(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

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

(10) **FI 934226 A7**

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 934226

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
A61K 49/00

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **28.03.1992**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **27.09.1993**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **27.09.1993**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **28.03.1992 PCT/EP1992/000715**

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

28.03.1991 GB 9106673

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **Amersham Health AS,** Nycoveien 2, 0301 Oslo, NORJA, (NO)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Klaveness, Jo,** Oslo, NORJA, (NO)
2 • **Priebe, Hanno,** Norge, NORJA, (NO)
3 • **Rongved, Pål,** Hellvik, NORJA, (NO)
4 • **Stubberud, Lars,** Sverige, SVERIGE, (SE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Parannukset varjoaineissa tai suhteessa niihin

Förbättringar i eller relaterande till kontrastmedel

Parannukset varjoaineissa tai suhteessa niihin

Tämän keksinnön kohteena ovat uudet varjoaineet, erityisemmin uusien kaasua sisältävien tai kaasua muodostavien varjoaineiden käyttö diagnostisessa ultraäänikuvauksessa.

On hyvin tunnettua, että ultraäänikuvaus on potentiaalisesti arvokas diagnostinen apuväline esimerkiksi verisuoniston tutkimuksissa, erityisesti kardiografiassa, ja kudoksen hiussuonten tutkimuksessa. On ehdotettu monia varjoaineita parantamaan näin saatuja akustisia kuvia, mukaanlukien kiinteiden partikkeleiden suspensiot, emulgoidut nestepisarat, kaasukuplat ja kapseloidut kaasut tai nesteet. On yleisesti hyväksytty, että alhaisen tiheyden varjoaineet, jotka ovat helposti kokoonpuristettavissa, ovat erityisen tehokkaita, johtuen niistä aiheutuvasta akustisesta takaisinsironnasta ja täten huomattavaa kiinnostusta on osoitettu kaasua sisältävien ja kaasua muodostavien järjestelmien valmistukseen.

Alkututkimukset, joissa on käytetty vapaita kaasukuplia, jotka ovat muodostuneet in vivo fysiologisesti hyväksyttävien aineiden sydämensisäisellä injektiolla, ovat osoittaneet tällaisten kuplien potentiaalisen tehokkuuden varjoaineina sydämen ultraäänitutkimuksessa; käytännössä näitä menetelmiä kuitenkin rajoittaa vapaiden kuplien lyhyt elinaika. Täten on osoitettu kiinnostusta menetelmiä kohtaan kaasukuplien stabiloimiseksi sydämen ultraäänitutkimuksessa ja muita ultraäänitutkimuksia kohtaan, esimerkiksi käyttäen emulgointiaineita, öljyjä, paksuntimia tai sokereita.

Julkaisu WO 80/02365 kuvaa gelatiinilla kapseloitujen kaasumikrokuplien käyttöä ultraäänikuvien parantamiseksi. Tällaiset mikrokuplat eivät kuitenkaan osoita tarpeellista stabiilisuutta niissä mittakaavoissa, joita tarvitaan käytettäessä sydämen ultraäänitutkimuksessa

(1 - 10 µm) ottaen huomioon kapseloidun päällysteen äärimmäinen ohuus.

Julkaisu US-A-4 774 958 kuvaa mikrokupladispersioiden käyttöä, jotka on stabiloitu kapseloimalla ne denaturoituun proteiiniin, esim. ihmisen seerumialbumiiniin. Tällaiset järjestelmät mahdollistavat mikrokuplajärjestelmien valmistuksen, joiden koko on esim. 2 - 5 µm, mutta vieläkään ne eivät mahdollista sydämen vasemman kammion ja sydänlihaksen visualisoimista.

Julkaisu EP-A-0 327 490 kuvaa inter alia ultraäänivarjoaineita, jotka sisältävät hienojakoista synteettistä biologisesti hajoavaa polymeeriä (esim. hydroksikarbonihapon polyesteri, polyalkyylisyaaniakrylaatti, polyaminohappo, polyamidi, polyakryloitu sakkaridi tai polyortoesteri), jotka sisältävät kaasua tai haihtuvaa nestettä (ts. jonka kiehumispiste on alle 60 °C) vapaassa tai sidotussa muodossa. Emulgointiaineita voidaan käyttää stabilointiaineina tällaisten aineiden valmistuksessa, mutta tällaiset emulgointiaineet eivät ole kemiallisessa vuorovaikutuksessa polymeerin kanssa.

Nyt on havaittu, että erityisen tehokkaita ultraäänivarjoaineita voidaan saada kapseloimalla kaasukuplat tai kaasua muodostavat järjestelmät polymeereillä, jotka sisältävät kemiallisesti sitoutuneita pinta-aktiivisia, ts. amfifiilisiä osia. Täten amfifiilisten ryhmien pinta-aktiiviset ominaisuudet stabiloivat mikrokuplajärjestelmää vähentämällä pintajännitystä kaasu-nesterajapinnoissa, esim. muodostamalla yksinkertaisia kerroksia tai yhden tai useampia kaksinkertaisia kerroksia (jotka tunnetaan vaihtoehtoisesti termeistä misellit, rakkulat, liposomit ja niosomit) mainituissa rajapinnoissa, samalla kun ryhmien sitoutuminen polymeerisen järjestelmän kautta aikaansaa lisästabiilisuutta. Kapseloitujen aineiden joustavuus parantaa myös tällaisilla varjoaineilla aikaansaatua kuvatiheyttä. Yksinkertaisuuden vuoksi termejä "rakkula" käy-

tetään tässä kuvaamaan kaikkia tällaisia mikrokuplarakenteita ennen ristisitomista tai polymerointia tai senjälkeen. Olisi otettava huomioon, että joissakin olosuhteissa voi muodostua epäsäännöllisen muotoisia rakenteita, esimerkiksi mikroputkia, jotka voivat yhdistyä tai jopa sulkea sisäänsä pyöreitä rakenteita.

Täten tämän keksinnön yhtenä kohteena ovat varjoaineet käytettäviksi diagnostisissa ultraäänitutkimuksissa sisältäen kaasu- tai kaasuprekursori mikrokuplia kapseloituina ei-proteiinisilla ristisidotuilla tai polymeroiduilla amfifiilisilla ryhmillä.

Termi "ristisitoutunut" tässä käytettynä tarkoittaa, että amfifiiliset ryhmät ovat sitoutuneet toisiinsa muodostaen polymeerisen rakenteen, joka voidaan liittää yhteen tai useampaan polymeeriseen järjestelmään (mukaanlukien kopolymeerit).

Suurempi hyöty tämän keksinnön mukaisista varjoaineista on, että ne voidaan suunnitella erityiselle biologisen hajoamisen tasolle in vivo valitsemalla tarkoituksenmukaiset biologisesti hajoavat sidokset tarkoituksenmukaisiin asemiin. On huomattava, että ollakseen tehokkaita, varjoaineiden on oltava stabiileja läpi ultraäänitutkimuksen, mutta edullisesti ne metabolisoituvat tai ovat helposti poistettavissa verenkiertojärjestelmästä heti tämän jälkeen. Keksinnön mukaisilla varjoaineilla tulisi täten edullisesti olla in vivo puoliintumisaika, joka ei ole suurempi kuin 48 tuntia, esimerkiksi 1 - 12 tuntia.

Biologisesti hajoavia sidoksia, joita voi olla läsnä keksinnön mukaisissa varjoaineissa, ovat amidi, imidi, imiini, esteri, happoanhydridi, asetaali, karbamaatti, karbonaatti, karbonaattiesteri ja disulfidiryhmät. Ainakin yhden tällaisen ryhmän tulisi edullisesti olla läsnä amfifiilisessä osassa, hydrofiilisessä ja/tai lipofiilisessä osassa; voi olla edullista sijoittaa ryhmä hydrofiiliseen

osaan helpottamaan entsymaattista vuorovaikutusta in vivo. Edelleen on edullista, että biologisesti hajoavia sidoksia on läsnä polymeerirungossa, kehossa olevan polymeerin riittävän hajoamisen varmistamiseksi.

Mitä tahansa biologisesti yhteensopivaa kaasua voidaan käyttää keksinnön varjoaineissa, kuten esimerkiksi ilmaa, typpeä, happea, vetyä, typpioksidia, hiilidioksidia, heliumia, argonia, rikkiheksafluoridia ja alhaisen molekyylipainon valinnaisesti fluorattuja hiilivetyjä, kuten metaani-, asetyleeni- tai hiilitetrafluoridia. Kaasu voi olla vapaa mikrokuplassa, edullisesti kaasulla täytetyn "mikropallon" muodossa, koska tällaisten tuotteiden ekogeenisyyttä voidaan parantaa, johtuen niiden suhteellisen joustavasta luonteesta. Vaihtoehtoisesti kaasu voidaan sulkea sisään tai kuljettaa mukana suljetussa aineessa. Tässä käytettynä termi "kaasu" tarkoittaa mitä tahansa ainetta kaasumaisessa muodossa 37 °C:ssa.

Kaasuprekursoreita ovat karbonaatit ja bikarbonaatit, esim. natrium- tai ammoniumbikarbonaatti ja aminomalonaattiesterit. Termi "kaasuprekursori", tässä käytettynä, käsittää myös aineet, kuten haihtuvat hiilivedyt, jotka voidaan aluksi kapseloida, mutta poistetaan tämän jälkeen osittain tai kokonaan rakkuloista, esimerkiksi haihduttamalla tai kylmäkuivaamalla, korvaten kaasulla.

Sovellutuksissa sydämen ultraäänitutkimuksia varten, vapaan pääsyn keuhkojärjestelmään mahdollistamiseksi ja resonanssin saavuttamiseksi edullisen n. 0,1 - 15 MHz:n kuvaustaajuulla voi olla edullista käyttää mikrokuplia, joiden keskimääräinen koko on 0,1 - 10 µm, esim. 1 - 7 µm. Huomattavasti suuremmat kuplat, esim. joiden keskikoot ovat jopa 500 µm, voivat kuitenkin olla hyödyllisiä muissa sovellutuksissa, esimerkiksi maha-suolikuvauksessa tai tutkittaessa mahahaavoja tai munanjohtimia.

Haluttaessa mikrokuplat voivat sisältää erityisiä stabilointiaineita, esimerkiksi epäorgaanisia aineita,

kuten pii- tai rautaoksidia, jotka ovat vain osittain kostutettuja käytetyllä liuotinjärjestelmällä, esim. joiden partikkelikoko on 1 - 500 nm. Kolloidista piidioksidia, jonka partikkelikoko on 5 - 50 nm, voidaan edullisesti käyttää tätä tarkoitusta varten.

Polymeerijärjestelmiä, joita voidaan käyttää keksinnön varjoaineissa, ovat hiilihydraatit, kuten dekstraanit ja tärkkelykset, kitiini, kitosaani, karboksimetyylikitosaani, alginaatti, hyaluronihappo, polyakryyliamidit, polysyaaniakrylaatit, hydroksialkyylipolysyaaniakrylaatit, polyhydroksihapot, kuten polyetikkahapot, polyhydroksibutyraatit, polyglykolihapot, polylaktidi-glykolidit, polyortoesterit, polyanhydridit, polyuretaanit, polyesteriimidit, polyimidit, polyasetaalit, poly-epsilon-kaprolaktonit, polydioksanonit, polyaminotriatsolit, poly(amidienamiinit), poly(amidiuretaanit), polyfosfatseenit, polyvinyylialkoholit, organo-polysiloksaanit, poly(enoliketonit) ja näiden aineiden kopolymeerit, modifioituina, kuten on tarpeellista, hydrofiilisten tai lipofiilisten osien lisäämiseksi.

Keksinnön mukaiset mikrokuplat voidaan valmistaa muodostamalla rakkuloiden nestedispersio, joka sisältää kaasua tai kaasuprekursoria kapseloituna amfifiilisellä aineella, mitä seuraa amfifiilisen aineen ristisitominen tai polymerointi.

Rakkulat sisältävät tavallisesti pääosin pyöreän yksinkertaisen kerroksen tai monikerroksen amfifiilista ainetta. Amfifiilien hydrofiiliset ryhmät on fysikaalisesti yhdistetty muodostamaan jatkuva kerros, kun taas lipofiiliset ryhmät muodostavat myös kerroksen, joka voi olla hydrofiilisen kerroksen ulko- tai sisäpuolella. Kaksinkertaisissa kerroksissa amfifiilisen aineen molemmat kerrokset voivat olla päällekkäin; täten esimerkiksi voi muodostua amfifiilisen aineen ensimmäinen kerros, jossa lipofiiliset ryhmät ovat ulkopuolella. Amfifiilisen aineen

toinen kerros voi olla ensimmäisen kerroksen yläpuolella niin, että lipofiiliset ryhmät ovat viereisiä ensimmäisen kerroksen lipofiilisten ryhmien ja ulkopuolisten hydrofiilisten ryhmien kanssa. Samalla tavalla kaksinkertaisella kerroksella voi olla lipofiiliset ryhmät ulkopuolella ja sisäpuolella ja hydrofiiliset ryhmät puristettuina niiden välissä.

Kun neste, johon rakkulat ovat dispergoituneet, on polaarinen, esimerkiksi vesipitoinen, rakkuloiden hydrofiilisillä ryhmillä on taipumus olla misellien ulkopuolella ja lipofiilisillä ryhmillä olla sisäpuolella muodostaen yksinkertaisen kerroksen. Toisaalta, mikäli dispergoiva neste on apolaarinen, lipofiiliset ryhmät ovat ulkopuolella, erityisesti mikäli kapseloitu aine on hydrofiilinen, esim. kaasuprekursori, tai kiinteä aine, joka sisältää absorboitunutta tai mukanakulkeutunutta kaasua, mahdollisesti yhdessä polaarisen nesteen kanssa. Kaksinkertaiset kerrokset voivat muodostua, kun kapselointiaine on samaa tyyppiä, ts. hydrofiilinen tai lipofiilinen, kuin dispergoiva neste.

Tämän keksinnön mukaisesti käytetyt amfifiilit sisältävät funktionaalisia ryhmiä, mahdollistaen ristisitomisen tai polymeroinnin. Nämä voivat joissakin tapauksissa olla ryhmiä, jotka poikkeavat hydrofiilisestä tai lipofiilisestä luonteesta, tai ne voivat olla riippumattomia amfifiilisistä ryhmittymistä.

Amfifiilit voidaan jakaa kolmeen ryhmään:

1. Amfifiilit voivat sisältää vähintäin kaksi yksinkertaista reaktiivista ryhmää, kuten hydroksyyli-, amino- tai karboksyyliryhmiä, jotka pystyvät reagoimaan moniarvoisten reaktiivisten monomeerien tai muodostettujen polymeerien kanssa. Esimerkiksi, mikäli amfifiili sisältää kaksi hydroksyyliryhmää (hydrofiilisessä osassa), dikarboksyylihappo, kuten korkkihappo, voidaan saattaa reagoimaan rakkuloiden kanssa kaasuprekursorin kapseloinnin jälkeen muo-

dostamaan ristisitoutunut tai polymeroitunut rakenne. Diaminoamfifiilit voidaan samalla tavalla saattaa reagoimaan dikarboksyylihappojen kanssa, kun taas dikarboksyylihappoamfifiilit voidaan saattaa reagoimaan diamiinien tai diolien kanssa. Lisäristisitoutumista voidaan aikaansaada trifunktionaalisilla reagensseilla. Katalyyttiä on tavallisesti läsnä reaktion edesauttamiseksi.

Ristisitova aine voi sinänsä olla amfifiilinen niin, että rakkula muodostuu lipofiilisistä ja hydrofiilisistä ryhmistä ensimmäisestä amfifiilistä ja amfifiilisestä ristisidosaineesta rivissä, jolloin ristisitoutuminen reaktiivisten funktionaalisten ryhmien välillä voidaan käynnistää.

Kuten edellä on esitetty, on erityisen edullista polymeroidulle tai ristisitoutuneelle amfifiilille, että ne ovat biologisesti hajoavia, erityisesti suhteellisen yksinkertaisiksi veteen liukeneviksi yksiköiksi. Edellä viitattujen esteri- ja amidisidosten tapauksessa esteraasi- ja amidaasientsyymejä on tavallisesti läsnä rakkulajärjestelmässä ja ne voivat hajottaa kapselointiaineen takaisin erillisiksi amfifiilisiksi molekyyleiksi ja diamiini-, dioli- tai dihapporeagensseiksi, jotka fysiologisissa olosuhteissa eivät yhdisty.

Haluttaessa, jopa biolabiilempia ristisitoutuvia ryhmiä, kuten karbonaattiesteriryhmiä, voidaan lisätä esim. käyttäen ortoesteri ristisitovia aineita. Toisella hyödyllisellä ristisitoutumisaineiden luokalla on kaava (I)

$$A^1.R^8.(Y)_n.CO.O.C(R^1R^2).O.CO.(Z)_n.R^9.A^2 \qquad (I)$$

(jossa Y ja Z, jotka voivat olla samoja tai erilaisia, ovat -O-, -S- tai $-NR^3-$;
R^1 ja R^2, jotka voivat olla samoja tai erilaisia, ovat vetyatomeja tai hiileen liittyneitä yksiarvoisia orgaanisia

ryhmiä tai ne muodostavat yhdessä hiileen liittyneen kaksiarvoisen orgaanisen ryhmän;
R^3 on vetyatomi tai orgaaninen ryhmä;
symbolit n, jotka voivat olla samoja tai erilaisia, ovat 0 tai 1;
R^8 ja R^9, jotka voivat olla samoja tai erilaisia, ovat kaksiarvoisia orgaanisia ryhmiä, esimerkiksi alkyleeni- tai alkylideeniryhmiä, joissa on 1 - 12 hiiliatomia; ja
A^1 ja A^2 ovat funktionaalisia ryhmiä, esimerkiksi reaktiivisia hydroksyyli-, amino- tai karboksyyliryhmien kanssa, koska näin lisätyt ristisitoutuvat ryhmät sisältävät yksiköitä, joilla on kaava

$$-(Y)_n.CO.O.C(R^1R^2).O.CO.(Z)_n-$$

(jossa Y, Z, kukin n, R^1 ja R^2 ovat kuten edellä on määritetty), jotka erityisen helposti hajoavat tavallisiksi esteraaseiksi, osoittaen stabiilisuutta entsyymien poissaollessa.

R^1, R^2 ja R^3 voivat kukin olla hydrokarbyyli tai heterosyklinen ryhmä, esimerkiksi sellainen, jossa on 1 - 20 hiiliatomia, esim. alkyyli- tai alkenyyliryhmä (edullisesti sellainen, jossa on jopa 10 hiiliatomia), sykloalkyyliryhmä (jossa on edullisesti jopa 10 hiiliatomia), aralkyyliryhmä (jossa on edullisesti jopa 20 hiiliatomia), asyyliryhmä (jossa on edullisesti jopa 20 hiiliatomia) tai heterosyklinen ryhmä, jossa on 20 hiiliatomia ja yksi tai useampi heteroatomi valittuna ryhmästä O, S ja N; tällaiset hydrokarbyyli- tai heterosykliset ryhmittymät voivat sisältää yhden tai useampia funktionaalisia ryhmiä, kuten halogeeniatomeja tai ryhmiä, joilla on kaava $-NR^4R^5$, $-CONR^4R^5$, $-OR^6$, $-SR^6$ ja $-COOR^7$, joissa R^4 ja R^5, jotka voivat olla samoja tai erilaisia, ovat vetyatomeja, asyyliryhmiä tai hydrokarbyyliryhmiä, kuten on määritetty R^1:lle ja R^2:lle; R^6 on vetyatomi tai asyyliryhmä tai ryhmä, kuten

R^1:lle tai R^2:lle on määritetty ja R^7 on vetyatomi tai ryhmä, kuten R^1:lle tai R^2:lle on määritetty; jossa R^1 ja R^2 ovat kaksiarvoinen ryhmittymä, joka voi olla esimerkiksi alkyleeni- tai alkenyleeniryhmä (jossa on edullisesti jopa 10 hiiliatomia), joka voi sisältää yhden tai useampia funktionaalisia ryhmiä, kuten edellä on määritetty. Yleensä R^1 ja R^2 ovat edullisesti vety tai pienempiä ryhmiä, kuten C_{1-4}-alkyyliryhmiä.

2. Amfifiili voi sisältää polymeroituvia ryhmiä, jotka voidaan saada polymeroitumaan rakkulan muodostumisen jälkeen. Tällaiset polymeroituvat ryhmittymät voivat sisältää esimerkiksi tyydyttymättömiä lipofiilisiä ketjuja, esim. alkenyyli- tai alkynyyliryhmiä, joissa on korkeintaan 50 hiiliatomia, esimerkiksi 10 - 30 hiiliatomia, kuten oleyyli- tai linoleyyliryhmiä tai ryhmiä, jotka sisältävät diasetyleeni-, akryloyyli- tai metakryloyyliryhmittymiä. Tällaisten ryhmittymien polymerointi muodostaa tavallisesti hiilivety runkopolymeerejä, joiden rungot eivät ole helposti biologisesti hajoavia, vaikka tällaiset polymeerit voidaan suunnitella niin, että biologisesta hajoamisesta saatu runkojäännös on vesiliukoinen, esim. johtuen hydrofiilisten substituenttien, kuten karboksyyli- tai hydroksyyliryhmien läsnäolosta, parantaen sen dispersiivisyyttä. Tällaisten polymeeriketjujen pituus on edullisesti sellainen, että niiden molekyylipaino ei ylitä arvoa 40 000.

Kun vaaditaan suurempaa biologista hajoamisastetta, voi olla edullista välttää polymeeristen hiilivetyketjujen muodostumista, jotka eivät helposti hajoa, ja parantaa polymerotumista tai ristisitoutumista pelkästään biologisesti hajoavien ryhmien, kuten esteri-, karbonaatti-, karbamaatti-, amidi- tai imidisidosten kautta, jotka ovat edellä viitattujen kaltaisia. Yleisesti, tällaisiin sidoksiin johtavat funktionaaliset ryhmät ovat hydrofiilisiä ja

johtavat täten ristisitoutumiseen amfifiilien hydrofiilisten osien välillä.

Kuitenkin, lipofiilisten hiilivetyketjujen polymerointia voidaan käyttää antamaan biologisesti hajoava polymeeri, jos amfifiili sisältää biologisesti hajoavan hydrofiilisen osan, joka sisältää kaksi tällaista ketjua; jossa viereisten amfifiilisten molekyylien lipofiiliset ketjut ristisitoutuvat, esim. tyydyttymättömien hiili-hiilisidosten kautta, näin muodostuneet pidennetyt lipofiiliset ryhmittymät erottuvat biologisesti hajoavista hydrofiilisistä ryhmistä; biologisen hajoamisen yhteydessä polymeerinen rakenne hajoaa täten suhteellisen pieniksi lipofiilimolekyyleiksi, jotka sisältävät hajotettujen hydrofiilisten ryhmien jäännökset.

3. Liukoinen amfifiilinen polymeeri, joka sisältää tarkoituksenmukaisia funktionaalisia ryhmiä, voidaan edelleen polymeroida tai ristisitoa rakkulan muodostumisen jälkeen. Tällaisia aineita ovat polyaminohapot ja hiilihydraatit, jotka sisältävät lipofiilisiä ryhmiä, kuten myös alhaisen molekyylipainon polyesterit, polyamidit jne., jotka sisältävät tarkoituksenmukaisia ryhmiä, aikaansaaden amfifiilisen luonteen. Täten esimerkiksi hydrofiiliset polymeerit, kuten edellä luetellut, voivat muodostaa lipofiilisten ketjujen, esim. C_{10-30} alkyyli-, -alkenyyli- tai -alkynyyliryhmien kanssa sopivia amfifiilejä käytettäviksi keksinnön mukaisesti. Tällaisten lipofiilisten ketjujen liittämismenetelmät käsittävät polyhydroksihappojen hydroksyyliryhmien osittaisen esteröinnin, kitosaanin aminoryhmien anionisten pinta-aktiivisten aineiden suolan muodostuksen tai tällaisten ryhmien kovalenttisen johtamisen ja hydrofobisten ryhmien liittämisen karbohydraatteihin tai syklodekstriineihin esterisidosten kautta.

Liukoisia polymeerejä lisäpolymerointia varten voivat myös olla polymeroitu tai ristisitoutunut amfifiili edeltävien kohtien (1) tai (2) mukaisesti.

Polymeroituvia tai ristisitoutuvia amfifiilejä, joita voidaan käyttää keksinnön mukaisesti, ovat täten yhdisteet, joilla on yleinen kaava (II)

$$[(X)_p(R^{10})_q]B_r \qquad (II)$$

jossa X on anioninen, kationinen tai ei-ioninen hydrofiilinen ryhmä;

R^{10} on lipofiilinen ryhmä;

B on ryhmä, joka pystyy polymeroitumaan tai ristisitoutumaan;

p ja q ovat kokonaislukuja; ja

r on 0 tai, kun joko X tai R^{10} pystyy polymeroitumaan tai ristisitoutumaan, kokonaisluku.

Ryhmät X ja R^{10} voidaan yhdistää monin tavoin. Täten, esimerkiksi hydrofiilinen ryhmä X voi sisältää yhden tai monia lipofiilisiä ryhmiä R^{10}, tai lipofiilinen ryhmä R^{10} voi sisältää yhden tai useampia hydrofiilisiä ryhmiä X. Yksi tai useampi hydrofiilinen ryhmä X voi myös yhdistyä erillisten lipofiilisten ryhmien R^{10} kanssa niin kauan kuin amfifiili voi omaksua konfiguraation, jossa viereisten molekyylien hydrofiiliset ja lipofiiliset ryhmät ovat rivissä.

Vastaavasti, ryhmä tai ryhmät B (mikäli läsnä), voivat liittyä yhteen tai useampaan ryhmistä X ja R^{10}.

Biologisen hajoamisen parantamiseksi tai aikaansaamiseksi yksi tai useampi biologisesti hajoava ryhmä W voi sisältää ryhmät X, R^{10} ja B.

Ryhmä X voi, esimerkiksi, olla kvaternaarinen ammoniumryhmä $-N(R^{11})_3V$, jossa ryhmät R^{11} (jotka voivat olla samoja tai erilaisia) voivat esimerkiksi olla alkyyli-, aralkyyli- tai aryyliryhmiä, jotka sisältävät esimerkiksi korkeintaan 20 hiiliatomia, ja V on anioni. On huomattava, että yksi tai useampi ryhmistä R^{11} voi olla lipofiilinen ryhmä R^{10}.

Muita hyödyllisiä hydrofiilisiä ryhmiä X ovat hydroksyyli-, karboksylaatti-, amidi-, fosfaatti-, sulfaatti- ja sulfonaattiryhmät. Lisäesimerkkejä hydrofiilisistä ryhmistä X ovat:

- $O.CH_2.CH_2.N^+(CH_3)_3$ (koliini)
- $O.CH_2.CH_2.N^+H_3$ (etanoliamiini)
- $O.CH(NH_3^+).COO^-$ (seriini)
- $O.CH_2.CH(OH).CH_2OH$ (glyseroli)
- heksoosit ja pentoosit, kuten inositoli.

Ryhmä R^{10} voi olla esimerkiksi tyydyttynyt tai tyydyttymätön, haarautunut tai haarautumaton hiilivetyketju, joka voi sisältää esimerkiksi 6 - 50 hiiliatomia ja voi olla katkaistu yhdellä tai useammalla biologisesti hajoavalla ryhmällä W ja voi sisältää yhden tai useampia funktionaalisia ryhmiä, jotka mahdollistavat ketjujen R^{10} viereisissä amfifiileissä ristisitoutumisen muodostamaan biologisesti hajoavan ryhmän. Hyödyllisiä ryhmiä R^{10} ovat oleyyli ja linoleyyliryhmät ja ketjut, jotka sisältävät diasetyleeniryhmiä.

Ryhmä tai ryhmät B voivat olla esimerkiksi ortoesteriryhmiä, jotka muodostavat karbonaattiesterisidoksia hydroksyyliryhmien tai hydroksihapporyhmien (tai erillisten hydroksyyli- ja karboksyyliryhmien) kanssa muodostaen esterisidoksia.

On huomattava, että hydrofiilinen ryhmä X voi sisältää osan, joka ei sinänsä ole suoraan vastuussa hydrofiilisistä ominaisuuksista, kuten on laita edellä määritetyn kvaternaarisen ammoniumryhmittymän R^{11} tapauksessa ja joka voi olla esimerkiksi alempi alkyyliryhmä, joka on liian pieni lipofiilisen ominaisuuden aikaansaamiseksi; tällaiset ryhmät voivat myös muodostaa osan ryhmien X ja R^{10} välisestä sitoutumisesta. Toisin sanoen, voi esiintyä ylimenoalueita ryhmien X ja R^{10} välillä, jotka eivät tarkasti katsoen ole sinänsä lipofiilisiä tai hydrofiilisiä, vaan niitä voidaan pitää joko X:n tai R^{10}:n osana.

Täten kaavan (II) amfifiilien erikoistapauksessa ryhmät X, R^{10} ja B voidaan liittää muodostettuun polymeeriin, jota voidaan pitää X:n tai R^{10}:n osana riippuen sen kemiallisesta ja fysikaalisesta luonteesta. Tällainen polymeeri voi olla tunnettu hydrofiilinen polymeeri, johon lipofiiliset ryhmät (kuten edellä on käsitelty) ovat liittyneet, tai lipofiilinen polymeeri, esim. polyolefiini, joka sisältää tällaisia hydrofiilisiä ryhmiä. Vaihtoehtoisesti tällainen polymeeri voidaan saada kaavan (II) amfifiilin osittaisella polymeroinnilla. Kaikissa tällaisissa tapauksissa muodostetun polymeerin tulisi olla riittävän liukoinen rakkulan muodostumisen mahdollistamiseksi ja sen tulisi olla rakenteeltaan sellainen, että se mahdollistaa kovalenttisen, ionisen tai koordinaattiristisitoutumisen rakkuloiden stabiloimiseksi.

Erityisen hyödyllisiä monomeerisiä amfifiilejä ovat syaaniakrylaattiesterit, joissa on lipofiilisiä esteröiviä ryhmiä (joilla myös voi olla hydrofiilisiä osia). Täten esimerkiksi US 4329332 kuvaa alempien alkyylisyaaniakrylaattien misellipolymerointia, menetelmää, joka on laajennettavissa akrylaattien, joilla on kaava

$CH_2=C(CN).CO.O.(C_{6-20}$, alifaattinen)

polymerointiin. Vastaavasti diakrylaattia, jolla on kaava

$CH_2=CH.CO.O.(CH_2.CH_2.O)_{98}.(CH_2.CH(Me).O)_{67}.$

$(CH_2.CH_2.O)_{98}.CO.CH=CH_2$

ovat Ping et al. käyttäneet (Int. J. Pharm, 61 (1990) 79 - 84). Vastaavia syaaniakrylaatteja voidaan myös käyttää.

Amfifiilisia aineita, joista on hyötyä tämän keksinnön mukaisesti, ovat seuraavat aineluokat, jotka on johdettu lipofiilisistä ryhmistä:

lesitiinijohdannaiset,
polyglyseroli,
polyoksietyleeniglykoli ja sen esterit,
steroidien polyoksietyleenijohdannaiset,
glykosidit,
galaktosidit,
hydroksihapot tai polyhydroksihapot (mukaanlukien karboksyyli-, fosfoni-, sulfoni- ja sulfiinihapot),
hiilihydraatit ja niiden johdannaiset,
aminoalkoholit ja niiden johdannaiset, syaaniakrylaatit,
akryyliamidit ja
hydroksiamidit.

Polymeroituvat amfifiilit

Monia hyödyllisiä polymeroituvia amfifiilejä on esitetty seuraavassa:

1. $CH_2(OB_1).CH(OB_2).CH_2.O.PO(O^-)O(CH_2)_2N^+(CH_3)_3$

jossa B_1 ja B_2 voivat olla

$-CO-(CH_2)_8-C\equiv C-C\equiv C-(CH_2)_n-CH_3$

(jossa n on kokonaisluku, esim. 9, 12 tai 13), kuten on kuvattu julkaisussa WO 85/04326:ssa. Tällaisia yhdisteitä voidaan valmistaa tavallisen fosfolipidikemian mukaisesti, kuten Hirth et al. (Helv. Chem. Acta 40, 1957, 1928) ja Pfeiffer et al. (J. Org. Chem. 35, 1970, 221) ovat kuvanneet.

Tällaisia yhdisteitä voidaan täten valmistaa julkaisussa EP-A-0 032 622 kuvattujen menetelmien avulla. Kahtaisioniryhmä voidaan lisätä altistamalla tarkoituksenmukainen fosfoni tai fosfiinihappo tai sen esteröitävissä oleva johdannainen reaktiolle glyserolin tai sen esteröitävissä olevan johdannaisen kanssa. Ryhmät B_1 ja B_2 voidaan

lisätä molekyyliin esteröimällä käyttäen B_1:n ja B_2:n karboksyylihappoa tai sen esteriä mudostavaa johdannaista. Nämä reaktiot voidaan toteuttaa toisaalta glyserolin tai sen johdannaisen välillä ja toisaalta karboksyylihapon ja fosforiesterin välillä, joko samanaikaisesti tai valinnaisesti vaiheittain. Muita tunnettuja menetelmiä voidaan yhtälailla käyttää.

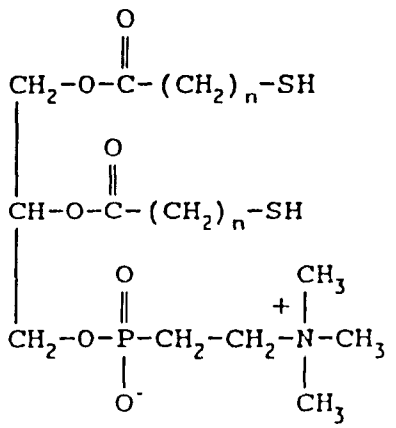
Näiden yhdisteiden polymerointi, esimerkiksi, voidaan aikaansaada säteilyttämällä 254 nm:ssä käyttäen xenon lamppua kaasun muodostumisen jälkeen, joka sisältää liposomeja, tai amfifiilien yksinkertaisten kerrosten muodostumisen jälkeen kaasu/neste rajapinnalla.

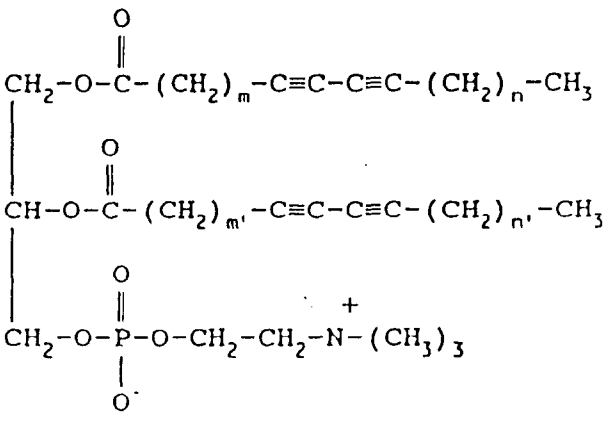
2. Fosfolipidit, kuten fosfodiglyseridit ja sfingolipidit, jotka sisältävät polyroituvia ryhmiä.

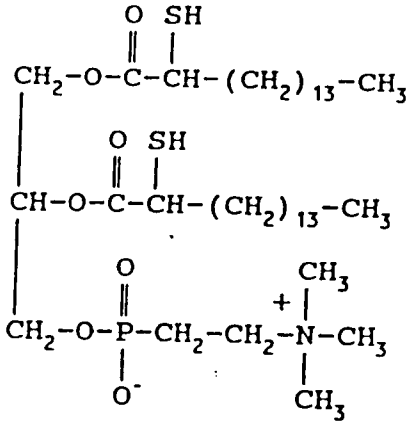
3. Tyydyttymättömät öljyt, joilla on hydrofiilisiä ryhmiä, kuten maissiöljy, auringonkukkasiemenöljy, soijapapuöljy, safloriöljy, maapähkinäöljy, puuvillansiemenöljy ja oliiviöljy.

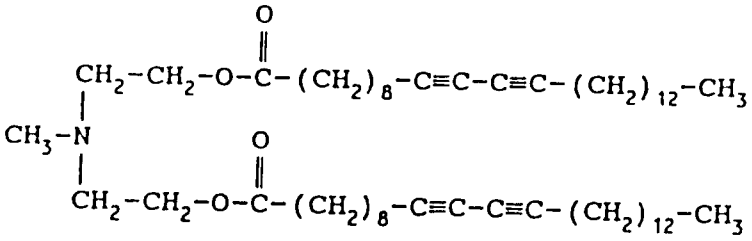
4. Tyydyttyneet ja tyydyttymättömät rasvahappojohdannaiset hydroksyyliryhmillä, esimerkiksi risiiniöljy ja härkäjyväöljy, jotka ovat d-12-hydroksioleiinihapon triglyseridejä.

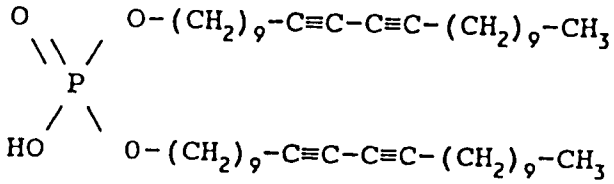
5. Yhdisteet, kuten julkaisussa "Polymerised Liposomes" (Technical Insights Inc. 1988) on kuvattu ja kuten Hub et al. ovat kuvanneet (J. Macromol. Sci. Chem. A15, (5), 1981, 701- 715). Näillä voi olla rakenteet:

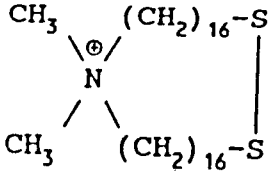


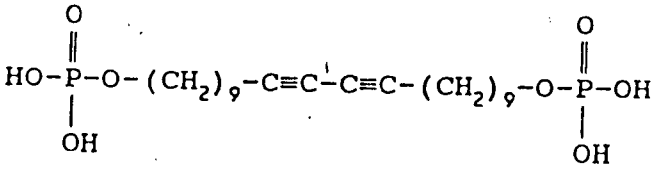


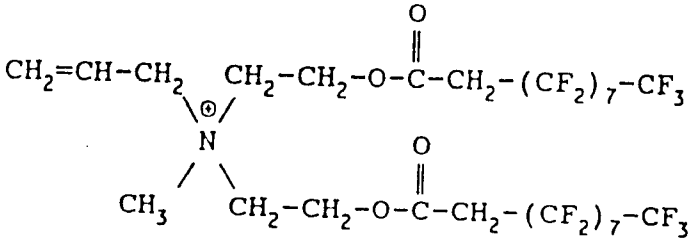


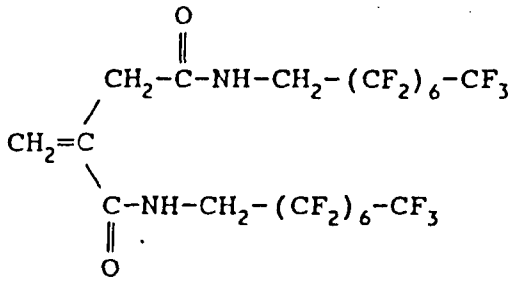


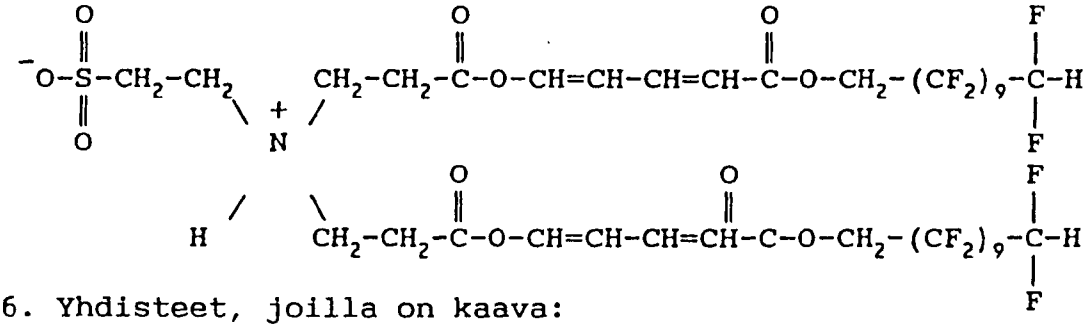












6. Yhdisteet, joilla on kaava:

$$[CH_3-(CH_2)_{12}-C\equiv C-C\equiv C-(CH_2)_8-CO-L-(CH_2)_2]_2M$$

jossa L ja M voivat olla -O-, -S- tai $-NR^{12}-$ (jossa R^{12} on H tai alkyyliryhmä), esimerkiksi yhdisteet, joissa

L = M =-O-; L =-O-, M =$-N(CH_3)-$; L = -NH-, M = -O-;

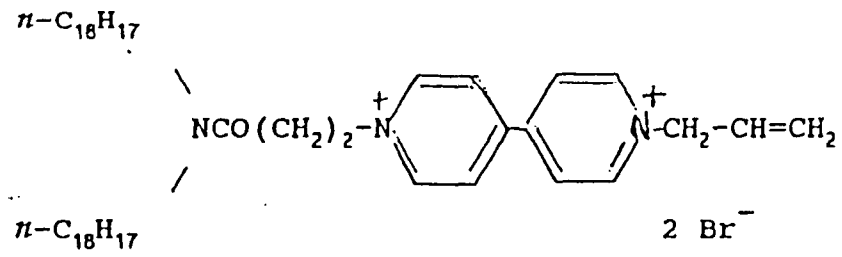
L = -O-, M = $-N^{+}(CH_3)_2-$ Br^{-} ja

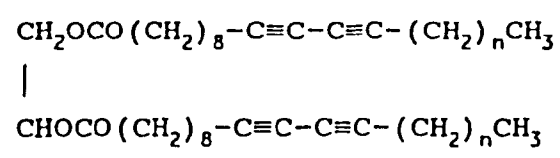
L = -O-, M = $-N(CH_2.CH_2.SO_3H)-$

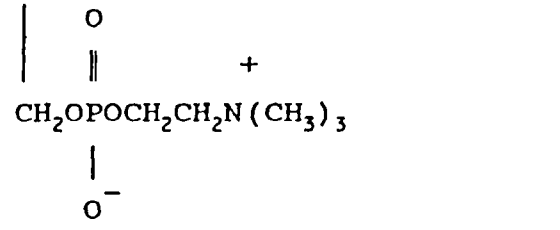
Tällaiset yhdisteet voidaan valmistaa saattamalla heksakosaani-10,12-diynoiinihapon reaktiivinen johdannainen (esim. happokloridi) reagoimaan tarkoituksenmukaisen yhdisteen $(HLCH_2CH_2)_2M$ kanssa kuivassa kloroformissa 0 °C:ssa pyridiinin läsnäollessa, mitä seuraa tarpeen mukaan kvaternisaatio.

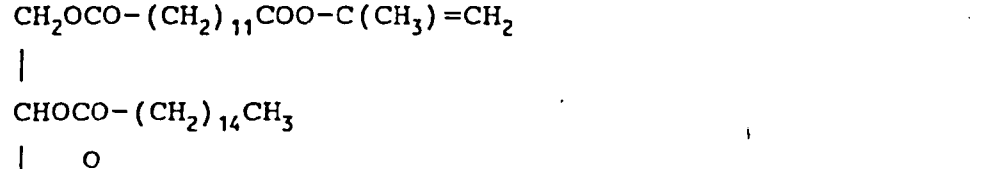
Heksakosaani-10,12-diynoiinihapon synteesiä ovat kuvanneet Singh et al. (Polym. Prep.: Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem; 26 (2), 1985, 184-5). Happokloridi voidaan valmistaa oksalyylikloridireaktiolla.

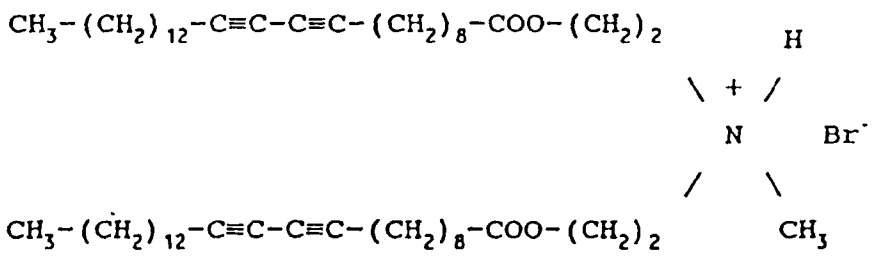
7. Yhdisteet, kuten Paleos on kuvannut (Chem. Soc. Rev. 14, 1985, 45 - 67), joilla on esimerkiksi seuraavat rakenteet:

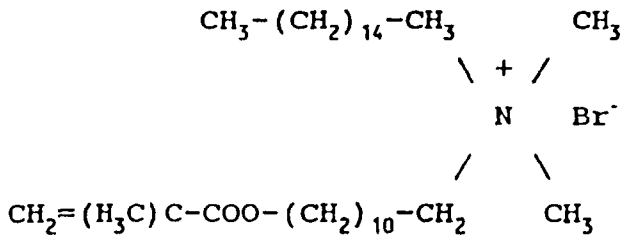


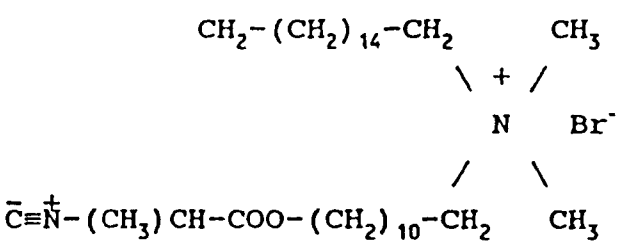


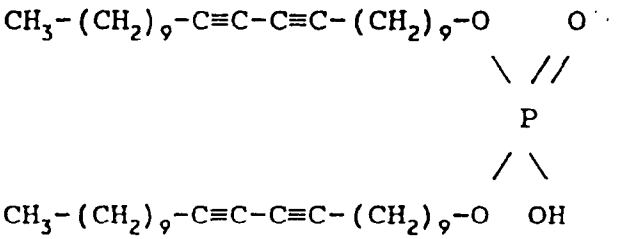


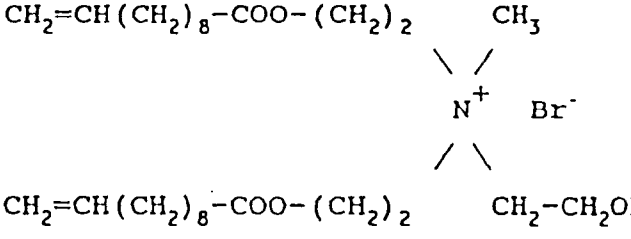


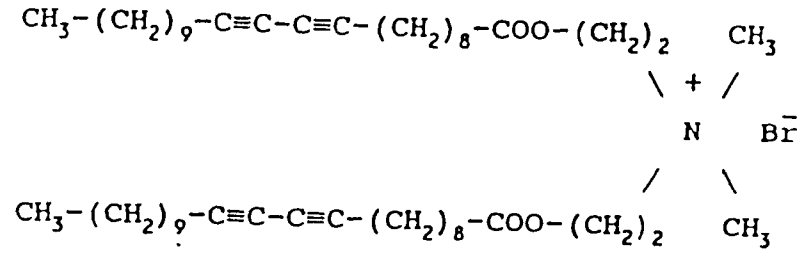


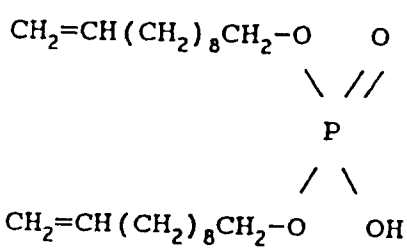












8. α-amino rasvahappojen esterit, jotka voivat olla itse kondensoituneita, kuten Folda et al. ovat kuvanneet (Rapid. Commun. 3, 1982, 167 - 174), esim. metyyli-2-amino-oktadekanoaatti, dokosanyyli-2-amino-oktadekanoaatti, metyyli-2-aminohekskosanoaatti ja dokosanyyli-2-amino-heksakosanoaatti.

Nämä pitkäketjuiset aminohappoesterit voidaan valmistaa tyydyttyneistä karboksyylihapoista α-bromauksella käyttäen Hell-Volhard-Zelinsky reaktiota. Saadut α-bromihapot muutetaan vastaavaksi aminohapoksi Cheronis et al:in menetelmällä (J. Org. Chem. 6 (1949) 349). Aminohappo hydrokloridien metyyliesterit valmistetaan antamalla kuivan HCl-kaasun kulkea suspension läpi, jossa on aminohappoa palautusjäähdytetyssä metanolissa. Aminohappo hydrokloridien dokosanyyliesteri valmistetaan saattamalla kuiva HCl kaasu kulkemaan 1 : 1 aminohappo/dokosanoliseoksen läpi 110 °C:ssa. Sitten esteri hydrokloridit suspendoidaan kui-

vassa kloroformissa ja muutetaan vapaaksi amiiniksi antamalla kuivan ammoniakin kulkeutua suspension läpi.

9. Sulfosukkiinihapon pitkäketjuiset esterit, joissa on polymeroituvia funktionaalisia ryhmiä.

10. Pyridinium dikarboksyylihappojen pitkäketjuiset esterit (esim. 3,5-dikarboksi-1-metyylipyridiniumjodidi), jotka sisältävät polymeroituvia funktionaalisia ryhmiä.

11. Jodatut röntgensädevarjoaineet, jotka sisältävät pitkäketjuisia eetteri- tai esteriryhmiä, joissa on polymeroituvia funktionaalisia ryhmiä. Täten esimerkiksi röntgensädevarjoaineella, joka on johdettu jotalamiinihaposta, voi olla monia dihydroksialkyyliryhmiä, joista yksi tai kaksi voi olla esteröity pitkällä rasvahappojen ketjulla. Täten esimerkiksi joheksoli voidaan osittain suojata muodostamalla asetonidijohdannainen, jossa on kaksi tai kolme dehydroksialkyyliryhmää, mitä seuraa reaktio aktivoidun rasvahapon, esim. happokloridin kanssa ja suojauksen poistaminen asetonidiryhmien poistamiseksi. Tällainen amfifiili voidaan helposti ristisitoa reaktiolla dikarboksyylihapon kanssa rakkulan muodostumisen jälkeen.

12. Sorbitaanin di-rasvahappoesterit. Monet läsnäolevat vapaat hydroksyyliryhmät mahdollistavat ristisitomisen dihapoilla. Vaihtoehtoisesti esteröivät rasvahapporyhmät voivat olla tyydyttymättömiä mahdollistaen olefiinisen polyaddition.

13. Diesterit, joilla on kaava

$R^{13}.CO.O.CH(R^{14}).O.CO.R^{13}$

jossa R^{14} on hydrofiilinen ryhmä ja kukin R^{13} on lipofiilinen ryhmä, joista ainakin yhdellä R^{13}:sta ja R^{14}:sta on polymeroituva ryhmä ja/tai funktionaalisia ryhmiä, jotka mahdollistavat ristisitoutumisen. Tällaiset yhdisteet voidaan valmistaa saattamalla kaavan $R^{14}.CH.Hal_2$ dihalidi rea-

goimaan hapon R^{13}.COOH suolan kanssa. Ne hajoavat biologisesti erittäin helposti.

Voi olla myös edullista sisällyttää kapselointiaineeseen yhtä tai useampia lisäamfifiilejä, kuten kolesterolia, jotka eivät ole sitoutuneet tai polymeroituneet, mutta toimivat mikrokuplien stabiilisuuden ja/tai joustavuuden parantamiseksi.

Kuten edellä on todettu, mikrokuplat voidaan stabiloida liittämällä erityinen aine yhteen kapseloidun kaasun kanssa. Tällaisia partikkeleita ovat esimerkiksi piioksidi ja rautaoksidi. Edullinen partikkelikoko tällaisille stabiloiville partikkeleille on alueelta 1 - 500 nm, riippuen mikrokuplien koosta. Näiden partikkeleiden tulisi olla sellaisia, että ne on ainoastaan osittain kostutettu nesteväliaineella, jota käytetään misellien dispergoimiseen, ts. partikkeleiden aineen ja nesteen kontaktikulman tulisi olla n. 90 °.

Stabiloivat partikkelit voivat sisältää funktionaalisia ryhmiä, jotka ovat vuorovaikutuksessa amfifiilien kanssa muodostaen kovalenttisia tai muita sidoksia. Kaavan (II) polymeroitujen amfifiilien partikkelit voivat olla hyödyllisiä tässä yhteydessä. Kolloidisilla piioksidipartikkeleilla voi ola partikkelikoko alueelta 5 - 50 nm ja ne voivat sisältää pinnalla silanoliryhmiä, jotka pystyvät olemaan vuorovaikutuksessa amfifiilin kanssa vetysidosten kautta tai muodostamalla kovalenttisia sidoksia.

Amfifiilit voivat stabiloida kaasun tai kaasuprekursorin muodostaen yksinkertaisen kerroksen nestemäisen väliaineen ja kaasun tai kaasuprekursorijärjestelmän rajapinnalle tai muodostaen rakkuloita, jotka koostuvat yhdestä tai useammasta kerroksesta, sisältäen kaasua tai kaasuprekursoria. Nesteväliaine voi olla vesi tai mikä tahansa ei-vesipitoinen neste, joka on ominaisuuksiltaan polaarinen, proottinen, aproottinen tai apolaarinen.

Yksinkertaisten kerrosten tai monikertaisten kerrosten järjestelmän stabilointia tai rakkuloiden muodostusta voidaan aktivoida, kuten kirjallisuudessa on yksityiskohtaisesti kuvattu, sonikoimalla tai jopa ravistamalla amfifiilistä aineseosta tarkoituksenmukaisessa väliaineessa, tai rakkulat voidaan muodostaa millä tahansa tavallisella liposomi/rakkula-muodostusperiaatteella.

Amfifiilit voivat muodostaa tavallisia misellejä tai käänteismisellejä, kun käytetään apolaarista ei-vesipitoista väliainetta. Stabiloidut järjestelmät voidaan kuivata tai kylmäkuivata tai ei-vesipitoinen faasi voidaan haihduttaa. Saatu kuivattu järjestelmä voidaan suspendoida uudestaan mihin tahansa fysiologisesti hyväksyttävään liuottimeen, kuten suolaliuokseen tai fosfaattipuskuriin, käyttäen valinnaisesti suspendointi- tai emulgointiainetta.

Polymerointimenetelmät, joita käytetään rakkuloiden stabiloimiseksi, ovat hyvin tunnettuja menetelmiä polymeerikemiassa, ts. kuten on kuvattu julkaisuissa "Comprehensive Polymer Science", osa 1 - 7, Pergamon Press, Oxford 1989 tai "Methoden der Organischen Chemie", Houben-Weyl, Makromolekulare Stoffe Band E20/1-3, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1987. Esimerkkejä sopivista menetelmistä voivat olla ketjupolymerointimenetelmät, kuten ioni- tai radikaalipolymerointi tai metallikatalysoitu polymerointi tai järjestelmät voivat polymeroitua spontaanisti vaihepolymeroinnilla, kun yksinkertaisia kerroksia tai rakkuloita mudostuu. Initiaattoreina voidaan käyttää UV-säteilyä tai yksinkertaisesti pH:n muuttamista tai radikaali initiaattoreita. Erityisen mielenkiintoinen tässä voi olla aineen kapselointi, jossa menetelmässä nostettu lämpötila muodostaa kaasua ja muodostaa samanaikaisesti vapaita radikaaleja, jotka käynnistävät ympäröivän kuoren polymeroinnin. Tällaista ainetta on kuvattu julkaisussa "Comprehensive Polymer Science", osa 3, Pergamon Press, Oxford

1989, sivu 99, ts. atso-bis-isobutyronitriiliä (AIBN), joka UV-säteilyttämällä tai lämmittämällä 40 °C:seen käynnistää N_2:n kehittymisen samalla muodostaen kaksi syaani-isopropyyliradikaalimolekyyliä, jotka voivat käynnistää polymeroinnin tai yhdistyä nopeasti. Amfifiilien, jotka sisältävät tyydyttymättömiä ryhmiä, polymerointi voidaan myös käynnnistää sonikoimalla (katso Price et al., Brit. Polym. J. 23 (1990), 63 - 66) esim. kun tätä käytetään kaasu-nesteessä emulsion mudostamiseksi, kuten seuraavassa on yksityiskohtaisemmin kuvattu.

Vangittu kaasujärjestelmä voidaan aikaansaada käyttäen kaasuprekursoria tai itse kaasu voidaan vangita. Kaasu voidaan vangita amfifiiliseen seokseen yksinkertaisesti sekoittamalla seosta voimakkaasti ilman läsnäollessa, ts. muodostaen kaasu-nesteessä emulsioita, kuten US-patenttijulkaisussa 4 684 479 on kuvattu. Toinen hyvin vakiintunut menetelmä, jota on kuvattu US-patenttijulkaisussa 4 774 958 kaasua sisältävien kuplien muodostamiseksi, on seoksen sonikoiminen ilman läsnäollessa. Toinen hyvin tunnettu menetelmä on saattaa kaasu pumpulla kulkemaan seokseen, jossa on amfifiiliä ja nestettä. Kuten US-patenttijulkaisussa 3 900 420 on kuvattu, mikrokaasu-emulsio voidaan muodostaa käyttäen laitteistoa kaasun nopeasti lisäämiseksi nopeasti virtaavaan nesteeseen. Näin aikaansaadaan alhaisen paineen alue nesteessä, joka sisältää amfifiiliä. Sitten kaasu lisätään alhaisen paineen alueeseen ja kaasu nesteessä järjestelmä aikaansaadaan pumppaamalla nestettä järjestelmään.

Käyttäen elektrolyysiperiaatetta on mahdollista aikaansaada kaasun vangitseminen suoraan säiliöön, joka sisältää amfifiilejä. Elektrolyytit, jotka ovat tarpeellisia elektrolyysiä varten, voivat helpottaa amfifiilien lisästabiloitumista, mahdollistaen polymeroinnin. Vesipitoinen liuos, joka sisältää elektrolyyttejä, voi muodostaa vetykaasua katodilla ja happea anodilla. Elektrodit voi-

daan erottaa suolasillalla. Lisättäessä hydratsiiniä voi muodostua typpikaasua anodilla. Käyttäen Kolbe reaktiota voi myös muodostua CO_2:ta karboksyylihapoista käyttäen elektrolyysiä.

Kuten edellä on kuvattu, kaasua sisältävät rakkulat voidaan aikaansaada muodostamalla liposomeja tai rakkuloita, jotka koostuvat yhdestä tai useammasta kaksinkertaisesta kerroksesta. Näitä rakkuloita voidaan muodostaa kohotetussa paineessa niin, että kaasu sulkeutuu rakkuloihin.

On myös mahdollista muodostaa neste-neste (esim. öljy-vedessä) emulsio amfifiilisten järjestelmien läsnäollessa, kuten edellä on kuvattu, esim. sonikoimalla muodostamaan nestettä sisältäviä rakkuloita, jotka sitten voidaan polymeroida. Polymeroituja rakkuloita voidaan sitten käsitellä nesteen poistamiseksi (tavallisesti haihtuva hiilivety) haihduttamalla, jonka nesteen kiehumispiste on suhteellisen alhainen, tai uuttamalla alhaisen kiehumispisteen liuottimella, joka itsessään voidaan poistaa haihduttamalla. Alhaisen kiehumispisteen nestesisältöjen haihtuminen voi tapahtua myös spontaanisti sonikoinnin aikana. Kun neste rakkuloissa on vesi, se voidaan poistaa kylmäkuivaamalla.

Seuraavien esimerkkien tarkoitus on pelkästään kuvaava.

Bis-linoleyyli-lesitiiniä on kaupallisesti saatavissa Lipids Products:ista, Surrey, UK.

Esimerkki 1

Kyllästetty bis-linoleyyli-lesitiiniliuos vesipitoisessa väliaineessa saatiin sekoittamalla 100 mg amfifiiliä 100 ml:n kanssa steriiliä pyrogeenivapaata vettä. Kyllästetty liuos suodatettiin 0,45 µm suodattimen läpi ja saatua liuosta sonikoitiin 1 - 10 minuuttia ilman läsnäollessa. Sonikoinnin aikana ilmaa jäi liuokseen ja kaasu-neste-emulsio muodostui. Amfifiilin yksinkertaisen ker-

roksen polymeroituminen kaasu-neste rajapinnalla aikaansaatiin UV-säteilyttämällä liuosta 254 µm:ssä käyttäen xenon lamppua tai lisäämällä radikaali- initiaattoria.

Saatu tuote sisälsi mikropalloja, joihin kaasu oli sulkeutunut. Mikropallot erotettiin liikapolymeroidusta amfifiilistä käyttäen erotussuppiloa. Saadut mikropallot suspendoitiin uudestaan steriiliin pyrogeenivapaaseen suolaliuokseen ja täytettiin 10 ml:n ampulleihin. Tuote valmistettiin käyttäen aseptisia menetelmiä "puhtaassa huoneessa" (LAF-asema) antamaan steriili, pyrogeenivapaa tuote. Mikropallojen partikkelikoot olivat alueella 0,5 - 10 µm.

Esimerkki 2

Esimerkin 1 menetelmä toistettiin käyttäen polymeroituvaa amfifiiliä yhdistettä bis-(trieikoso-10,12-diynoyyli)fosfaattidyylikoliinia (Hirth et al; Helv. Chim. Acta 40, 957, 1928).

Esimerkki 3

100 mg bis-linoleyyli-lesitiiniä liuotettiin seokseen, jossa oli kloroformi/metanolia. Seos kaadettiin pyörökolviin ja orgaaninen faasi haihdutettiin käyttäen rotavaporia niin, että ohut kalvo lesiitiinijohdannaista muodostui pullon sisäpinnalle. 10 ml steriiliä pyrogeenivapaata vettä lisättiin ja lipidit dispergoitiin liuokseen sonikoimalla ilma/nesterajapintaa 5 - 15 minuuttia. Muodostui kaasua sisältäviä rakkuloita ja kaasua sisältävät mikropallot polymeroitiin UV-säteilyttämällä liuosta 254 nm:ssä käyttäen xenon lamppua tai lisäämällä initiaattoria sekoitusolosuhteissa. Polymeroidut, kaasua sisältävät rakkulat erotettiin liikapolymeroiduista amfifiileistä käyttäen erotussuppiloa. Saadut rakkulat suspendoitiin steriiliin pyrogeenivapaaseen suolaliuokseen ja suodatettiin antamaan tuote, joka sisälsi mikropalloja alueelta 0,5 - 5 µm. Tuote valmistettiin käyttäen aseptisia menetelmiä "puhtaassa huoneessa" (LAF-asema) antamaan steriili

pyrogeenivapaa tuote. Lopputuote täytettiin 10 ml:n ampulleihin.

Esimerkki 4

Esimerkin 3 menetelmä toistettiin käyttäen polymeroituvaa amfifiiliä, yhdistettä bis-(trieikoso-10,12-diynoyyli)fosfaattidyylikoliinia (Hirth et al; Helv. Chim. Acta 40, 957, 1928).

Polymeroituvien amfifiilien valmistus

Esimerkki 5

Tetraetyleeniglykoli mono-12-(metakryylikryloyylioksi)dodekanoaatti

12-(metakryloyylioksi)dodekanoiinihappoa (Regen et al., J. Am. Chem. Soc. 1982, 104, 795) (2,75 g, 9,65 mmol) liuotettiin tetrahydrofuraaniin (45 ml) ja liuos, jossa oli oksalyylikloridia (2,1 ml, 24,2 mmol) tetrahydrofuraanissa (5 ml) lisättiin tipoittain. Seosta sekoitettiin 24 tuntia huoneenlämpötilassa ja sitten liuotin haihdutettiin alennetussa paineessa. Jäännös liuotettiin tetrahydrofuraaniin (25 ml) ja lisättiin tipoittain liuokseen, jossa oli tetraetyleeniglykolia (1,88 g, 9,65 mmol) ja pyridiiniä (0,92 g, 11,7 mmol) tetrahydrofuraanissa (35 ml). Seosta sekoitettiin 24 tuntia huoneenlämpötilassa. Saatu pyridiinisuola suodatettiin pois ja liuotin haihdutettiin. Kromatografinen puhdistus silikageelipylväässä (etyyliasetaatti) antoi 1,67 g (38 %) otsikkoyhdistettä. ^{1}H NMR (60 MHz, $CDCl_3$): δ 1,3 (br s, 18H, $(CH_2)_9$), 1,95 (m, 3H, $C{=}CCH_3$), 2,1 - 2,6 (m, 2H, CH_2COO), 3,5 - 3,8 (m, 14H, $3xCH_2OCH_2CH_2{+}COOCH_2CH_2$), 4,0 - 4,4 (m, 4H, $COOCH_2$), 5,52 (m, 1H, vinyyli), 6,10 (m, 1H, vinyyli).

Esimerkki 6

Polyetyleeniglykoli (550) metyylieetteri-12-(metakryloyylioksi)dodekanoaatti

12-(metakryloyylioksi)dodekanoiinihappoa (1,90 g, 6,69 mmol) liuotettiin tetrahydrofuraaniin (20 ml) ja liuos, jossa oli oksalyylikloridia (2,12 g, 16,7 mmol)

tetrahydrofuraanissa (10 ml) lisättiin tipoittain. Seosta sekoitettiin 24 tuntia huoneenlämpötilassa ja sitten liuotin haihdutettiin alennetussa paineessa. Jäännös liuotettiin tetrahydrofuraaniin (10 ml) ja lisättiin tipoittain liuokseen, jossa oli polyetyleeniglykoli (550) monometyylieetteriä (3,68 g, 6,69 mmol) ja pyridiiniä (0,53 g, 6,69 mmol) tetrahydrofuraanissa (25 ml). Seosta sekoitettiin 24 tuntia huoneenlämpötilassa. Saostunut pyridiinisuola suodatettiin pois ja liuotin haihdutettiin. Kromatografinen puhdistus silikageelipylväässä (kloroformi) antoi 2,31 g (42,3 %) otsikkoyhdistettä. ^{1}H NMR (60 MHz, $CDCl_3$): δ 1,3 (br s, 18H $(CH_2)_9$), 1,95 (m, 3H, $C=CCH_3$), 2,1 - 2,5 (m, 2H, CH_2COO), 3,11 (s, 3H, CH_3O), 3,5 - 3,8 (m, 25H (keskimäärin), $CH_2OCH_2CH_2$+$COOCH_2CH_2$), 3,9 - 4,4 (m, 4H, $COOCH_2$), 5,52 (m, 1H, vinyyli), 6,10 (m, 1H, vinyyli).

Esimerkki 7

Polyetyleeniglykoli (2000) metyylieetteri-12-(metakryloyylioksi)dodekanoaatti

12-(metakryloyylioksi)dodekanoiinihappo (2,84 g, 0,01 mol) tetrahydrofuraanissa (20 ml) saatettiin reagoimaan oksalyylikloridin (3,0 g, 0,024 mol) kanssa antamaan vastaava happokloridi. Tämä happokloridi (3,0 g, 0,01 mol) liuotettuna vedettömään tetrahydrofuraaniin (10 ml) lisättiin tipoittain seokseen, jossa oli polyetyleeniglykoli (2 000) monometyylieetteriä (20,0 g, 0,01 mol) ja vedetöntä pyridiiniä (0,83 g, 0,01 mol) vedettömässä tetrahydrofuraanissa (300 ml). Seosta sekoitettiin 48 tuntia huoneenlämpötilassa. Saatu neste puhdistettiin flashkromatografisesti (silikageeli/etyyliasetaatti) antamaan 16,5 g (75 %) otsikkoyhdistettä. ^{1}H NMR (60 MHz, $CDCl_3$): δ 1,20 (s, 18H, CH_2), 2,15 (m, 2H, CH_2COOH), 3,5 (s, 3H, CH_3O), 3,6 (s, 180H, 90xCH_2O), 4,0 (m, 4H, 2x$COOCH_2$), 5,7 - 6,0 (m, 3H, CH_2= ja =CH).

Esimerkki 8

a) 16-(metakryloyylioksi)heksadekanoiinihappo

16-hydroksiheksadekanoiinihappoa (6,81 g, 25,0 mmol) liuotettiin tetrahydrofuraaniin (150 ml) ja liuos jäähdytettiin 0 °C:seen ennen pyridiinin (2,73 g, 34,5 mmol) lisäämistä. Metakryloyylikloridia (2,61 g, 25,0 mmol) liuotettiin tetrahydrofuraaniin (75 ml) ja lisättiin tipoittain. Seosta sekoitettiin yksi tunti 0 °C:ssa ja sitten huoneenlämpötilassa 24 tuntia. Liuotin poistettiin alennetussa paineessa (huoneenlämpötila), jäännös suspendoitiin eetteriin (100 ml) ja seos pestiin tislatulla vedellä. Eetterikerros kuivattiin ($MgSO_4$) ja eetteri haihdutettiin. Kromatografinen puhdistus silikageelipylväässä (1 : 2 etyyliasetaatti/heksaani) antoi 5,0 g (64 %) otsikkoyhdistettä. ^1H NMR (60 MHz, $CDCl_3$): δ 1,3 (br s, 26H, $(CH_2)_{13}$), 1,95 (m, 3H, $C=CCH_3$), 2,1 - 2,6 (m, 2H, CH_2COO), 4,0 - 4,4 (m, 2H, $COOCH_2$), 5,52 (m, 1H, vinyyli), 6,10 (m, 1H, vinyyli).

b) Tetraetyleeniglykoli mono-16-(metakryloyylioksi)heksadekanoaatti

16-(metakryloyylioksi)heksadekanoiinihappoa (2,05 g, 6,57 mmol) liuotettiin tetrahydrofuraaniin (25 ml) ja liuos, jossa oli oksalyylikloridia (1,4 ml, 16,5 mmol) tetrahydrofuraanissa (10 ml) lisättiin tipoittain. Seosta sekoitettiin 24 tuntia huoneenlämpötilassa ja sitten liuotin haihdutettiin alennetussa paineessa. Jäännös liuotettiin tetrahydrofuraaniin (10 ml) ja lisättiin tipoittain liuokseen, jossa oli tetraetyleeniglykolia (1,07 g, 5,50 mmol) ja pyridiiniä (0,44 g, 5,50 mmol) tetrahydrofuraanissa (25 ml). Seosta sekoitettiin 24 tuntia huoneenlämpötilassa. Saostunut pyridiinisuola suodatettiin pois ja liuotin haihdutettiin. Kromatografinen puhdistus silikageelipylväässä (2 : 1 etyyliasetaatti/heksaani) antoi 0,84 g (30 %) otsikkoyhdistettä. ^1H NMR (60 MHz, $CDCl_3$): δ 1,3 (br s, 26H, $(CH_2)_{13}$), 1,95 (m, 3H, $C=CCH_3$),

2,1 - 2,6 (m, 2H, CH_2COO), 3,5 - 3,8 (m, 14H, $3xCH_2OCH_2C-H_2+COOCH_2CH_2$), 4,0 - 4,4 (m, 4H, $COOCH_2$), 5,52 (m, 1H, vinyyli), 6,10 (m, 1H, vinyyli).

Esimerkki 9

Polyetyleeniglykoli (350) metyylieetteri-16-(metakryloyylioksi)heksadekanoaatti

Tuote valmistettiin 16-(metakryloyylioksi)heksadekanoiinihaposta (valmistettu kuten esimerkissä 8(a)) ja polyetyleeniglykoli (350) monometyylieetteristä käyttäen esimerkissä 6 esitettyä menetelmää.

Esimerkki 10

a) 12-(akryloyylioksi)dodekanoiinihappo

12-hydroksidodekanoiinihappo (5,0 g, 0,023 mol) liuotettuna tetrahydrofuraaniin (100 ml) ja pyridiiniin (2,16 g, 0,027 mol) jäähdytettiin 0 °C:seen. Akryloyylikloridia (3,15 g, 0,023 mol) tetrahydrofuraanissa (75 ml) lisättiin sitten tipoittain liuokseen. Seosta sekoitettiin viisi tuntia 0 °C:ssa ja sitten yön yli huoneenlämpötilassa. Saostunut pyridiinisuola suodatettiin pois ja liuotin poistettiin tyhjössä. Saatu neste puhdistettiin flashkromatografisesti (silikageeli/kloroformi) antamaan 2,5 g (40 %) otsikkoyhdistettä. ^1H NMR (60 MHz, $CDCl_3$): δ 1,20 (s, 18H, CH_2), 2,15 (m, 2H, CH_2COOH), 4,0 (m, 2H, $COOCH_2$), 5,7 - 6,0 (m, 3H, $CH_2=$ ja = CH).

b) Tetraetyleeniglykoli mono-12-(akryloyylioksi)-dodekanoaatti

12-akryloyylioksidodekanoiinihappo (2,00 g, 0,007 mol) dietyylieetterissä (20 ml) saatettiin reagoimaan oksalyylikloridin (2,40 g, 0,019 mol) kanssa antamaan vastaava happokloridi. Tämä happokloridi (1,80 g, 0,006 mol) liuotettuna vedettömään kloroformiin (10 ml), lisättiin tipoittain seokseen, jossa oli tetraetyleeniglykolia (1,20 g, 0,006 mol) ja vedetöntä pyridiiniä (0,50 g, 0,006 mol) vedettömässä kloroformissa (30 ml). Seosta sekoitettiin yön yli huoneenlämpötilassa. Saatu neste puhdistet-

tiin flashkromatografisesti (silikageeli/etyyliasetaatti) antamaan 1,10 g (40 %) otsikkoyhdistettä värittömänä öljynä. ^{1}H NMR (60 MHz, $CDCl_3$): δ 1,20 (s, 18H, CH_2), 2,15 (m, 2H, $C\underline{H}_2COOH$), 3,50 (s, 3H, CH_3O), 3,6 (s, 14H, 7xCH_2O), 4,0 (m, 5H, 2x$COOC\underline{H}_2$ ja OH), 5,7 - 6,0 (m, 3H, CH_2= ja =CH).

Esimerkki 11

Tetraetyleeniglykoli mono-10,12-trikosadiynoaatti

10,12-trikosadiynoiinihappo (2,50 g, 0,007 mol) tetrahydrofuraanissa (30 ml) saatettiin reagoimaan oksalyylikloridin (2,25 g, 0,017 mol) kanssa antamaan vastaava happokloridi. Tämä happokloridi (2,45 g, 0,007 mol) liuotettuna vedettömään tetrahydrofuraaniin (10 ml) lisättiin tipoittain seokseen, jossa oli tetraetyleeniglykolia (1,32 g, 0,007 mol) ja vedetöntä pyridiiniä (0,83 g, 0,01 mol) vedettömässä tetrahydrofuraanissa (40 ml). Seosta sekoitettiin yön yli huoneenlämpötilassa. Saostunut pyridiinisuola suodatettiin pois ja liuotin poistettiin tyhjössä. Saatu neste puhdistettiin flashkromatografisesti (silikageeli/etyyliasetaatti) antamaan 1,50 g (41 %) otsikkoyhdistettä värittömänä öljynä. ^{1}H NMR (60 MHz, $CDCl_3$): δ 0,88 (m, 3H, $C\underline{H}_3CH_2$), 1,30 (m, 28H, CH_2), 2,20 (m, 6H, CH_2), 3,65 (s, 14H, 7xCH_2O), 4,20 (m, 2H, CH_2CO).

Esimerkki 12

Polyetyleeniglykoli (550) metyylieetteri-10,12-trikosadiynoaatti

10,12-trikosadiynoiinihappo (2,50 g, 0,007 mol) tetrahydrofuraanissa (30 ml) saatettiin reagoimaan oksalyylikloridin (2,25 g, 0,017 mol) kanssa antamaan vastaava happokloridi. Tämä happokloridi (2,45 g, 0,007 mol) liuotettuna vedettömään tetrahydrofuraaniin (10 ml) lisättiin tipoittain seokseen, jossa oli polyetyleeniglykoli (550) monometyylieetteriä (3,85 g, 0,007 mol) ja vedetöntä pyridiiniä (0,83 g, 0,01 mol) vedettömässä tetrahydrofuraanissa (30 ml). Seosta sekoitettiin yön yli huoneenlämpötilassa. Saostunut pyridiinisuola suodatettiin pois ja liuo-

tin poistettiin tyhjössä. Saatu neste puhdistettiin flash-kromatografisesti (silikageeli/etyyliasetaatti) antamaan 2,72 g (41 %) otsikkoyhdistettä värittömänä öljynä. ^{1}H NMR (60 MHz, $CDCl_3$): δ 0,88 (m, 3H, $C\underline{H}_3CH_2$), 1,30 (m, 28H, CH_2), 2,20 (m, 6H, CH_2), 3,65 (s, 48H, 24xCH_2CO), 3,50 (s, 3H, CH_3O), 4,20 (m, 2H, CH_2CO).

Esimerkki 13

a) Metyyli-10,12-trikosadiynoaatti

10,12-trikosadiynoiinihappoa (3,0 g, 0,0084 mol), metanolia (15 ml) ja väkevää rikkihappoa (0,8 ml) kuumennettiin palautusjäähdyttäen ja sekoitettiin yksi tunti. Jäähdytetty seos otettiin talteen eetteriin (40 ml) ja pestiin 10-%:isella $NaHCO_3$:lla (20 ml) ja vedellä (20 ml) ja orgaaninen faasi kuivattiin ($MgSO_4$). Liuottimen haihduttaminen antoi 2,68 g (74 %) otsikkoyhdistettä. ^{1}H NMR (60 Mhz, $CDCl_3$): δ 0,98 (m, 3H, $C\underline{H}_3CH_2$), 1,28 (m, 28H, CH_2), 2,25 (m, 6H, CH_2), 3,70 (s, 3H, CH_3O).

b) N-(2',3'-dihydroksipropyyli)-10,12-trikosadiyyniamidi

Metyyli-10,12-trikosadiynoaatti (1,69 g, 4,67 mmol) liuotettiin meanoliin. 3-amino-1,2-propaanidiolia (0,509 g, 5,6 mmol) ja natriummetoksidia 2,5-%:isena liuoksena metanolissa (0,146 g, 3 mol-%) lisättiin. Seosta sekoitettiin palautusjäähdyttäen kolme tuntia ja liuotin haihdutettiin. Raaka tuote uudelleenkiteytettiin kloroformista.

Saanto: 1,00 g (51 %). ^{1}H NMR (60 MHz, $CDCl_3$): δ 0,7 - 1,0 (m, 3H, $C\underline{H}_3CH_2$), 1,3 (s, br, 28H, CH_2), 2,0 - 2,4 (m, 6H, CH_2), 3,3 - 3,8 (m, 5H, 2xCH_2+CH (propaanidioli)), 6,0 - 6,3 (m, 1H, NH).

Esimerkki 14

N,N'-bis(2,3-dihydroksipropyyli)-2,4,6-trijodi-5-(trikosa-10,12-diynoyyliamino)isoftaaliamidi

5-amino,N,N'-bis(2,3-diasetoksipropyyli)-2,4,6-trijodi-isoftaaliamidia (2,19 g, 2,5 mmol) ja 10,12-triko-

sadiynoyylikloridia (1,82 g, 5 mmol) liuotettiin 20 ml:aan dikloorimetaania. Liuosta sekoitettiin kolme päivää ympäristön lämpötilassa typen ilmakehässä. TLC (etyyliasetaatti) osoitti, että reaktio oli täydellinen. Reaktioseos haihdutettiin ja liuotettiin seokseen, jossa oli metanolia (30 ml) ja 1 M natriumhydroksidiliuosta (15 ml). Yhden tunnin kuluttua TLC (metanoli/kloroformi) osoitti, että reaktio oli täydellinen. Liuos neutraloitiin väkevällä vetykloridihapolla. Jäännös liuotettiin kloroformiin ja suodatettiin. Liuotin poistettiin ja reaktioseos puhdistettiin silikageelin läpi metanoli/kloroformilla (1 : 3) antamaan otsikkoyhdiste. ^{1}H NMR (300 Mhz, DMSO): δ 0,8 (CH_3, t), 1,2 - 1,7 (17xCH_2, m), 2,2 - 2,3 (2xCH_2, t), 3,1 - 3,2 (2xCH_2NH, m), 3,3 - 3,5 (2xCH_2OH, m), 3,6 - 3,8 (2xCHOH), 4,4 - 4,7 (4xOH, m), 8,4 - 8,5 (2xCONH, m), 9,8 (2xArNHCO, s).

Esimerkki 15

N-(3',4',5'-trihydroksi-6'-hydroksimetyylitetrahydropyran-2'-yyli)-10,12-trikosadiyyniamidi

1-amino-1-deoksi-ß-D-galaktoosia (180 mg, 1 mmol), 10,12-trikosadiynoiinihappoa (350 mg, 1 mmol) ja 1-etyyli-3-(3-dimetyyliaminopropyyli)karbodi-imidiä liuotettiin 25 ml:aan kuivaa dimetyyliformamidia ja sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Liuotin poistettiin tyhjössä, jäännös liuotettiin uudestaan kloroformi/metanoliin (1 : 1), suodatettiin ja puhdistettiin suorafaasikromatografisesti CHROMATOTRON:illa. Tärkeät jakeet kerättiin, väkevöitiin tyhjössä ja tuote tunnistettiin NMR:llä.

Esimerkki 16

6-(2',6'-diaminoheksanoyyliamino)-3,4,5-trihydroksitetrahydropyran-2-yylimetyyli-10,12-trikosadiynoaatti

1-amino-1-deoksi-ß-D-galaktoosia (180 mg, 1 mmol) ja Fmoc-Lys(Boc)-OPfp (650 mg, 1 mmol) liuotettiin 4 ml:aan kuivaa dimetyyliformamidia ja sekoitettiin huo-

neenlämpötilassa yön yli. Liuotin poistettiin tyhjössä, jäännös liuotettiin uudestaan asetonitriili/veteen (1 : 1), suodatettiin ja puhdistettiin käänteisfaasikromatografisesti (Lobar RP8B, asetonitriili/vesi 50 : 50 ja 65 : 35). Tärkeät jakeet kerättiin, väkevöitiin tyhjössä ja tuote tunnistettiin NMR:llä. Puhdistettu tuote (1 g, 1 mmol), 10,12-trikosadiynoiinihappo (350 mg, 1 mmol) ja 1-etyyli-3-(3-dimetyyliaminopropyyli)karbodi-imidi liuotettiin 10 ml:aan kuivaa dimetyyliformamidia ja sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Liuotin poistettiin tyhjössä, jäännös liuotettiin uudestaan kloroformi/metanoliin (95 : 5), suodatettiin ja puhdistettiin suorafaasikromatografialla CHROMATOTRON:illa. Tärkeät jakeet kerättiin, väkevöitiin tyhjössä ja tuote tunnistettiin NMR:llä. α-epsilon-aminoryhmien suojaryhmä poistettiin standardireaktioilla. Boc poistettiin käsittelemällä trifluorietikkahappo/metyleenikloridilla 30 minuuttia. Liuotin poistettiin tyhjössä. Fmoc poistettiin käsittelemällä jäännöstä 20-%:isella piperidiinillä dimetyyliformamidissa 30 minuuttia ja liuotin poistettiin tyhjössä. Lopputuote puhdistettiin käänteisfaasikromatografisesti (Lobar RP8B).

Esimerkki 17

(3,4,5,6-tetrahydroksitetrahydropyran-2-yylimetyyli)-10,12-trikosadiynoaatti

1,2;3,4-di-O-isopropylideeni-D-galaktopyranoosi (2,6 g, 10 mmol) ja 10,12-trikosadiynoiinihappo (3,5 g, 10 mmol) liuotettiin 25 ml:aan metyleenikloridia. 1-etyyli-3-(3-dimetyyliaminopropyyli)karbodi-imidiä (2 g, >10 mmol) lisättiin puhtaana. Reaktioseosta sekoitettiin yön yli huoneenlämpötilassa. Reaktioseos laimennettiin 100 ml:ksi, uutettiin vedellä (2 x 25 ml), kuivattiin $MgSO_4$:llä ja liuotin poistettiin tyhjössä. Raakaa tuotetta käsiteltiin trifluorietikkahapolla (10 ml) huoneenlämpötilassa 30 minuuttia, haihdutettiin tyhjössä ja puhdistettiin suorafaasikromatografisesti CHROMATOTRON:lla ja elu-

oitiin metanoli/kloroformilla (5 : 95). Tuote tunnistettiin NMR:llä.

Esimerkkien 18 - 41 ultraäänivarjoaineiden valmistus

i) Yleinen valmistusmenetelmä

Polymeroituva amfifiili liuotettiin minimimäärään metanolia ja lisättiin seokseen, jossa oli vettä ja hiilivetyä. Komomeeri ja/tai 2,2'-atsobisisobutyronitriili (AIBN), liuotettuna minimimäärään metyleenikloridia, lisättiin valinnaisesti ja typpeä kuplitettiin seokseen yksi minuutti, minkä jälkeen seosta sonikoitiin typen ilmakehässä käyttäen LABSONIC 2000 laitteistoa, sonikointisondi (pituus 127 mm, läpimitta 9,5 mm) pantiin 2 - 3 cm seoksen pinnan alapuolelle ja käytetty energia oli "täysiteho" tai "puoliteho" pohja-asennossa. Saatuja emulsioita säteilytettiin valinnaisesti UV valolla typpi-ilmakehässä tai käsiteltiin redox initiaattorilla, joka sisälsi kaliummetabisulfiittia (0,05 g, 0,22 mmol) vedessä (1 ml) ja kaliumperoksisulfaattia (0,0023 g, $3,3 \times 10^{-3}$ mmol) vedessä (1 ml). Menetelmä modifioitiin kuten esimerkissä 31 niin, että AIBN lisättiin ja seosta ravisteltiin sitten käsin, minkä jälkeen komonomeerin ensimmäinen annos lisättiin ja sonikoitiin samalla kun typpikaasua kuplitettiin seokseen. Sitten lisättiin lisäannos komonomeeriä ja saatua emulsiota UV säteilytettiin.

Spesifiset reaktio-olosuhteet, joita käytettiin kussakin esimerkissä, on esitetty taulukossa 1. Samanlaisia olosuhteita, käsittäen esim. viiden minuutin sonikoinnin käyttäen täyttä tehoa ja säteilyttämällä yksi tunti tai lisäämällä edellä kuvattua redox initiaattoria ja sekoittamalla varovasti 30 minuuttia, voidaan käyttää esimerkeissä 14 - 47 valmistettujen amfifiilien käsittelyssä.

Taulukko 1 - Reaktiokaavio

Esimerkki nro	Esimerkki, jossa amfifiili valmistettiin ja käytetty määrä (g/mmol)	Vesitilavuus (ml)	Hiilivety ja tilavuus (ml)	Komonomeeri ja määrä (g/mmol)	AIBN:n määrä (g/mmol)	Sonikointiaste ja kesto (min)	UV-säteilyttämisen kesto (tunteja)	Redoxjärjestelmä
	5			MM				
18	0,039/0,0845	50	PE-5	0,018/0,18 MM	-	fs-5	-	-
19	0,037/0,0805	50	IP-5	0,018/0,18 MM	-	hs-3	-	-
20	0,383/0,835	500	IP-50	0,18/1,8 MM	0,20/1,21	fs-6	1,5	-
21	0,042/0,0915	50	IP-5	0,09/0,9 MM	0,02/0,12	fs-3	1	-
22	0,040/0,0866	50	PE-2.5	0,018/0,18 MM	0,02/0,12	fs-3	1	-
23	0,053/0,0656	50	PE-5	0,018/0,18 MM	0,02/0,12	fs-4	-	-
24	0,530/0,656	500	PE-50	0,180/1,80 MM	0,200/1,20	fs-8	1	-
25	0,500/0,616	500	PE-50	0,180/1,80 MM	0,200/1,20	fs-8	2,5	-
26	0,200/0,2456	20	PE-2	0,018/0,18 MM	0,020/0,12	fs-3	1(Ex 26a)	✓(Ex 26b)
27	0,053/0,0656	50	PE-25	0,018/0,18 MM	0,020/0,12	fs-3	-	✓
28	0,054/0,0666	50	PE-1	0,018/0,18 MM	0,020/0,12	fs-3	-	-
29	0,054/0,0666	50	TO-5	0,018/0,18 ST	0,020/0,12	fs-3	-	-
30	0,056/0,069	50	PE-5	0,042/0,41	0,020/0,12	fs-3	1	-

Esimerkki nro	Esimerkki, jossa amfifiili valmistettiin ja käytetty määrä (g/mmol)	Vesitilavuus (ml)	Hiilivety ja tilavuus (ml)	Komonomeeri ja määrä (g/mmol)	AIBN:n määrä (g/mmol)	Sonikointiaste ja kesto (min)	UV-säteilyttämisen kesto (tunteja)	Redoxjärjestelmä
31	6 0,057/0,070	50	PE-5	ST 0,042/0,41 +0,099/0,95	0,020/0,12	fs-3	1	-
32	6 0,054/0,066	50	IP-5	-	0,020/0,12	fs-6	-	-
33	7 0,193/0,090	50	PE-5	MM 0,018/0,18	0,02/0,12	fs-3	-	-
34	8(b) 0,042/0,081	50	IP-5	MM 0,018/0,18	0,020/0,12	hs-3	1	-
35	8(b) 0,046/0,089	50	PE-5	ST 0,042/0,41	0,020/0,12	fs-3		
36	9 0,052/0,077	50	PE-5	-	-	fs-3	-	-
37	10(b) 0,036/0,08	50	PE-5	MM 0,018/0,18	0,02/0,12	fs-3	1	-
38	11 0,047/0,09	50	PE-5	-	0,02/0,12	fs-6	-	-
39	11 0,080/0,15	50	PE-5	-	0,02/0,12	fs-3	1	-
40	12 0,057/0,06	50	PE-5	-	0,02/0,12	fs-3	-	✓*
41	13(b) 0,046/0,11	50	PE-5	-	0,02/0,12	fs-3	-	-

KEY.PE = petrolieetteri (kp. 40 - 60 °C); IP = isopentaani; TO = tolueeni; MM = metyylimetakrylaatti; ST = styreeni; fs = täysi teho; hs = puoliteho

* kaliumperoksisulfaatin määrä oli vähennetty 0,002 g:ksi (0,003 mmol)

ii) Akustinen kuvaus

Esimerkkien 18 - 41 tuotteiden akustisia vaikutuksia tutkittiin mittaamalla niiden ultraäänitransmissiota ajan funktiona 90 sekunnin aikana. Kokeet toteutettiin emulgoituneen aineen, joka oli muodostunut välittömästi sonikoinnin jälkeen, näytteistä ja, mikäli tarkoituksenmukaista, aineesta UV säteilyttämisen tai redox-käynnistämisen jälkeen. Esimerkin 25 tapauksessa sätelyttämisen jälkeen poistettu näyte testattiin uudestaan vesilaimennuksen jälkeen (1 : 1). Esimerkin 31 tapauksessa näyte, joka poistettiin käsin ravistelun jälkeen, testattiin myös. 3,5 MHz:n laajakaistaista muutinta käytettiin pulssi-heijastusmenetelmässä. Kaikki lukemat olivat stabiileja 90 sekunnin mittauksen aikana niin, että yksittäinen arvo (dB/cm) on riittävä kuvaamaan kutakin 90 sekunnin mittausta. Tietyissä tapauksissa mittaukset toistettiin tiettyinä ajanjaksoina ultraäänivarjoaineiden stabiilisuuden lisätutkimiseksi. Tulokset on esitetty taulukossa 2, ajanjaksot (minuutteina sonikoinneista) ja akustinen kuvaus on annettu suluissa kullekin lukemalle.

Taulukko 2

Akustiset kuvaukset

Esimerkki nro	Akustinen vaikutus sonikoinnin jälkeen	Akustinen vaikutus UV-säteilyttämisen/Redox -käynnistyksen jälkeen
18	2,6 (0)	
19	3,7 (0)	
20	3,7 (0)	1,4 (90)
	1,7 (90)	
21	0,6 (0)	0 (60)
22	0,7 (0)	0,5 (60)
	0,9 (5)	0 (120)
23	5,9 (0)	
	4,3 (104)	
24	6,0 (0)	4,1 (60)
25	4,4 (0)	
	4,2 (30)	
	2,9 (150)	2,9 (150)
		1,4 (150) laimennettu
26	4,0 (0)	2,8 (20, redox)
	1,8 60)	0,4 (60, UV)
27	3,6 (0)	2,9 (10)
	3,2 (10)	2,3 (60)
	3,6 (60)	0,6 (720)
28	0,9 (0)	
29	0,6 (0)	
30	5,7 (0)	
	4,1 (60)	3,2 (60)
	3,2 (150)	2,6 (150)
31	2,5 (ravistelun jälkeen)	
	5,4 (0)	
	4,0 (60)	2,2 (60)
	3,3 (150)	1,7 (150)
32	4,9 (0)	
33	5,5 (0)	
	4,7 (20)	
	3,5 (60)	2,4 (60)
	3,1 (100)	
34	2,2 (0)	0 (60)
35	1,1 (0)	
36	2,1 (0)	
37	1,7 (0)	0 (60)
38	4,5 (0)	
39	5,6 (0)	
	4,7 (60)	4,9 (60)
	4,5 (120)	4,3 (120)
40	3,6 (0)	0 (60)
41	5,3 (0)	

iii) Mikroskooppianalyysi

Esimerkkien 18 - 41 tuotteiden valikoimaa tutkittiin käyttäen valomikroskooppia (Nikin UFX-II) mikrometriskaalalla. Tutkimukset toteutettiin yleisesti ottamalla näytteet emulgoidusta aineesta, joka oli muodostunut välittömästi sonikoinnin jälkeen, paitsi esimerkissä 31 (jossa näyte poistettiin käsin ravistelun jälkeen), esimerkissä 39 (jossa näyte poistettiin UV säteilyttämisen jälkeen) ja esimerkissä 40 (jossa näytteet poistettiin välittömästi sonikoinnin sekä redox käynnistämisen jälkeen) ja panemalla kukin näyte kahden lasilevyn väliin. Näiden tutkimusten tulokset on esitetty taulukossa 3; ajanjaksot (minuutteina sonikoinnista) mikroskooppianalyysiin on annettu kullekin näytteelle.

Taulukko 3

Mikroskooppianalyysi

Esimerkki nro	Aika sonikoinnin jälkeen (min)	Koko (diam., /um)	Huomautukset (muoto, kokojakauma
25	**10**	**4**	Palloja, kapea kokojakauma
26	**10**	**10-25**	Palloja
27	**10**	**4**	Palloja, kapea kokojakauma
28	**10**	**4-6**	Palloja, kapea kokojakauma
29	**10**	vaihteleva	Monia kokoja, leveä kokojakauma
30	**10**	**4-6**	Palloja, kapea kokojakauma
31	**10** (raviste-lun jälkeen)	**10-100**	Suuria kuplia, poiketen sonikoiduista näytteistä
33	**10**	**2-3**	Palloja
35	**10**	**10-15**	Palloja
36	**10**	**8-15**	Palloja, leveä kokojakauma
38	**10**	**5-10**	Palloja
39	**10**	**5-10**	Palloja, myös suuria kuplia
40	**30**	**5-10**	Palloja
40	**30** (redox-reaktion jälkeen)	vaihteleva	Epäsäännöllisen kokoisia palloja
41	**10**	**4**	Palloja, kapea kokojakauma

iv) Koko eksluusiokromatografia

Koko ekskluusiokromatografia (SEC) toteutettiin esimerkin 25 kylmäkuivatulla tuotteella käyttäen tetrahydrofuraania (Rathburn HPLC laatu) eluenttina ja taitekerroindetektoria (Knauer, Saksa). Pylväsjärjestelmä koostui 3 x 30 cm:n pylväistä, jotka sisälsivät 5 µm styrogeeniä, jonka huokoskoot olivat 10^5, 10^4 ja 500 Å (Polymer Laboratories Ltd, Englanti). Kalibrointi tehtiin polystyreeni standardien mukaan (Polymer Laboratories Ltd, Englanti). Amfifiilinen monomeerilähtöaine antoi 1 600 Daltonin molekyylipainohuipun ja polymeerituotteen molekyylipainohuippu oli 22 000 Daltonia, molemmat annettuina polystyreeni ekvivalentteina. Käyttäen muuttolukua 0,59, muutettaessa polystyreeni ekvivalenteista "oikeisiin" molekyylipainoihin (PEG arvo on saatu Dawkins et al:in julkaisusta J. Liq. Chromatog. 7, 1739, (1984), nämä vastaavat monomeerin 944 Daltonin molekyylipainoa ja polymeerin 13 000 Daltonin molekyylipainoa, vastaavasti.

Patenttivaatimukset

1. Varjoaine käytettäväksi diagnostisissa ultraäänitutkimuksissa, t u n n e t t u siitä, että se käsittää kaasulla täytettyjä mikropallosia, jotka sisältävät yksinkertaiseen tai yhden tai useamman kaksinkertaiseen eiproteiinipitoisiin ristisitoutuneisiin tai polymerisoituihin amfifiilisiin osiin kapseloituja mikrokuplia, sillä varauksella, että (i) mainitut ristisidotut tai polymeroidut amfifiiliset osat eivät muodosta polyoksietyleenipolyoksipropyleeni polymeeriä ja (ii) mainittu varjoaine ei sisällä polyaldehydimikropartikkeleita.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen varjoaine, t u n n e t t u siitä, että ristisidotut tai polymeroidut amfifiiliset osat sisältävät biologisesti hajoavia sidoksia, esim. amfifiilisissä osissa, edullisesti niiden hydrofiilisissä osissa, tai ristisidosryhmissä.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen varjoaine, t u n n e t t u siitä, että biologisesti hajoavat sidokset on valittu amidi-, imidi-, imiini-, esteri-, anhydridi-, asetaali-, karbamaatti-, karbonaatti-, karbonaattiesteri- ja disulfidiryhmistä.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen varjoaine, t u n n e t t u siitä, että se sisältää biologisesti hajoavia ristisidosryhmiä, esimerkiksi ryhmiä, jotka sisältävät

$$-(Y)_n.CO.O.C(R^1R^2).O.CO.(Z)_n-$$

(jossa Y ja Z, jotka voivat olla samoja tai erilaisia, ovat -O-, -S- tai $-NR^3-$; R^1 ja R^2, jotka voivat olla samoja tai erilaisia, ovat vetyatomeja tai hiileen sitoutuneita yksiarvoisia orgaanisia ryhmiä tai ne muodostavat yhdessä hiileen liittyneen kaksiarvoisen orgaanisen ryhmän; R^3 on vetyatomi tai orgaaninen ryhmä; ja symbolit n, jotka voivat olla samoja tai erilaisia, ovat 0 tai 1).

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen varjoaine, t u nn e t t u siitä, että se on saatu polymeroituvista amfifiilisistä osista, jotka sisältävät tyydyttymättömiä lipofiilisiä ketjuja, jotka ovat edullisesti oleyyli- tai linoleyyliryhmiä tai ne sisältävät diasetyleeniryhmiä tai akryloyyli- tai metakryloyyliryhmiä.

6. Jonkin edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen varjoaine, t u n n e t t u siitä, että amfifiilisten osien hydrofiiliset osat sisältävät yhden tai useampia ryhmiä valittuna ryhmästä kvaternaarinen ammonium, hydroksyyli, karboksi, karboksylaatti-ioni, amidi, fosfaatti, sulfaatti ja sulfonaatti, jolloin mainittu hydrofiilinen osa on edullisesti fosfolipidin triglyseryyliosa, jodattu röntgensädevarjoaine, hiilihydraatti tai koliini-, etanoliamiini-, seriini- tai glyserolijäännös.

7. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 5 mukainen varjoaine, t u n n e t t u siitä, että amfifiilisten osien hydrofiiliset osat sisältävät mahdollisesti eetteröityä polyoksietyleeniglykolijäännöstä, jolloin amfifiili on edullisesti tetraetyleeniglykoli mono-12-(metakryloyylioksi)dodekanoaatti, polyetyleeniglykoli (550) metyylieetteri-12-(metakryloyylioksi)dodekanoaatti, polyetyleeniglykoli (2000) metyylieetteri-12-(metakryloyylioksi)dodekanoaatti, tetraetyleeniglykoli mono-16-(metakryloyylioksi)heksadekanoaatti, polyetyleeniglykoli (350) metyylieetteri-16-(metakryloyylioksi)heksadekanoaatti tai tetraetyleeniglykoli-mono-12-(akryloyylioksi)dodekanoaatti.

8. Jonkin edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen varjoaine, t u n n e t t u siitä, että mikrokuplat sisältävät kaasua, joka on valittu ryhmästä ilma, typpi, happi, vety, typpioksiduuli, hiilidioksidi, helium, argon, rikkiheksafluoridi ja mahdollisesti fluoratut hiilivedyt, jotka ovat kaasumaisessa muodossa 37 °C:ssa.

9. Jonkin edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen varjoaine, t u n n e t t u siitä, että se edelleen sisältää epäorgaanista hiukkasmaista stabilisaattoria.

10. Jonkin edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen varjoaine, t u n n e t t u siitä, että mikrokuplien keskimääräinen koko on 0,1 - 10 µm, edullisesti 1 - 7 µm.

11. Jonkin edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen varjoaine, t u n n e t t u siitä, että sen puoliintumisaika in vivo on enintään 48 tuntia, edullisesti 1 - 12 tuntia.

12. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisen varjoaineen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että muodostetaan nestedispersio rakkuloista, jotka sisältävät kaasua tai kaasuprekursoria kapseloituna yksinkertaiseen tai yhteen tai useampaan kaksinkertaiseen eiproteiinipitoiseen amfifiiliseen materiaaliin, minkä jälkeen amfifiilinen materiaali ristisidotaan tai polymeroidaan.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että nestedispersio valmistetaan sonikoimalla, jotta muodostuu öljy-vedessä-emulsio, jossa haihtuva hiilivety on kapseloitu yksinkertaiseen tai yhteen tai useampaan kaksinkertaiseen amfifiiliseen materiaaliin, ja haihtuva hiilivety poistetaan osittain tai kokonaan rakkuloista amfifiilisen materiaalin ristisitomisen tai polymeroinnin jälkeen.

14. Patenttivaatimuksen 12 tai 13 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että varjoaine eristetään pakastuskuivaamalla.

15. Rakkuloiden nestedispersio, joka on käyttökelpoinen valmistettaessa ultraäänivarjoainetta, t u n n e t t u siitä, että rakkulat sisältävät yksinkertaiseen tai yhteen tai useampaan kaksinkertaiseen eiproteiinipitoiseen amfifiiliseen materiaaliin kapseloitua

rikkiheksafluoridia tai fluorattua hiilivetyä, joka on kaasumaisessa muodossa 37 °C:ssa.

16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen nestedispersio, t u n n e t t u siitä, että amfifiilisten osien hydrofiiliset osat sisältävät yhden tai useampia ryhmiä valittuna seuraavista: kvaternäärinen ammonium, hydroksyyli, karboksi, karboksylaatti-ioni, amidi, fosfaatti, sulfaatti tai sulfonaatti, jolloin mainittu hydrofiilinen osa on edullisesti fosfolipidin triglyseroliosa, jodattu röntgensädevarjoaine, hiilihydraatti tai koliini-, etanoliamiini-, seriini- tai glyserolijäännös.

17. Patenttivaatimuksen 15 tai 16 mukainen nestedispersio, t u n n e t t u siitä, että amfifiilisten osien hydrofiiliset osat sisältävät mahdollisesti eetteröidyn polyoksietyleeniglykolijäännöksen.

18. Patenttivaatimuksen 15 mukainen nestedispersio, t u n n e t t u siitä, että amfifiilinen materiaali sisältää fosfolipidiä.

19. Jonkin patenttivaatimuksista 15 - 18 mukainen nestedispersio, t u n n e t t u siitä, että rakkuloiden keskimääräinen koko on 0,1 - 10 µm, edullisesti 1 - 7 µm.

20. Menetelmä ultraäänivarjoaineen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että nestedispersio rakkuloista, jotka sisältävät yksinkertaiseen tai yhteen tai useampaan kaksinkertaiseen ei-proteiinipitoiseen amfifiiliseen materiaaliin kapseloitua rikkiheksafluoridia tai fluorattua hiilivetyä, joka on kaasumaisessa muodossa 37 °C:ssa, valmistetaan ravistelemalla tai sonikoimalla ei-proteiinipitoista amfifiilista materiaalia mainitun rikkiheksafluoridin tai fluoratun hiilivedyn läsnäollessa.

21. Öljy-vedessä -emulsio, joka on käyttökelpoinen valmistettaessa ultraäänivarjoainetta, t u n n e t t u siitä, että emulsion öljyfaasi sisältää yksinkertaiseen tai yhteen tai useampaan kaksinkertaiseen ei-proteiinipitoiseen amfifiiliseen materiaaliin kapseloitua haihtuvaa hiilivetyä, esim. fosfolipidiä.



Missing part

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS **TUTKIMUSRAPORTTI**
Patentti- ja innovaatiolinja

PATENTTIHAKEMUS NRO	LUOKITUS
934226	A61K 49/00

TUTKITTU AINEISTO
Patenttijulkaisukokoelma (FI, SE, NO, DK, DE, CH, EP, WO, GB, US), tutkitut luokat
Tiedonhaut ja muu aineisto

VIITEJULKAISUT		
Kategoria*)	**Julkaisun tunnistetiedot**	**Koskee vaatimuksia**
	EP 327490 A WO 92/04392 A EP 441468	

*) X Patentoitavuuden kannalta merkittävä julkaisu yksinään tarkasteltuna
Y Patentoitavuuden kannalta merkittävä julkaisu, kun otetaan huomioon tämä ja yksi tai useampi samaan kategoriaan kuuluva julkaisu
A Yleistä tekniikan tasoa edustava julkaisu, ei kuitenkaan patentoitavuuden este

Päiväys	Tutkija
12.10.-04	EY