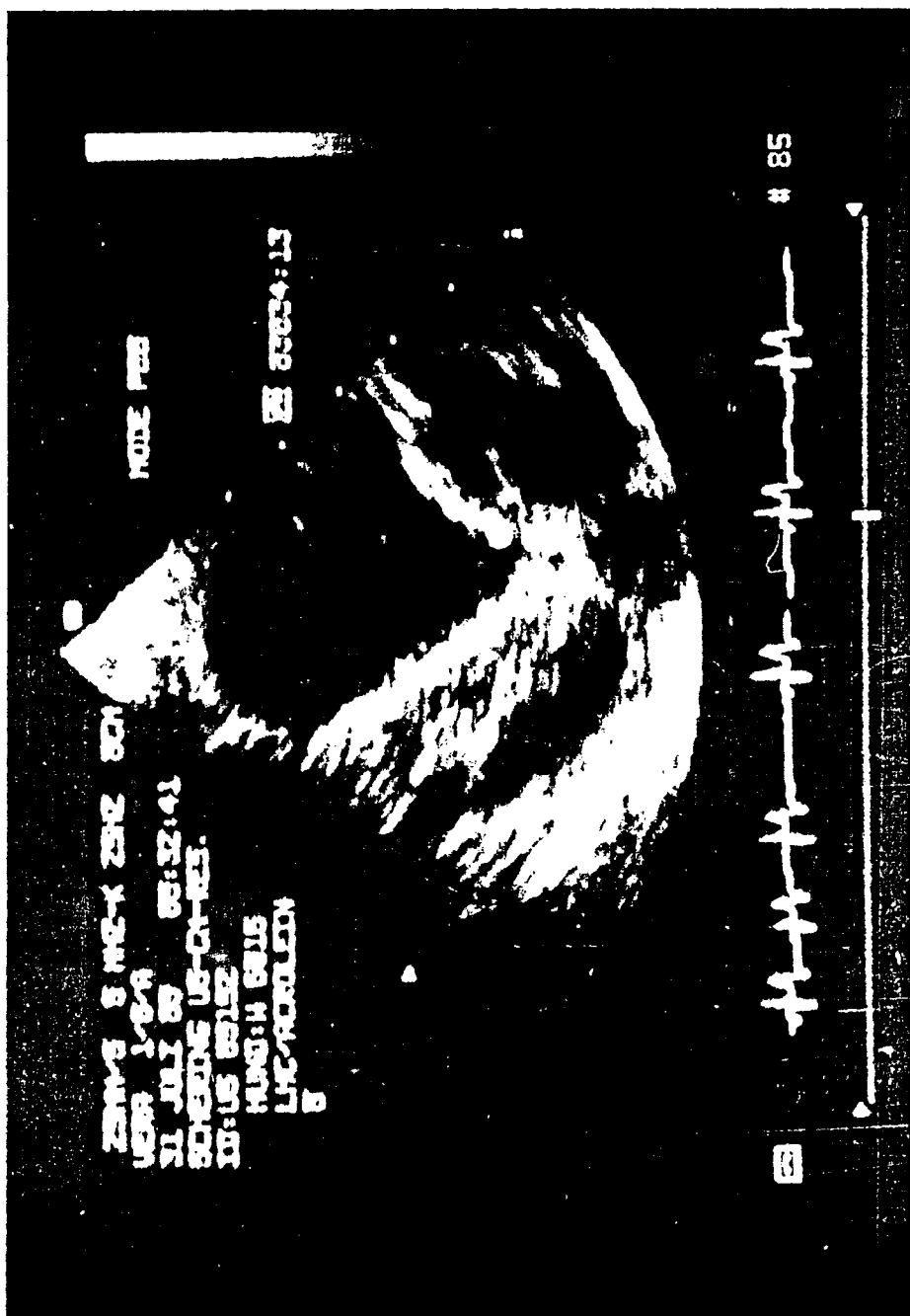


Fig. 5





200-5 5 M-2-X 25-2 304  
JUN 2 8 19  
JUL 29 25:13:13  
JUL 29 15:04:53  
JUL 29 15:05:02  
JUL 29 15:05:03  
JUL 29 15:05:04

WCS = 12  
M 2527:07

6114  
#115

②

Fig. 6