(12) **PATENT**

(19) NO (11) **324068** (13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.
A61K 49/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19933431	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1992.03.28 PCT/EP92/00715
(22)	Inng.dag	1993.09.27	(85)	Videreføringsdag	1993.09.27
(24)	Løpedag	1992.03.28	(30)	Prioritet	1991.03.28, GB, 9106673
(41)	Alm.tilgj	1993.09.27			
(45)	Meddelt	2007.08.06			

(73) Innehaver GE Healthcare, Postboks 4220 Nydalen, 0401 OSLO
(72) Oppfinner Hanno Priebe, Johan Castbergsvei 56, 0673 Oslo
Jo Klaveness, Midtåsen 5, 1166 OSLO
Lars Stubberud, Södertälje, SE
Pål Rongved, c/o IPR Consulting, Hovdensvei 11, 1450 Nesoddtangen
(74) Fullmektig GE Healthcare AS v/Marianne W Wulff, Postboks 4220 Nydalen, 0401 OSLO

(54) Benevnelse **Kontrastmidler for bruk i diagnostisk ultralydundersøkelser og væskedispersjon av vesikler og deres framstilling, samt olje-i-vann emulsjon for bruk i framstillingen**

(56) Anførte publikasjoner Ingen

(57) Sammendrag

Ultralydkontrastmidler bestående av mikrobobler av gass eller gassforløper innkapslet av kryssbundne eller polymeriserte amfifile grupper som ikke er proteiner, f.eks. i form av miceller, viser god stabilitet in vivo ved administrasjon og kan om ønsket også inneholde biodegraderbare bindinger for å få et ønsket nivå av biodegraderbarhet.

Kontrastmidler for bruk i diagnostisk ultralydundersøkelser og væskedispersjon av vesikler og deres framstilling, samt olje-i-vann emulsjon for bruk i framstillingen

Denne oppfinnelsen angår kontrastmidler for bruk i diagnostiske ultralydundersøkelser og væskedispersjon av vesikler og deres framstilling, samt olje-i-vann emulsjon for bruk i framstillingen.

Det er godt kjent at ultralydavbilding er et potensielt verdifullt diagnostisk verktøy, for eksempel i studier av vaskulærsystemet, spesielt kardiografi og hårrørsnettet i vevene. Et variert utvalg av kontrastmidler er blitt foreslått for å forbedre de akustiske bildene oppnådd på denne måten, inkludert suspensjoner av partikler i fast form, emulgerte væskedråper, gassbobler og innkapslede gasser eller væsker. Det er generelt akseptert at kontrastmidler som har lav tetthet og er lett komprimerbare, er spesielt effektive i egenskap av det gode akustiske ekkoet de gir, og betydelig interesse er derfor blitt viet fremstillingen av gass-inneholdende og gass-genererende systemer.

Innledende studier av frie gassbobler generert in vivo av injeksjoner i hjertet av fysiologisk aksepterbare substanser har demonstrert den potensielle effektiviteten til slike bobler som kontrastmidler i ekkokardiografi; slike teknikker er kraftig begrenset i praksis derimot, på grunn av den korte levetiden til de frie boblene. Det er derfor av stor interesse å stabilisere gassbobler for ekkokardiografi og andre ultralydundersøkelser, for eksempel ved å bruke emulgatorer, oljer, fortykningsmidler eller sukkerarter.

WO80/02365 foreslår bruken av gelatininnkapslede mikrogassbobler for å forbedre ultralydbilder. Slike mikrobobler viser imidlertid ikke god nok stabilitet ved de dimensjoner foretrukket for bruk i ekkokardiografi (1-10μm) i betraktning av den ekstreme tynnheten til kapselmaterialet.

US-A-4774958 foreslår bruken av mikrobobledispersjoner stabilisert ved innkapsling i denaturert protein, for eksempel humant serumalbumin. Slike systemer tillater produksjon av mikroboblesystemer med en størrelse på for

eksempel 2-5μm, men tillater fremdeles ikke tilstrekkelig visualisering av den venstre hjernehalvdel og hjertemuskulatur.

EP-A-03207490 foreslår blant annet ultralydkontrastmidler med en mikropartikulær, syntetisk biodegraderbar polymer (f.eks. en polyester av en hydroksykarbonsyre, et polyalkylcyanoakrylat, en polyaminosyre, et polyamid, et polyakrylert sakkarid eller en polyortoester) inneholdende en gass eller lettfordampelig væske (dvs med et kokepunkt under 60°C) i fri eller bunden form. Emulgatorer kan brukes som stabilisatorer til tilberedelsen av slike midler, men slike emulgatorer er ikke kjemisk assosiert med polymeren.

Vi har nå funnet at spesielt effektive ultralydkontrastmidler kan oppnås ved å innkapsle gassbobler eller gassgenererende systemer, med polymerer inneholdende kjemisk bundne, overflateaktive, dvs amfifile grupper. Da vil de overflateaktive delene av de amfifile gruppene stabilisere mikroboblesystemet ved å redusere overflatespenningen ved gass-væske grenseflatene, f.eks. ved å danne enkle lag eller ett eller flere dobbeltlag (også kjent som miceller, vesikler, liposomer og niosomer) ved de nevnte grenseflater, mens sammenkoblingen av grupper gjennom polymersystemet bidrar ytterligere til økt stabilitet. Fleksibilitet i de innkapslende systemene forbedrer også kontrastmidlenes bidrag til billedtettheten. For enkelhets skyld er begrepet "vesikkel" brukt her for å betegne alle slike mikroboblestrukturer før eller etter kryssbinding eller polymerisering. Under visse forhold kan det imidlertid dannes irregulært formede strukturer, f.eks. mikrotubuler som kan feste seg til, eller til og med fange opp sfæriske strukturer.

I følge et aspekt ved den foreliggende oppfinnelsen, tilveiebringes det derfor kontrastmidler for bruk i diagnostiske ultralydundersøkelser som omfatter gassfylte mikroballonger. Dette aspektet og ytterligere aspekter ved oppfinnelsen framgår av kravene.

Begrepet "kryssbundne" er brukt her for å antyde at de amfifile delene er festet til hverandre slik at de danner polymere strukturer som kan inneholde en eller flere polymersystemer inkludert kopolymerer.

En stor fordel ved kontrastmidler ifølge oppfinnelsen er at de kan formes til et bestemt ønsket nivå av biodegrabilitet in vivo ved å velge riktige biodegraderbare forbindelser ved riktige posisjoner. Man ser gjerne at for å være effektive, må kontrastmidlene være stabile gjennom hele ultralydundersøkelsen, men metaboliseres, eller utskilles kort deretter. Kontrastmidler ifølge oppfinnelsen bør derfor fortrinnsvis ha en halveringstid in vivo på ikke mer enn 48 timer, for eksempel 1-12 timer.

Biodegraderbare bindinger som kan være tilstede i kontrastmidler ifølge oppfinnelsen er blant andre amid-, imid-, imin-, ester-, anhydrid-, acetal-, karbamat-, karbonat-, karbonatester- og disulfidgrupper. Minst en slik gruppe bør fortrinnsvis være tilstede i den amfifile delen, dvs. i den hydrofile og/eller lipofile delen. Det kan være fordelaktig å plassere gruppen i den hydrofile delen for å lette ensymatisk påvirkning in vivo. Det er videre foretrukket at biodegraderbare forbindelser er tilstede i polymerkjedene for at nedbrytningen av polymeren i kroppen skal bli betydelig.

Enhver biokompatibel gass kan brukes i kontrastmidlene ifølge oppfinnelsen, for eksempel luft, nitrogen, oksygen, hydrogen, dinitrogenoksid, karbondioksid, helium, argon, svovelheksafluorid, og eventuelt fluorinerte hydrokarboner med lav molkylvekt slik som metan, acetylen eller karbontetrafluorid. Gassen kan være fri inne i mikroboblen, fortrinnsvis i form av en gassfyllt "mikroballong" siden egenskapene for ekkodannelse hos slike produkter kan forsterkes i egenskap av deres relativt fleksible natur. Gassen kan alternativt fanges opp av, eller blandes inn i en bærende substans. Begrepet "gass" brukes her om ethvert stoff som kan være i gassform ved 37°C.

Gassforløpere inkluderer karbonater og bikarbonater, f.eks. natrium eller ammoniumbikarbonat og aminomalonatestere. Begrepet "gassforløper" slik det brukes her, omfatter også slike stoffer som lettfordampelige hydrokarboner som kan være innkapslet i begynnelsen, men som deretter fjernes helt eller delvis fra vesiklene, f.eks. fordamping eller frysetørring, for deretter å bli erstattet med gass.

For bruk i ekkokardiografi, kan det være fordelaktig å bruke mikrobobler med en gjennomsnittsstørrelse på 0,1 - 10 μm, f.eks. 1 - 7 μm for å tillate fri passasje gjennom lungesystemet, og for å oppnå resonanse med den foretrukne avbildningsfrekvensen av omtrent 0,1 - 15 MHz, . Vesentlig større bobler, f.eks. med gjennomsnittsstørrelse på opp til 500 μm, kan allikevel være nyttige til andre formål, for eksempel billeddiganostikk av mage- ogh tarmsystemet, eller undersøkelser av livmoren og eggledererne.

Om ønskelig, kan mikroboblene inkludere stabilisatorer i partikkelform, for eksempel unorganiske materialer som silika eller jernoksid som bare delvis fuktes av det anvendte løsningsmiddelet, f.eks. med en partikkelstørrelse på 1-500 nm. Kolloidal silika med en partikkelstørrelse på 5-50 nm kan med fordel brukes til dette formålet.

Polymersystemer som kan brukes i kontrastmidlene ifølge oppfinnelsen inkluderer karbohydrater slik som dekstraner og stivelser, kitin, kitosan, karboksymetylkitosan, alginat, hyaluronsyre, polyakrylamider, polycyanoakrylater, hydroksyalkylpolycyanoakrylater, polyhydroksysyrer slik som polylaktosesyrer, polyhydroksybutyrater, polyglykolsyrer, polylaktid-glykolider, polyortoestere, polyanhydrider, polyuretaner, polyesterimider, polyimider, polyacetaler, poly-epsilon-kaprolaktoner, polydioksanoner, polyaminotriasoler, poly(amidenaminer), poly(amiduretaner), polyfosfazener, polyvinylalkoholer, organo-polysiloksaner, poly(enolketoner) og kopolymerer av disse materialene, modifisert om nødvendig for å introdusere hydrofile eller lipofile grupper.

Mikroboblene ifølge oppfinnelsen kan fremstilles ved å lage en væskedispersjon av vesikler som består av en gass, eller gassforløper innkapslet av amfifilt materiale fulgt av kryssbinding, eller polymerisering av det amfifile materialet.

Vesiklene vil normalt ha et hovedsaklig sfærisk monolag eller multilag av det amfifile materialet. De hydrofile delene av amfifilene vil være fysisk forbundet slik

at de danner et sammenhengende lag, mens de lipofile delene også danner et lag som kan være innenfor eller utenfor det hydrofile laget. I de doble lagene kan to lag av det amfifile materialet legges over hverandre. Slik kan for eksempel et første lag av amfifilt materiale dannes hvor de lipofile gruppene er på utsiden. Et andre lag amfifilt materiale kan så legges over det første laget med de lipofile gruppene ved siden av de lipofile gruppene fra det første laget, og de hydrofile gruppene på utsiden. På samme måte kan et dobbelt lag ha de lipofile gruppene på utsiden og innsiden, og de hydrofile gruppene klemt imellom.

Der hvor væsken som vesiklene er fordelt i er polar, for eksempel vandig, vil de hydrofile gruppene på vesiklene ha en tendens til å være på utsiden av micellene, og de lipofile på innsiden slik at de danner et monolag. Når væsken er upolar, vil de lipofile gruppene være på utsiden, spesiselt hvis det innkapslede materialet er hydrofilt, f.eks. en gassforløper eller et fast stoff inneholdende absorbert eller oppfanget gass, om ønsket sammen med en polar væske. Doble lag kan dannes når det innkapslede materialet er av den samme typen, dvs. hydrofilt, eller lipofilt, som den disperserende væsken.

Amfifilene som anvendes ifølge foreliggende oppfinnelse vil bære funksjonelle grupper som tillater krysskobling eller polymerisering. Disse kan i noen tilfeller være grupper som overfører hydrofile, eller lipofile egenskaper, eller de kan være uavhengige av de amfifile grupperingene.

Amfifilene kan inndeles i tre kategorier:

1. Amfifilene kan bære minst to enkle reaktive grupper slik som hydroksyl, amino eller karboksyl grupper som kam reagere med polyvalente reaktive monomerer eller tidligere dannede polymerer. Når for eksempel amfifilen bærer to hydroksylgrupper (i den hydrofile delen), kan en dikarboksylsyre slik som suberinsyre reageres med vesiklene etter innkapsling av gassen eller gassforløperen for å danne en krysskoblet eller polymerisert struktur. Diaminoamfifiler kan på samme måte reageres med dikarboksylsyrer mens dikarboksylamififiler kan reageres

med diaminer eller dioler. Videre kryssbinding kan fås ved trifunksjonelle reagenser. En katalysator vil normalt være tilstede ved reaksjonen.

Det kryssbundne midlet kan selv være amfifilt, slik at vesiklen vil dannes med den lipofile og den hydrofile gruppen i den første amfifilen og det amfifile krysskoblende midlet i linje, hvorpå krysskobling mellom de reaktive funksjonelle gruppene kan settes i gang.

Som angitt ovenfor, er det spesielt fordelaktig om den polymeriserte eller krysskoblede amfifilen er biodegraderbar, spesielt til relativt enkle vannløselige deler. Når det gjelder de ester og amidbindingene som det er referert til ovenfor, vil esterase- og amidaseenzymer være tilstede i det vaskulære systemet, og kan degradere det innkapslende materialet til separate amfifile molekyler, og diamin-, diol- eller disyrereagenser som under fysiologiske forhold ikke vil reagere med hverandre igjen.

Om ønsket kan enda flere biodegraderbare kryssbindende grupper, som for eksempel karbonatestergrupper introduseres f.eks. ved å bruke ortoester kryssbindende midler. Andre nyttige klasser av kryssbindende midler har formel (I)

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

hvor Y og Z, som kan være like eller forskjellige, er $-O-$, $-S-$ eller $-NR^3-$,
R^1 og R^2, som kan være like eller forskjellige er hydrogenatomer, karbonbundne monovalente organiske grupper eller sammen representerer en karbonbundet divalent organisk gruppe,
R^3 er et hydrogenatom eller en organisk gruppe,
symbolene n, som kan være like eller forskjellige er 0 eller 1,
R^8 og R^9, som kan være like eller forskjellige, er divalente organiske grupper, for eksempel alkylen eller alkyliden grupper med 1-12 karbonatomer og A^1 og A^2 er funksjonelle grupper, for eksempel reaktive med hydroksyl-, amino- eller kaboksylgrupper ,

De krysskoblende gruppene introdusert på denne måten inneholder enheter med formel

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

hvor Y, Z, hver n, R^1 og R^2 er som definert ovenfor som brytes spesielt enkelt ned av vanlige esteraser, samtidig som de viser stabilitet når det ikke er enzymer tilstede.

R^1, R^2 og R^3 kan hver være en hydrokarbyl- eller heterosyklisk gruppe, for eksempel med 1-20 karbonatomer, f.eks. en alkyl-, eller alkenylgruppe (fortrinnsvis med opptil 10 karbonatomer), en sykloalkylgruppe (fortrinnsvis med opp til 10 karbonatomer), en aralkylgruppe (fortrinnnsvis med opptil 20 karbonatomer), en alkylgruppe (fortrinnsvis med opptil 20 karbonatomer) eller en heterosyklisk gruppe med opptil 20 karbonatomer og en eller flere heteroatomer valgt fra O, S og N. En slik hydrokarbyl eller heterosyklisk gruppering kan inneholde en eller flere funksjonelle grupper slik som halogenatomer eller grupper med formel $-NR^4R^5$, $-CONR^4R^5$, $-OR^6$, $-SR^6$ og $-COOR^7$, der R^4 og R^5, som kan være like eller forskjellige, er hydrogenatomer, alkylgrupper eller hydrokarbylgrupper som definert for R^1 og R^2, R^6 er et hydrogenatom eller en alkylgruppe eller en gruppe som definert for R^1 eller R^2, og R^7 er et hydrogenatom eller en gruppe som definert for R^1 eller R^2; der R^1 og R^2 representerer en divalent gruppe, kan dette for eksempel være en alkylen- eller alkenylengruppe (fortrinnsvis med opptil 10 karbonatomer) som kan inneholde en eller flere funsjonelle grupper som definert ovenfor. Generelt er R^1 og R^2 helst hydrogen eller små grupper, slik som C_{1-4} alkylgrupper.

2. Amfifilen kan inneholde polymeriserbare grupperinger som kan polymerisere etter vesikkeldannelse. Slike polymeriserbare grupperinger kan for eksempel inkludere umettede lipofile kjeder, f.eks. alkenyl- eller alkynylgrupper med opptil 50 karbonatomer, for eksempel 10-30 karbonatomer, slik som oleyl- eller linoleylgrupper, eller grupper som inneholder diacetylen, akryloyl eller metakryloyl grupper. Polymerisering av slike grupperinger vil generelt gi hydrokarbonpolymerer der hovedbindingene ikke brytes lett ned, selv om slike polymerer kan lages slik at

restene etter de biograderte forbindelsene er vannløselige, f.eks. på grunn av at de har hydrofile substituenter slik som karboksyl eller hydroksylgrupper for å forsterke deres disperseringsevne. Kjedelengden til slike polymerer er generelt foretrukket slik at deres molekylvekt ikke overstiger 40 000.

Der hvor en større grad av biodegrabilitet trengs, kan det være best å unngå dannelse av polymere hydrokarbonkjeder som ikke kan degraderes enkelt, og å fremme polymerisering eller kryssbinding bare gjennom biodegraderbare grupper slik som ester, karbonat, karbamat, amid eller imidbindinger av den typen som det er referert til ovenfor. Generelt vil de funksjonelle gruppene som danner slike forbindelser være hydrofile og slik føre til kryssbinding mellom de hydrofile delene til amfifilene.

Allikevel kan polymerisering av lipofile hydrokarbonkjeder brukes til å gi en biodegraderbar polymer dersom amfifilen inneholder en biodegraderbar hydrofil del som bærer to slike kjeder. Der hvor de lipofile kjedene til nærliggende amfifile molekyler kryssbindes, F.eks. via umettede karbon-karbonbindinger, vil de resulterende lipofile kjedene dannet på denne måten adskilles av de biodegraderbare hydrofile gruppene. Når de biodegraderes, vil den polymere strukturen brekkes opp i relativt små lipofile grupper som bærer restene av de degraderte hydrofile delene.

3. En løselig amfifil polymer som inneholder egnede funksjonelle grupper kan polymeriseres videre, eller kryssbindes etter vesikkeldannelse. Slike substanser inkluderer polyaminosyrer og karbohydrater som bærer lipofile grupper, i tillegg til polyestere med lav molekylvekt og polyamider etc. som bærer passende grupper som gir amfifile egenskaper. Slik kan for eksempel hydrofile polymerer, som de som er listet ovenfor, utstyres med lipofile kjeder, f.eks. C_{10-30} alkyl, alkenyl, eller alkynyl grupper, for å gi passende amfifiler for bruk ifølge oppfinnelsen. Kjemiske metoder for binding av slike lipofile kjeder inkluderer delvis forestring av hydroksylgruppene på polyhydroksysyrer, saltdannelse av anioniske surfaktanter på aminogruppene til kitosan eller kovalent derivatisering av slike grupper, og binding av hydrofobiske grupper til karbohydrater eller syklodekstriner med esterbindinger.

Den løselige polymeren som polymeriseres videre kan også være en amfifil polymerisert eller kryssbundet i overenstemmelse med (1) eller (2) ovenfor.

Amfifiler som er polymeriserbare eller som kan kryssbindes og brukes ifølge oppfinnelsen omfatter forbindelser med den generelle formelen (II).

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

der X er en anionisk, kationisk eller ikkeionisk hydrofil del.

R^{10} er en lipofil gruppe,

B er en gruppe med mulighet for polymerisering eller kryssbinding,

p og q er hele tall og

r er 0 eller et helt tall når hverken X eller R^{10} kan polymerisere eller kryssbindes.

Gruppene X og R^{10} kan kobles på forskjellige måter. For eksempel kan en hydrofil gruppe X bære en eller flere lipofile grupper R^{10}, eller en lipofil gruppe R^{10} kan bære en eller flere hydrofile X-grupper. En eller flere hydrofile grupper X kan også binde sammen forskjellige lipofile grupper R^{10} så lenge amfifilen har en konfigurajon hvor de hydrofile og lipofile delene fra de tilstøtende molekylene ligger på linje.

På samme måte kan gruppen(e) B der de finnes være bundet til en eller flere av gruppene X og R^{10}.

For å tilveiebringe, eller forbedre biodegraderbarheten, kan en eller flere biodegraderbare grupper W binde sammen gruppene X, R^{10} og B.

X gruppene kan for eksempel være en kvarternær ammoniumgruppe $-N(R^{11})_3V$ der R^{11} gruppene, som kan være like eller forskjellige, kan være for eksempel alkyl, aralkyl eller arylgrupper inneholdende, for eksempel opptil 20 karbonatomer, og V er et anion. Det foretrekkes at en eller flere av R^{11} gruppene er

en lipofil R^{10} gruppe.

Andre nyttige hydrofile grupper X inkluderer hydroksyl, karboksylat, amid, fosfat, sulfat eller sulfonatgrupper. Videre eksempler på hydrofile X grupper inkluderer:

- $O.CH_2.CH_2.N^+(CH_3)_3$ (kolin)
- $O.CH_2.CH_2.N^+H_3$ (etanolamin)
- $O.CH(NH_3^+).COO^-$ (serin)
- $O.CH_2.CH(OH).CH_2OH$ (glyserol)
- heksoser og pentoser slik som inositol.

R^{10} gruppen kan for eksempel være en mettet eller umettet, rett eller forgrenet hydrokarbonkjede, som kan inneholde for eksempel 6 - 50 karbonatomer og være avbrutt av en eller flere biodegraderbare W grupper og kan bære en eller flere funksjonelle grupper hvor R^{10} kjeder på tilstøtende amfifiler kan kryssbindes for å danne en biodegraderbar gruppe. Nyttige R^{10} grupper inkluderer oleyl og linoleyl grupper og kjeder som inneholder diacetylen grupperinger.

B gruppen(e) kan for eksempel være ortoestergrupper som danner karbonatesterbindinger med hydroksylgrupper, eller hydroksysyregrupper (eller separate hydroksyl og karboksylgrupper) som danner esterbindinger.

Man ser gjerne at den hydrofile X gruppen inneholder en rest som i seg selv ikke er direkte ansvarlig for hydrofile egenskaper, slik som tilfellet er for en R^{11} gruppe av en kvarternær ammoniumgruppe som definert ovenfor, som for eksempel kan være en lavere alkylgruppe som er for liten til å bidra til lipofile egenskaper. Slike grupper kan også danne en del av forbindelsen mellom X og R^{10} gruppene. Sagt på en annen måte: Det kan være overgangsområder mellom X og R^{10} grupper som hverken er strengt lipofile eller hydrofile i seg selv, men som kan betraktes som del av enten X, eller R^{10}.

Derfor kan amfifilene med formel (II) i et spesielt tilfelle, ha gruppene X, R^{10} og B festet til en tidligere dannet polymer som kan oppfattes som en del av X eller R^{10} ifølge dens kjemiske og fysiske egenskaper. En slik polymer kan være en kjent hydrofil polymer hvortil to lipofile grupper som diskutert ovenfor er blitt bundet, eller en lipofil polymer, f.eks. en polyolefin, som bærer hydrofile grupper. Som et alternativ kan polymeren oppnås ved delvis polymerisering av en amfifil mrd formel (II). I alle slike tilfeller bør den tidligere dannede polymeren være løselig nok til å tillate vesikkeldannelse og bør være funksjonalisert slik at den tillater kovalent, ionisk eller semipolar kryssbinding for å stabilisere vesiklene.

Spesielt nyttige monomere amfifiler inkluderer cyanoakrylatestere som bærer lipofile forestrende grupper som også kan ha hydrofile deler. I US 4329332 beskrives for eksempel den micellære polymerisering av lavere alkylcyanoakrylater, en teknikk som kan videreføres til polymerisering av akrylater med formel $CH_2=C(CN).CO.O.(C_{6\text{-}20}$ alifatisk). På samme måte er et diakrylat med formel

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

blitt brukt av Ping et al (Int. J. Pharm, 61 (1990) 74-89). Tilsvarende cyanoakrylater kan også brukes.

Amfifile materialer som brukes ifølge oppfinnelsen inkluderer følgende klasser av substanser derivatisert med lipofile grupper:-

- lecitin derivater,
- polyglyserol,
- polyoksyetylen glykol og etere derav,
- polyoksyetylen derivater av steroider,
- glykosider,
- galaktosider,
- hydroksysyrer eller polyhydroksysyrer (inkludert karboksyliske, fosfoniske, sulfoniske og sulfiniske syrer),
- karbohydrater og derivater derav,

amionalkoholer og derivater derav,
cyanoakrylater,
akrylamider og
hydroksyamider.

Polymeriserbare amfifiler

Flere klasser nyttige polymeriserbare amififiler er listet under:

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

der B_1 og B_2 kan være

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

(der n er et helt tall f.eks. 9, 12 eller 13) som beskrevet i WO 85/04326. Slike forbindelser kan lages ved vanlig fosfolipidkjemi som beskrevet i Hirth et al (Helv.Chem.Acta 40, 1957, 1928) og Pfeiffer et al (J.Org.Chem. 35, 1970, 221).

Slike forbindelser kan fremstilles ved prosedyrer som er beskrevet i EP-A-0032622. Den zwitterioniske gruppen kan introduseres ved å utsette den riktige fosfoniske- eller fosfiniske syren eller et foresterbart derivat derav for reaksjon med glyserol eller et foresterbart derivat derav. Gruppene B_1 og B_2 kan innføres i molekylet ved forestring med karboksylsyren til B_1 og B_2 eller et esterdannende derivat derav. Disse reaksjonene kan utføres mellom glyserolet og derivatene derav på den ene siden, og karboksylsyren og fosforesteren på den andre, enten samtidig eller trinnvis. Andre kjente metoder for syntesen kan like gjerne brukes.

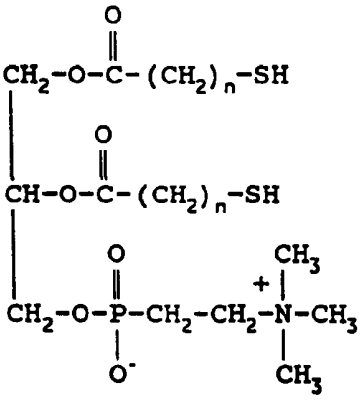
Polymerisering av disse forbindelsene kan for eksempel utføres ved bestråling ved 254 nm med en xenonlampe etter dannelse av gassinneholdende liposomer eller dannelse av enkle lag av amfifilene ved gass/væske-overgangen.

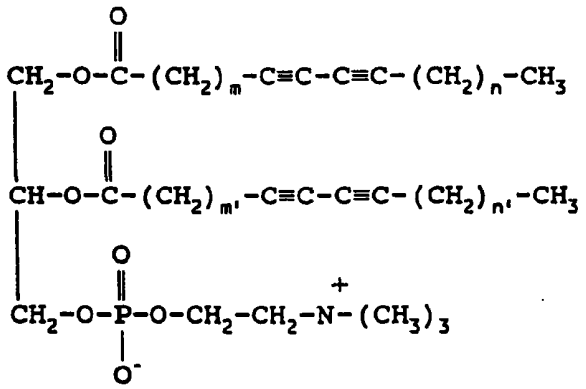
2. Fosfolipider slik som fosfodiglyserider og sfingolipider som inneholder polymeriserbare grupper.

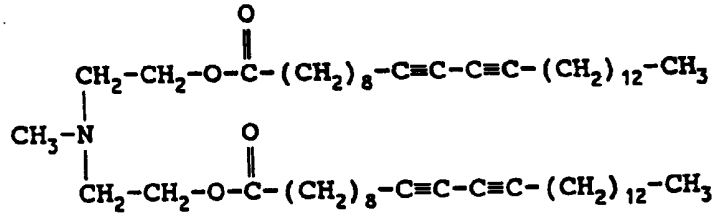
3. Umettede oljer med hydrofile grupper slik som maisolje, solsikkeolje, soyaolje, saflorolje, peanøttolje, bomullsfrøolje og olivenolje.

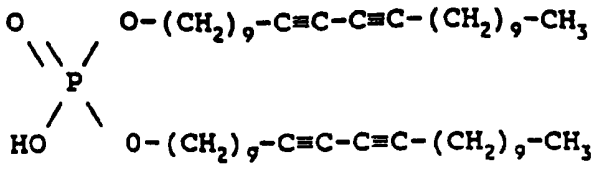
4. Mettede og umettede fettsyrederivater med hydroksylgrupper, for eksempel lakserolje og meldrøyeolje som er triglyserider av d-12-hydroksyoleinsyre.

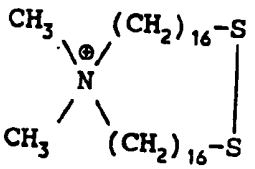
5. Forbindelser som beskrevet i "Polymeriserte liposomer" (Technical Insights Inc 1988) og Hub et al (J. Macromol.Sci.Chem. A15, (5),1981,701-715). Disse kan ha strukturene:

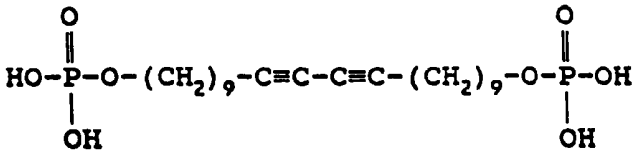


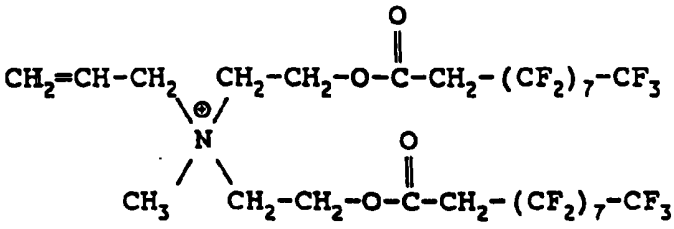


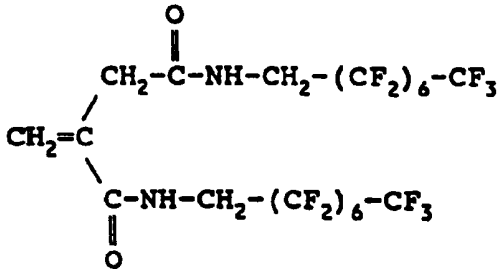


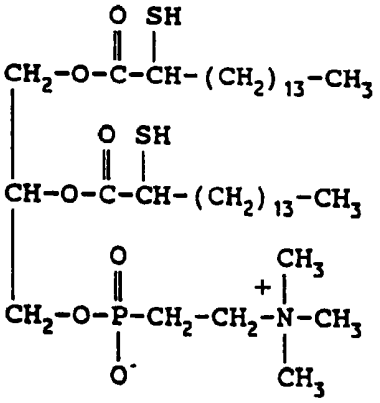


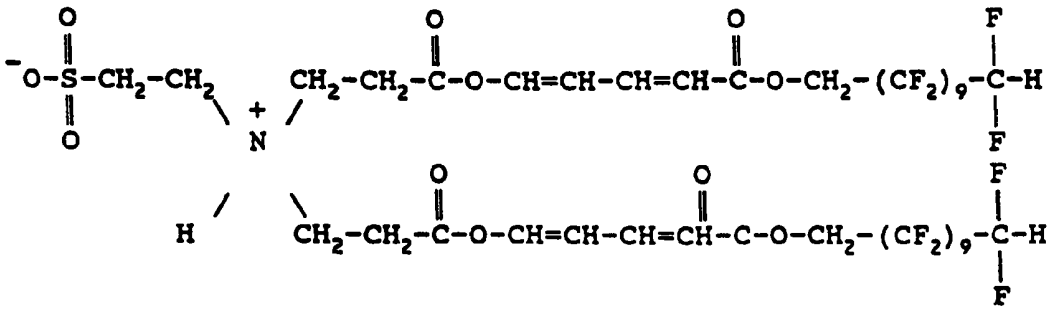












6. Forbindelser med formel:

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

der L og M kan være $-O-$, $-S-$ eller $-NR^{12}-$ (der R^{12} er H eller en alkylgruppe), for eksempel forbindelsene der

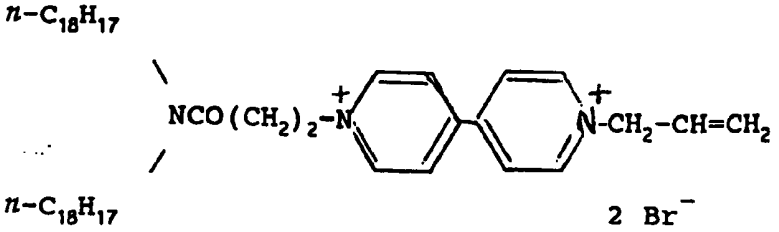
$L = M = -O-$; $L = -O-$, $M = -N(CH_3)-$; $L = -NH-$, $M = -O-$;

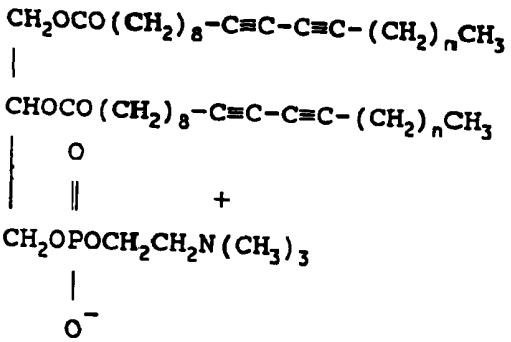
$L = -O-$, $M = -N^+(CH_3)_2-$ Br^- og
$L = -O-$, $M = -N(CH_2.CH_2.SO_3H)-$

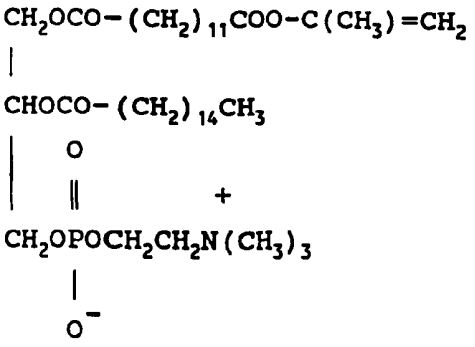
Slike forbindelser kan fremstilles ved å la et reaktivt derivat av heksakosan-10,12-diynsyre (f.eks. syrekloridet) reagere med en passende forbindelse $(HLCH_2CH_2)_2M$ i tørr kloroform ved 0°C mens pyridin er tilstede, om nødvendig fulgt av kvarternisering.

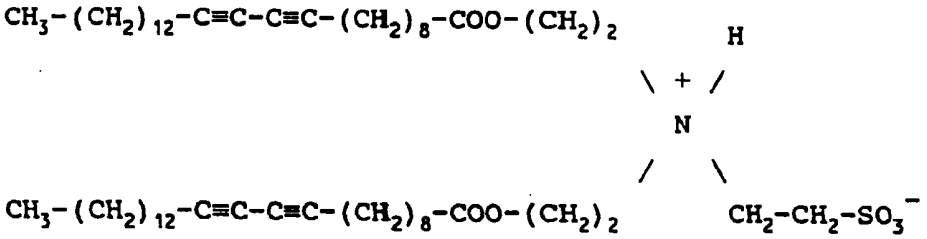
Syntese av heksakosan-10,12-diynsyre er beskrevet av Singh et al (Polym.Prep. : Am.Chem.Soc. Div.Polym.Chem; 26 (2), 1985, 184-5). Syrekloridet kan lages ved reaksjon med oksalylklorid.

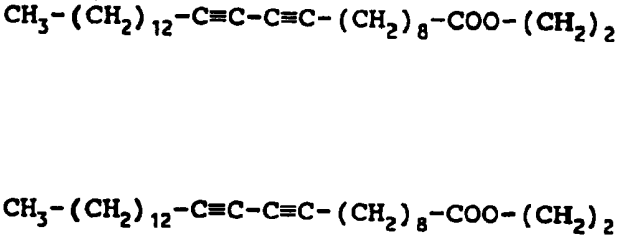
7. Forbindelser som beskrevet av Paleos (Chem.Soc.Rev. 14, 1985, 45-67), for eksempel de følgende strukturer:

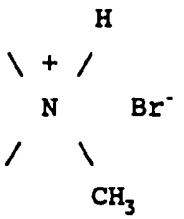


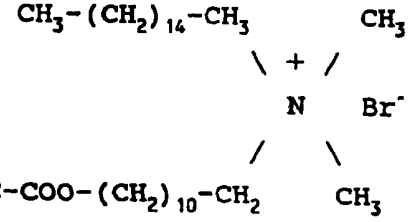


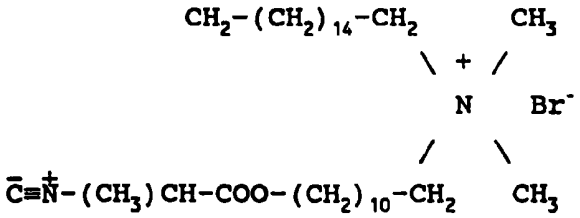


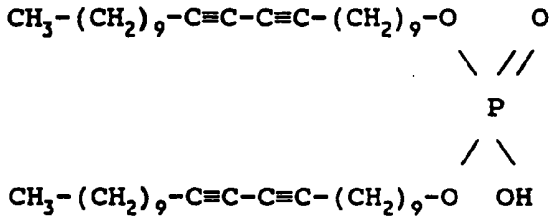


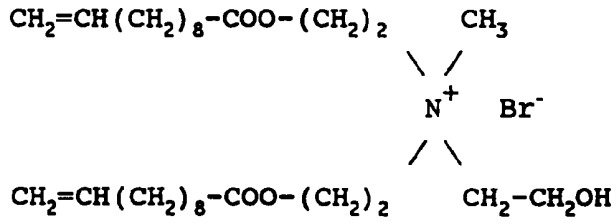


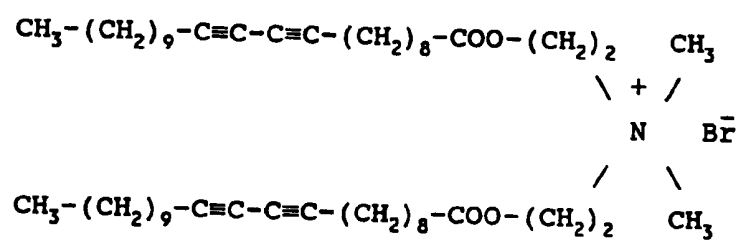


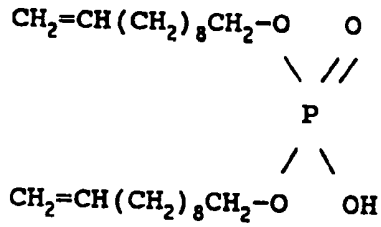












8. Estere av α-aminofettsyrer som kan være kondensert med seg selv som beskrevet av Folda et al (Rapid.Commun. 3, 1982, 167-174) f.eks. metyl 2-aminooktadekanoat, dokosanyl 2-aminooktadekanoat, metyl 2-aminohekskosanoat og dokosanyl 2-amino-heksakosanoat.

Disse esterene av langkjedede aminosyrer kan syteseres fra de mettede karboksylsyrene ved α-brominering med Hell-Volhard-Zelinsky reaksjonen. De resulterende α-bromo syrene konverteres til de korresponderende aminosyrene ved metoden til Cheronis et al (J.Org.Chem 6 (1949) 349). Metylesterene til aminosyrehydrokloridene lages ved å la tørr HCl-gass passere gjennom en suspensjon av aminosyren i metanol under tilbakeløp. Dokosanylesteren til aminosyrehydrokloridene syntetiseres ved å la tørr HCl-gass passere gjennom en 1:1 blanding av aminosyre og dokosanol ved 110°C. Esterhydrokloridene suspenderes så i tørr kloroform og omdannes til fritt amin ved å la tørr ammonium passere gjennom suspensjonen.

9. Langkjedede estere av sulfosuccinsyre som bærer polymeriserbare funksjoner.

10. Langkjedede estere av pyridindikarboksylsyrer (f.eks. 3,5-dikarboksy 1-metylpyridinjodid) som bærer polymeriserbare funksjoner.

11. Joderte røntgenkontrastmidler som inneholder langkjedede eter- eller estergrupper med polymeriserbare funksjoner. For eksempel kan et røntgenkontrastmiddel avledet fra iotalamsyre ha flere N-dihydroksyalkylgrupper, hvorav en eller to kan forestres med langkjedede fettsyrer. For eksempel kan ioheksol delvis beskyttes ved å danne et acetonidderivat av to eller tre dehydroksyalkylgrupper, fulgt av reaksjon med en aktivert fettsyre, f.eks. syreklorid, og beskyttelsesgruppen avspaltes for å fjerne acetonidgruppene. En slik amfifil kan enkelt krysskobles ved reaksjon med en dikarboksylsyre etter vesikkeldannelse.

12. Difettsyreestere av sorbitan. De multiple frie hydroksylgruppene som er tilstede tillater krysskobling med disyrer. Alternativt kan de forestrende fettsyregruppene være umettede for å kunne undergå olefinisk addisjonspolymerisering.

13. Diestere med formel

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

der R^{14} er en hydrofil gruppe og hver R^{13} er lipofile grupper, minst en av R^{13} og R^{14} bærer en polymeriserbar gruppe og/eller funksjonell gruppe som tillater kryssbinding. Slike forbindelser kan syntetiseres ved reaksjon av et dihalid med formel $R^{14}.CH.Hal_2$ med et salt av en syre $R^{13}.COOH$. De degraderes svært lett biologisk.

Det kan også være en fordel å inkludere i det innkapslende materialet en eller flere amfifiler slik som kolesterol som ikke er bundet eller polymerisert, men som forbedrer stabiliteten og/eller fleksibiliteten til mikroboblene.

Som angitt ovenfor kan mikroboblene stabiliseres ved innføringen av et materiale i partikkelform sammen med den innkapslede gassen. Slike partikler inkluderer for eksempel silika og jernoksid. Den foretrukne partikkelstørrelsen for slike stabiliserende partikler er i området 1 til 500 nm, avhengig av størrelsen av mikroboblene. Partiklene bør være slik at de bare delvis fuktes av det flytende mediet som brukes for å dispersere micellene, dvs. kontaktvinkelen mellom partikkelmaterialet og væsken bør være omtrent 90 grader.

De stabiliserende partiklene kan bære funksjonelle grupper som reagerer med amfifilene og danner kovalente eller andre bindinger. Partikler av de polymeriserte amfifilene med formel (II) kan være nyttige i denne sammenhengen. Kolloidale silikapartikler kan ha en partikkelstørrelse i området 5-50 nm og kan bære silanolgrupper på overflaten som kan reagere med amfifilen ved å danne

hydrogenbindinger eller ved å danne kovalente bindinger.

Amfifilene kan stabilisere gassen, eller gassforløperen ved å danne et enkelt lag i overgangen mellom væskemediet og gassen eller gassforløpersystemet eller ved å dannne vesikler som består av ett, eller flere lag som inneholder gassen eller gassforløperen. Det flyende mediet kan være vann, eller enhver ikkevandig væske med polar, protisk, aprotisk eller apolar karakteristikk.

Stabiliseringen av systemet ved monolag eller multilag eller dannelsen av vesiklene kan aktiveres, som beskrevet fullt ut i litteraturen, ved sonikering eller risting av blandingen av amfifile materialer i det riktige mediet, eller vesiklene dannes ved ethvert vanlig liposom/vesikkeldannelsesprinsipp.

Amfifilene kan danne vanlige miceller, eller inverse miceller når et apolart ikkevandig medium brukes. De stabiliserte systemene kan tørkes eller frysetørkes eller den ikkevandige fasen kan fordampes. Det resulterende tørkede systemet kan suspenderes i enhvert fysiologisk godtagbart løsningsmiddel slik som salin eller fosfatbuffer, eventuelt med et suspenderende eller emulgerende middel.

Polymeriseringsmetodene som brukest i stabiliseringen av vesiklene er godt kjente metoder i polymerkjemi, f.eks. som beskrevet i "Comprehensive Polymer Science", Vol 1-7, Pergamon Press, Oxford 1989, eller "Metoden der Organischen Chemie", Houben-Weyl, Makromoekulare Stoffe Band E20/1-3, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1987. Eksempler på passende metoder kan være kjedepolymeriseringsmetoder slik som ione- eller radikalpolymerisering eller metallkatalysert polymerisering, eller systemene kan polymerisere spontant ved trinnvis polymerisasjon når monolag eller vesikler dannes. Initiatorer kan være UV-bestråling eller enkel pH-forandring, eller radikalinitiatorer. Spesielt interessant her kan være innkapslingen av et stoff som ved en liten økning i temperatur utvikler en gass og samtidig frigir radikaler som setter i gang polymeriseringen av det omkringliggende skallet. Et slikt stoff er beskrevet i "Comprehensive Polymer Science", Vol 3, Pergamon Press, Oxford 1989, side 99, azo-bis-isobutyronitril

(AIBN), som ved UV-bestråling, eller ved oppvarming til 40°C begynner å danne N_2 samtidig som den danner to molekyler av cyanoisopropylradikaler som kan sette igang polymerisering eller raskt pardannes. Polymerisering av amfifiler som inneholder umettede grupperinger kan også settes i gang ved sonikering (se Price et al., Brit. Polym. J. 23 (1990), 63-66), f.eks. når dette brukes til å generere en gass-i-væske emulsjon som beskrevet i større detalj heretter.

Et gassinnesluttet system kan fåes ved å bruke en gassforløper eller gassen kan innesluttes. Gassen kan innesluttes i amfifilblandingen ved bare å riste blandingen kraftig når luft er tilstede, dvs. lage gass-i-væske emulsjoner som beskrevet i US 4684479. En annen velkjent metode, beskrevet f.eks i US 4774958 for å lage en gassinneholdende bobler, er ved sonikering av blandingen når luft er tilstede. Nok en velkjent metode er å sende en gass gjennom en sprøyte inn i en blanding av amfifil og væske. Som beskrevet i US 3900420 kan mikrogassemulsjonen lages ved å bruke et apparat for å sende gass fort inn i en rasktrennende væske. Et område med lavt trykk lages i en væske som inneholder amfifilen. Gassen sendes så inn i området med lavt trykk og gass-i-væskesystemet oppnås ved å pumpe væsken gjennom systemet.

Ved å bruke elektrolyseprinsippet er det mulig å lage gassen som skal innesluttes direkte i beholderen som inneholder amfifilene. Elektrolyttene som er nødvendig for elektrolysen kan tilogmed hjelpe til å stabilisere amfifilene videre for å gjøre polymerisering mulig. En vandig løsning som inneholder elektrolytter kan lage hydrogengass ved katoden og oksygen ved anoden. Elektrodene kan skilles ved en saltbro. Ved å tilsette hydrasin, kan nitrogengass lages ved anoden. Ved å bruk Kolbereaksjonen kan man også lage CO_2 fra karboksylsyrer ved å bruke elektrolyse.

Som beskrevet ovenfor kan gassinnesluttede vesikler fås ved å danne liposomer eller vesikler som består av ett eller flere dobbeltlag. Disse vesiklene kan dannes ved forhøyede trykkforhold på en slik måte at gass innesluttes i vesiklene.

Det er også mulig å danne en væske-væske (f.eks. olje i vann) emulsjon når

amfifile systemer lik dem diskutert ovenfor er tilstede, f.eks. ved sonikering, for å danne væskeinneholdende vesikler som deretter kan polymeriseres. De polymeriserte vesiklene kan deretter behandles for å fjerne væsken (med fordel et lettfordampelig hydrokarbon) ved fordampning, hvor kokepunktet til væsken er relativt lavt, eller ved ekstrasjon med et løsningsmiddel med lavt kokepunkt som selv kan fjernes ved fordampning. Fordampning av væskekjerner med lave kokepunkt kan også skje spontant under sonikering. Der hvor væsken i vesiklene er vann, kan den fjernes ved frysetørring.

I de følgende eksemplene er Bis-linoleyl-lecitin tilgjengelig på markedet fra Lipids Products, Surrey, UK:-

Eksempel 1

En mettet løsning av bis-linoleyl-lecitin i en vandig løsning oppnås ved å blande 100 mg av amfifilen i 100 ml sterilt, pyrogenfritt vann. Den mettede løsningen filtreres gjennom et 0,45 μm filter, og den resulterende løsningen sonikeres i 1-10 minutter i nærvær av luft. Under sonikeringen innesluttes luft i løsningen og en gass-i-væske emulgering dannes. Polymerisering av monolaget av amfifilen ved gass-væske interfasen oppnås ved UV-bestråling av løsningen ved 254 μm med en xenonlampe, eller ved tilsetning av en radikalinitiator.

Det resulterende produktet inneholder mikrosfærer med innesluttet gass. Mikrosfærene skilles fra overskudd av polymeriserte amfifiler ved å bruke en skilletrakt. De resulterende mikrosfærene resuspenderes i sterilt, pyrogenfritt salin, og fylles på 10 ml flasker. Produktet produseres ved septiske teknikker i et "rent rom" (LAF-stasjon) for å oppnå et sterilt, pyrogenfritt produkt. Partikkelstørrelsen til mikrosfærene er i området 0,5−10 μm.

Eksempel 2

Eksempel 1 gjentas og den polymeriserbare amfifilen som brukes er

forbindelsen bis-(trieikoso-10,12-diynoyl)fosfatidylkolin (Hirth et al, Helv Chim Acta 40,957, 1928).

Eksempel 3

100 mg bis-linoleyl-lecitin oppløses i en blanding av kloroform/metanol. Blandingen helles i en rundkolbe, og den organiske fasen fordampes med en rotavapor på en slik måte at en tynn film av lecitinderivatet dannes på innsiden av flasken. 10 ml sterilt pyrogenfritt vann tilsettes og lipidene disperseres i løsningen ved sonikering ved luft/væskeovergangen i 5-15 minutter. Gassholdige vesikler dannes og de gassinneholdende mikrosfærene polymeriseres med 2UV-bestråling av løsningen ved 254 nm med en xenonlampe eller ved tilsetning av en radikalinitiator ved konstant omrøring. Polymeriserte vesikler med innesluttet gass fjernes fra de tiloversblivende polymeriserte amfifilene med en skilletrakt. De resulterende vesiklene suspenderes i sterilt, pyrogenfritt salin og filtreres for å oppnå et produkt som inneholder mikrosfærer i størrelsesområdet 0,5-5 μm. Produktet lages ved å bruke septiske tekninkker i et "rent rom" (LAF-stasjon) for å oppnå et sterilt; pyrogenfritt produkt. Det ferdige produktet fylles på 10 ml flasker.

Eksempel 4

Eksempel 3 gjentas og den polymeriserbare amfifilen som brukes er forbindelsen bis-(trieikoso-10,12-diynoyl)fosfatidylkolin (Hirth et al; Helv Chim Acta 40, 957, 1928).

Fremstilling av polymeriserbare amfifiler

Eksempel 5

Tetretylenglykol mono-12-(metakryloyloksy)dodekanoat

12-(Metakryloyloksy)dodekansyre (Regen et al., J. Am. Chem. Soc. 1982, 104, 795) (2,75 g, 9,65 mmol) ble oppløst i tetrahydrofuran (45 ml) og en

løsning av oksalylklorid (2,1 ml, 24,2 mmol) i tetrahydrofuran (5 ml) ble tilsatt dråpevis. Blandingen ble rørt ved romtemperatur i 24 timer, deretter ble løsningsmidlet fordampet under redusert trykk. Bunnfallet ble oppløst i tetrahydrofuran (25 ml) og tilsatt dråpevis til en løsning av tetraetylenglykol (1,88 g, 9,65 mmol) og pyridin (0,92 g, 11,7 mmol) i tetrahydrofuran (35 ml.). Blandingen ble rørt i 24 timer ved romtemperatur. Det utfelte pyridinsaltet ble filtrert vekk og løsningsmiddelet fordampet. Kromatografisk rensing på en silikagelsøyle (etylacetat) ga 1,67 g (38%) av tittelforbindelsen. ^{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), ($COOCH_2$), 5,52 (m, 1H, vinyl), 6,10 (m, 1H, vinyl).

Eksempel 6

Polyetylenglykol(550)metyleter 12-(metakryloyloksy)dodekanoat

12-(Metakryloyloksy)dodekansyre (1,90 g, 6,69 mmol) ble oppløst i tetrahydrofuran (20 ml), og en løsning av oksalylklorid (2,12 g, 16,7 mmol) i tetrahydrofuran (10 ml) ble tilsatt dråpevis. Blandingen ble rørt i 24 timer ved romtemperatur, og deretter ble løsningsmiddelet fordampet under redusert trykk. Bunnfallet ble oppløst i tetrahydrofuran (10 ml) og tilsatt dråpevis til en løsning av polyetylenglykol(550)monometyleter (3,68 g, 6,69 mmol) og pyridin (0,53 g, 6,69 mmol) i tetrahydrofuran (25 ml). Blandingen ble rørt i 24 timer ved romtemperatur. Det utfelte pyridinsaltet ble filtrert vekk og løsningsmiddelet fordampet. Kromatografisk rensing på en silikagelsøyle (kloroform) ga 2,31 g (42,3%) av tittelforbindelsen. 1H NMR (60 MHz, $CDCl_3$): δ 1,3 (br s, 18 H, $(CH_2)_9$), 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 (snitt), $CH_2OCH_2CH_2+COOCH_2CH_2$), 3,9-4,4 (m, 4H, $COOCH_2$), 5,52 (m, 1H, vinyl), 6,10 (m, 1H, vinyl).

Eksempel 7

Polyetylenglykol(2000)metyleter 12-(metakryloyloksy)dodekanoat

12-(Metakryloyloksy)dodekansyre (2,84 g, 0,01 mol) i tetrahydrofuran (20

ml) ble reagert med oksalylklorid (3,0 g, 0,024 mol), for å oppnå det korresponderende syrekloridet. Dette syrekloridet (3,0 mg, 0,01 mol) oppløst i vannfritt tetrahydrofuran (10 ml) ble tilsatt dråpevis til en blanding av polyetylenglykol(2000)monometyleter (20,0 g, 0,01 mol) og vannfritt pyridin (0,83 g, 0,01 mol) i vannfri tetrahydrofuran (300 ml). Blandingen ble rørt i 48 timer ved romtemperatur. Den resulterende væsken ble renset ved "flash" kromatografi (silikagel/etylacetat) for å gi 16,5 g (75%) av tittelforbindelsen. ^{1}H NMR (60 MHz, $CDCl_3$): δ 1,20 (s, 18H, CH_2), 2,15 (m, 2H, $C\underline{H}_2COOH$), 3,5 (s, 3H, CH_3O), 3,6 (s, 180H, $90\times CH_2O$), 4,0 (m, 4H, $2\times COOC\underline{H}_2$), 5,7-6,0 (m, 3H, $CH_2=$ og $=CH$).

Eksempel 8

a) 16-(Metakryloyloksy)heksadekansyre

16-Hydroheksadekansyre (6,81 g, 25,0 mmol) ble oppløst i tetrahydrofuran (150 ml) og løsningen ble avkjølt til 0°C før pyridin ble tilsatt (2,73 g, 34,5 mmol). Metakryloylklorid (2,61 g, 25,0 mmol) ble oppløst i tetrahydrofuran (75 ml) og tilsatt dråpevis. Blandingen ble rørt i 1 time ved 0°C og deretter ved romtemperatur i 24 timer. Løsningsmiddelet ble fjernet under redusert trykk (romtemperatur), bunnfallet suspendert i eter (100 ml) og blandingen vasket med destillert vann. Eterlaget ble tørket ($MgSO_4$) og eteren fordampet. Kromatografisk rensing på en silikagelsøyle (1:2 etylacetat/heksan) ga 5,0 g (64%) av tittelforbindelsen. ^{1}H NMR (60 MHz, $CDCl_3$): δ 1,3 (br s, 26 H, $(CH_2)_{13}$), 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, vinyl), 6,10 (m, 1H, vinyl).

b) Tetraetylenglykolmono 16-(metakryloyloksy)heksadekanoat

16-(metakryloyloksy)heksadekanosyre (2,05 g, 6,57 mmol) ble oppløst i tetrahydrofuran (25 ml) og en løsning av oksalylklorid (1,4 ml, 16,5 mmol) i tetrahydrofuran (10 ml) ble tilsatt dråpevis. Blandingen ble rørt i 24 timer ved romtemperatur, og deretter ble løsningsmiddelet fordampet under redusert trykk.

Bunnfallet ble oppløst i tetrahydrofuran (10 ml) og tilsatt dråpevis til en løsning av tetraetylenglykol (1,07 g, 5,50 mmol) og pyridin (0,44 g, 5,50 mmol) i tetrahydrofuran (25 ml). Blandingen ble rørt i 24 timer ved romtemperatur. Det utfelte pyridinsaltet ble filtrert vekk, og løsningsmiddelet fordampet. Kromatografisk rensing på en silikagelsøyle (2:1 etylacetat/heksan) ga 0,84 g (30%) av tittelforbindelsen. ^{1}H 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, $3\times CH_2OC\underline{H_2}C\underline{H_2}+COOCH_2C\underline{H_2}$), 4,0-4,4 (m, 4H, $COOCH_2$), 5,52 (m, 1H, vinyl), 6,10 (m, 1H, vinyl).

Eksempel 9

Polyetylenglykol(350)metyleter 16-(metakryloyloksy)heksadekanoat

Produktet ble fremstilt fra 16-(metakryloyloksy)heksadekanosyre (fremstilt som beskrevet i eksempel 8(a)), og polyetylenglykol(350)monometyleter med fremgangsmåten gitt i eksempel 6.

Eksempel 10

a) 12-(Akryloyloksy)dodekansyre

12-Hydroksydodekansyre (5,0 g, 0,023 mol) oppløst i tetrahydrofuran (100 ml) og pyridin (2,16 g, 0,027 mol) ble avkjølt til 0°C. Akryloylklorid (3,15 g, 0,023 mol) i tetrahydrofuran (75ml) ble deretter tilsatt dråpevis til løsningen. Blandingen ble rørt i 5 timer ved 0°C og deretter rørt ved romtemperatur over natten. Det utfelte pyridinsaltet ble filtrert vekk og løsningsmiddelet fjernet under vakum. Den resulterende væsken ble renset ved "flash"-kromatografi (silikagel/kloroform) for å gi 2,5 g, (40%) av tittelforbindelsen. ^{1}H NMR (60 MHz, $CDCl_3$): δ 1,20 (s, 18H, CH_2), 2,15 (m, 2H, $C\underline{H_2}COOH$), 4,0 (m, 2H, $COOC\underline{H_2}$), 5,7-6,0 (m, 3H, $CH_2{=}$ og $=CH$).

b) Tetraetylenglykolmono-12-(akryloyloksy)dodekanoat

12-Akryloyloksydodekansyre (2,00 g, 0,007 mol) i dietyleter (20 ml) ble reagert med oksalylklorid (2,40 g, 0,019 mol) for å oppnå det korresponderende syrekloridet. Dette syrekloridet (1,80 g, 0,006 mol) oppløst i vannfri kloroform (10 ml) ble tilsatt dråpevis til en blanding av tetraetylenglykol (1,20 g, 0,006 mol) og vannfritt pyridin (0,50 g, 0,006 mol) i vannfri kloroform (30 ml). Blandingen ble rørt over natten ved romtemperatur. Den resulterende væsken ble renset ved "flash"-kromatografi (silikagel/etylacetat) for å gi 1,10 g (40 %) av tittelforbindelsen som en fargeløs olje. ^{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, $7\times CH_2O$), 4,0 (m, 5H, $2\times COOC\underline{H}_2$ og OH), 5,7-6,0 (m, 3H, $CH_2=$ og =CH).

Eksempel 11.

Tetraetylenglykol mono- 10,12-trikosadiynoat

10,12-Trikosadiynsyre (4 2,50 g, 0,007 mol) i tetrahydrofuran (30 ml) ble reagert med oksalylklorid (2,25 g, 0,17 mol) for å oppnå det korresponderende syrekloridet. Dette syrekloridet (2,45 g, 0,007 mol) oppløst i vannfri tetrahydrofuran (10 ml) ble tilsatt dråpevis til en løsning av tetraetylenglykol (1,32 g, 0,007 mol) og vannfritt pyridin (0,83 g, 0,01 mol) i vannfritt tetrahydrofuran (40 ml). Blandingen ble rørt over natten ved romtemperatur. Det utfelte pyridinsaltet ble filtrert av og løsningsmiddelet fjernet under vakum. Den resulterende væsken ble renset ved "flash"-kromatografi (silikagel/etylacetat) for å gi 1,50 g (41%) av tittelforbindelsen som en fargeløs olje. ^{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, $7\times CH_2O$), 4,20 (m, 2H, CH_2CO).

Eksempel 12

Polyetylenglykol(550)metyleter 10,12-trikosadiynoat

10,12-Trikosadiynsyre (2,50 g, 0,007 mol) i tetrahydrofuran (30 ml) ble reagert med oksalylklorid (2,25 g, 0,017 mol) for å oppnå det korresponderende syrekloridet. Dette syrekloridet (2,45 g, 0,007 mol) oppløst i vannfri tetrahydrofuran (10 ml) ble tilsatt dråpevis til en blanding av polyetylenglykol(550)monometyleter (3,85 g, 0,007 mol) og vannfritt pyridin (0,83 g, 0,01 mol) i vannfri tetrahydrofuran (30 ml). Blandingen ble rørt over natten ved romtemperatur. Det utfelte pyridinsaltet ble filtrert vekk og løsningsmiddelet fjernet under vakuum. Den resulterende væsken ble renset ved "flash" kromatografi (silikagel/etylacetat) for å gi 2,72 g (41 %) av tittelforbindelsen som en fargeløs olje. ^{1}H NMR (60 MHz, $CDCl_3$): δ 0,88 (m, 3H, $C\underline{H}_3CH_2$), 1,30 (m, 28 H, CH_2), 2,20 (m, 6H, CH_2,), 3,65 (s, 48 H, 24×CH_2CO), 3,50 (s, 3H, CH_3O), 4,20 (m, 2H, CH_2CO).

Eksempel 13

a) Metyl-10,12-Trikosadiynoat

10,12-Trikosadiynsyre (3,0 g, 0,0084 mol), metanol (15 ml) og konsentrert svovelsyre (0,8 ml) ble varmet til tilbakeløp og rørt i 1 time. Den avkjølte blandingen ble tatt opp i eter (40 ml) og vasket med 10% $NaHCO_3$ (20 ml) og vann (20 ml), og den organiske fasen ble tørket ($MgSO_4$). Fordamping av løsningsmiddelet ga 2,68 g (74 %) av tittelforbindelsen. ^{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'-Dihydroksypropyl)-10,12-trikosadiynamid

Metyl 10,12-trikosadiynoat (1,69 g, 4,67 mmol) ble oppløst i metanol. 3-amino-1,2-propandiol (0,509 g, 5,6 mmol) og natriummetoksid i 2,5% oppløsning i metanol (0,146 g, 3 mol%) ble tilsatt. Blandingen ble kokt med tilbakeløp i 3

timer og løsningsmiddelet fordampet. Råproduktet ble rekrystallisert fra kloroform. Utbytte: 1,00 g (51%). ^{1}H NMR (60 MHz, $CDCl_3$): δ 0,7-1,0 (m, 3H, $C\underline{H_3}CH_2$), 1,3 (s, br, 28H, CH_2), 2,0-2,4 (m, 6H, CH_2), 3,3-3,8 (m, 5H, 2×CH_2 + CH (propandiol)), 6,0-6,3 (m, 1H, NH).

Eksempel 14

N,N'-bis(2,3-dihydroksypropyl) 2,4,6-triiodo-5-(trikosa-10,12-diynoylamino)isoftalamid

5-Amino,N,N'-bis(2,3-diacetoksypropyl)-2,4,6-triiodoisoftalamid (2,19 g, 2,5 mmol) og 10,12-trikosadiynoylklorid (1,82 g, 5 mmol) ble oppløst i 20 ml diklorometan. Løsningen ble rørt i 3 dager ved romtemperatur under nitrogenatmossfære. TLC (etylacetat) indikerte at reaksjonen var fullstendig. Reaksjonsblandingen ble fordampet og oppløst i en blanding av metanol (30 ml) og 1M natriumhydroksidløsning (15 ml). Etter 1 time indikerte TLC (metanol/kloroform) at reaksjonen var fullstendig. Løsningen ble nøytralisert med konsentrert saltsyre. Restene ble oppløst i kloroform og filtrert. Løsningsmiddelet ble fjernet og reaksjonsblandingen renset gjennom silikagel med metanol/kloroform (1:3) for å gi tittelforbindelsen. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO): δ 0,8 (CH_3, t), 1,2-1,7 (17×CH_2, m), 2,2-2,3 (2×CH_2, t), 3.1-3,2 (2×CH_2NH, m), 3,3-3,5 (2×CH_2OH, m), 3,6-3,8 (2×CHOH), 4,4-4,7 (4×OH, m), 8,4-8,5 (2×CONH, m), 9,8 (2×ArNHCO, s).

Eksempel 15

N-(3',4',5'-Trihydroksy-6'-hydroksymetyltetrahydropyran-2'-yl)-10,12-trikosadiynamid

1-Amino-1-deoksy-β-D-galaktose (180 mg, 1 mmol), 10,12-trikosadiynsyre (350 mg, 1mmol) og 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)karbodiimid ble oppløst i 25 ml tørr dimetylformamid og rørt ved romtemperatur over natten. Løsningsmiddelet ble fjernet in vacuo, bunnfallet gjenoppløst i kloroform/metanol (1:1), filtrert og renset ved rettfasekromotografi på en CHROMATOTRON. De relevante delene ble

samlet, konsentrert in vacuo, og produktet ble karakterisert ved NMR.

Eksempel 16

6-(2',6'-Diaminoheksanoylamino)-3,4,5,-trihydroksytetrahydropyran-2-ylmetyl 10,12-trikosadiynoat

1-Amino-1-deoksy-β-D-galaktose (180 mg, 1mmol), og Fmoc-Lys(Boc)-OPfp (650 mg, 1mmol) ble oppløst i 4 ml tørr dimetylformamid og rørt ved romtemperatur over natten. Løsningsmiddelet ble fjernet in vacuo, bunnfallet ble gjenoppløst i acentonitril/vann (1:1), filtrert og renset ved reversert fasekromatografi (Lobar RP8B, acetonitril/vann 50:50 og 65:35). De relevante fraksjonene ble samlet, konsentrert in vacuo, og produktet karakterisert ved NMR. Det rensede produktet (1 g, 1 mmol), 10,12-trikosadiynsyre (350 mg, 1mmol) og 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)karbodiimid oppløses i 10 ml tørr dimetylformamid og røres ved romtemperatur over natten. Løsningsmiddelet fjernes in vacuo, bunnfallet oppløses på nytt i kloroform/metanol (95:5), filtreres og renses ved rettfasekromotografi på en CHROMATOTRON. De relevante fraksjonene samles, konsentreres in vacuo, og produktet karakteriseres ved NMR. De beskyttende gruppene til α-ϵ aminogruppene fjernes ved standardreaksjoner. Boc fjernes ved behandling med trifluoroeddiksyre/metylenklorid i 30 minutter. Løsningsmiddelet fjernes in vacuo. Fmoc fjernes ved å behandle bunnfallet med 20 % piperidin i dimetylformamid i 30 minutter, og løsningsmiddelet fjernes in vacuo. Det ferdige produktet renses ved reversert fasekromatografi (Lobar RP8B).

Eksempel 17

(3,4,5,6-Tetrahydroksytetrahydropyran-2-ylmetyl) 10,12-trikosadiynoat

1,2,3,4-di-O-isopropyliden-D-galaktopyranose (2,6 g, 10 mmol) og 10,12-trikosadiynsyre (3,5 g, 10 mmol) ble oppløst i 25 ml metylenklorid. 1-Etyl-3(3-dimetylaminopropyl)karbodiimid (2 g, >10 mmol) ble tilsatt ufortynnet. Reaksjonsblandingen ble fortynnet til 100 ml, ekstrahert med vann (2×25 ml), tørket over $MgSO_4$ og løsningsmiddelet ble fjernet in vacuo. Råpoduktet ble

behandlet med trifluoreddiksyre (10 ml) ved romtemperatur i 30 minutter, forampet in vacuo og renset ved rettfasekromatografi på en CHROMATOTRON, vasket ut med metanol/kloroform (5:95). Produktet ble karakterisert ved NMR.

Fremstilling av ultralydkontrastmidler Eksempler 18-41

i) Generell fremstillingsmetode

Den polymeriserbare amfifilen ble oppløst i et minimum av metanol og satt til en blanding av vann og et hydrokarbon. En komonomer og/eller 2,2'-azobisisobutyronitril (AIBN) oppløst i et minimum av metylenklorid ble eventuelt tilsatt og nitrogen ble boblet gjennom blandingen i 1 minutt, hvoretter blandingen ble sonikert under en nitrogenatmosfære med et LABSONIC 2000 apparat, sonikeringsproben (lengde 127 mm, diameter 9,5 mm) var plassert 2-3 cm under overflaten til blandingen, og energien som ble brukt var "maksimal styrke" eller "halv styrke" som den laveste posisjonen. De resulterende emulsjonene ble eventuelt bestrålt med UV-lys under en nitrogenatmosfære eller behandlet med en redoksinitiator inneholdende kaliummetabisulfitt (0,05 g, 0,22 mol) i vann (1 ml). og kaliumperoksosulfat (0,0023 g, 3,3 × 10^{-3} mmol) i vann (1 ml). Metoden ble modifisert i eksempel 31 på den måten at AIBN ble tilsatt og blandingen ble ristet for hånd, hvoretter en første porsjon komonomer ble tilsatt, og sonikering ble gjennomført mens nitrogengass ble boblet gjennom blandingen. En andre porsjon komonomer ble deretter tilsatt og den resulterende emulsjonen utsatt for UV-bestråling.

De spesifikke reaksjonsbetingelsene brukt i hvert eksempel er satt opp i skjema 1. Liknende betingelser, f.eks. med sonikering i 5 minutter med maksimuminstilling og bestråling i 1 time eller tilsetting av det ovenforbeskrevne redoksinitiatorsystemet og forsiktig omrøring i 30 minutter, kan brukes for å behandle amfifilene beskrevet i eksempel 14-17.

Skjema 1 - Reaksjonsbetingelser

Eksempel nr.	Eksempel der amfifilen ble fremstilt, og mengde brukt (g/mmol)	Volum vann (ml)	Hydrokarbon og volum (ml)	Komonomer og mengde (g/mmol)	Mengde av AIBN (g/mmol)	Sonikerings-nivå og varighet (minutter)	Varighet av UV-bestråling (timer)	Redoks-system
	5			MM				
18	0,039/0,084	50	PE-5	0,018/0,18	–	fs-5	–	–
	5			MM				
19	0,037/0,080	50	IP-5	0,018/0,18	–	hs-3	–	–
	5			MM				
20	0,383/0,83	500	IP-50	0,18/1,8	0,20/1,21	fs-6	1,5	–
	5			MM				
21	0,042/0,091	50	IP-5	0,09/0,9	0,02/0,12	fs-3	1	–
	5			MM				
22	0,040/0,086	50	PE-2,5	0,018/0,18	0,02/0,12	fs-3	1	–
	6			MM				
23	0,053/0,065	50	PE-5	0,018/0,18	0,02/0,12	fs-4	–	–
	6			MM				
24	0,530/0,65	500	PE-50	0,180/1,80	0,200/1,20	fs-8	1	–
	6			MM				
25	0,500/0,61	500	PE-50	0,180/1,80	0,200/1,20	fs-8	2,5	–
	6			MM				
26	0,200/0,245	20	PE-2	0,018/0,18	0,020/0,12	fs-3	1 (Eks. 26a)	✓ (Eks. 26b)
	6			MM				
27	0,053/0,065	50	PE-25	0,018/0,18	0,020/0,12	fs-3	–	✓
	6			MM				
28	0,054/0,066	50	PE-1	0,018/0,18	0,020/0,12	fs-3	–	–

Skjema 1 - Reaksjonsbetingelser

Eksempel nr.	Eksempel der amfifilen ble fremstilt, og mengde brukt (g/mmol)	Volum vann (ml)	Hydrokarbon og volum (ml)	Komonomer og mengde (g/mmol)	Mengde av AIBN (g/mmol)	Sonikerings-nivå og varighet (minutter)	Varighet av UV-bestråling (timer)	Redoks-system
6			MM					
29	0,054/0,066 6	50	TO-5	0,018/0,18 ST	0,020/0,12	fs-3	–	–
30	0,056/0,069 6	50	PE-5	0,042/0,41 ST	0,020/0,12	fs-3	1	–
31	0,057/0,070 6	50	PE-5	0,042/0,41 + 0,099/0,95	0,020/0,12	fs-3	1	–
32	0,054/0,066 7	50	IP-5	– MM	0,020/,012	fs-6	–	–
33	0,193/0,090 8(b)	50	PE-5	0,018/0,18 MM	0,02/0,12	fs-3	–	–
34	0,042/0,081 8(b)	50	IP-5	0,018/0,18 ST	0,020/0,12	hs-3	1	–
35	0,046/0,089 9	50	PE-5	0,042/0,41	0,020/0,12	fs-3		
36	0,052/0,077 10(b)	50	PE-5	– MM	–	fs-3	–	–
37	0,036/0,08 11	50	PE-5	0,018/0,18	0,02/0,12	fs-3	1	–
38	0,047/0,09	50	PE-5	–	0,02/0,12	fs-6	–	–

Skjema 1 - Reaksjonsbetingelser

Eksempel nr.	Eksempel der amfifilen ble fremstilt, og mengde brukt (g/mmol)	Volum vann (ml)	Hydrokarbon og volum (ml)	Komonomer og mengde (g/mmol)	Mengde av AIBN (g/mmol)	Sonikerings-nivå og varighet (minutter)	Varighet av UV-bestråling (timer)	Redoks-system
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	–	–

Nøkkel- PE = petroleumeter (kokepunkt 40-60°C), IP = isopentan, TO = toluen, MM = metylmetakrylat, ST =styren, fs = full styrke, hs = halv styrke

* Mengden av kaliumperoksosulfat redusert til 0,002 g (0,003 mmol)

ii) Akustisk karakterisering

De akustiske effektene av produktene i eksempel 18-41 ble undersøkt ved å måle deres ultrasoniske transmisjoner som en funksjon av tiden over en periode på 90 sekunder. Testene ble utført på prøver av emulgert materiale som ble dannet rett etter sonikering, og der det passet, på materialet etter at det var blitt utsatt for UV stråling eller redoksinitiering. I eksempel 25 ble prøven som ble fjernet etter bestråling testet på nytt etter uttynning med vann (1:1). I eksempel 31 ble en prøve fjernet etter den manuelle ristingen også testet. En 3,5 MHz bredbånds transducer ble brukt i en pulsrefleksjonsteknikk. Alle avlesningene var stabile gjennom den 90 sekunder lange måleperioden, slik at en enkelt verdi (i db/cm) er nok for å beskrive hver 90 sekunders måleperiode. I enkelte tilfeller ble målingene gjentatt ved tidsintervaller for å undersøke videre stabiliteten til ultralydkontrastmidlene. Resultatene vises i skjema 2, tidsintervallene (i minutter etter sonikering) til akustisk karakterisering er gitt i parenteser for hver avlesning.

Skjema 2
Akustiske karakteristikker

Eksempel nr.	Akustisk effekt etter sonikering.	Akustisk effekt etter UV bestråling/ redoksinitiator
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) fortynnet
26	4,0 (0)	2,8 (20, redoks)
	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 (etter risting)	
	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) Mikroskopianalyse

Et utvalg av produktene fra Eksemplene 18-41 ble undersøkt med et lysmikroskop (Nikin UFX-II) med en mikrometerskala. Undersøkelsene ble generelt utført ved å ta ut prøver av emulgert materiale som ble dannet rett etter sonikering, bortsett fra for eksempel 31 (der prøven ble tatt ut etter manuell risting), eksempel 39 (der prøven ble tatt ut etter UV-bestråling) og eksempel 40 (der prøver ble tatt ut både rett etter sonikering og etter redoksinitiering), og legge hver prøve mellom to glassplater. Resultatene fra disse undersøkelsene presenteres i Skjema 3. Tidsintervallene (i minutter etter sonikering) ved mikroskopianalyse er gitt for hvert eksempel.

Skjema 3
Mikroskopianalyse

Eksempel nr.	Tid etter sonikering (min)	Størrelse (diam., μm)	Kommentarer (form, størrelsesfordeling)
25	10	4	sfærer, smal størrelsesfordeling
26	10	10-25	sfærer
27	10	4	sfærer, smal størrelsesfordeling
28	10	4-6	sfærer, smal størrelsesfordeling
29	10	variabel	forskjellige former, bred størrelsesfordeling
30	10	4-6	sfærer, smal størrelsesfordeling
31	10 (etter risting)	10-100	store bobler, ulik de sonikerte prøvene
33	10	2-3	sfærer
35	10	10-15	sfærer
36	10	8-15	sfærer, bred størrelsesfordeling
38	10	5-10	sfærer
39	10	5-10	sfærer, også større bobler
40	30	5-10	sfærer
40	30 (etter redoks)	variabel	bobler med irregulære fasonger.
41	10	4	sfærer, smal størrelsesfordeling

iv) Størrelseeksklusjonskromatografi

Størrelseseksklusjonskromatografi (SEC) ble brukt på det frysetørrede produktet fra eksempel 25 med tetrahydrofuran (Rathburn HPLC kvalitet) som eluant og refraktiv indeks som detektor (Knauer, Tyskland). Søylesettet som ble brukt bestod av 3 × 30 cm søyler inneholdende 5μm styrogel med porestørrelser på 10^5, 10^4, og 500Å (Polymer Laboratories Ltd., England). Kalibrering ble gjort mot polystyrenstandarder (Polymer Laboratories Ltd., England). Det amfifile monomerutgangsmaterialet ga en toppmolekylvekt på 1,600 Daltons og polymerproduktet ga en toppmolekylvekt på 22,000 Daltons, begge gitt i polystyrenekvivalenter. Ved å bruke konverteringsfaktoren på 0,59 for å konvertere fra polystyrenekvivalenter til "ekte" molekylvekter (verdien for PEG gitt av Dawkins et al., J.Liq. Chromatog. 7, 1739, (1984)), korresponderer disse til molekylmasser på 944 Daltons for monomeren og 13,000 Daltons for polymeren respektivt.

Patentkrav:

1. Kontrastmiddel for bruk i diagnostiske ultralydundersøkelser som omfatter gassfylte mikroballonger *karakterisert ved at* nevnte mikroballonger inneholder mikrobobler av gass innkapslet av monolag eller ett eller flere dobbeltlag av ikke-proteinholdige amfifile enheter som er kryssbundne eller polymeriserte, der (i) nevnte amfifile enheter ikke danner en polyoksyetylen-polyoksypropylen polymer og der (ii) nevnte kontrastmiddel ikke omfatter mikropartikler av polyaldehyd.

2. Kontrastmidler ifølge krav 1 *karakterisert ved at* nevnte kryssbundne eller polymeriserte amfifile enheter inneholder biodegraderbare bindinger.

3. Kontrastmidler ifølge krav 2 *karakterisert ved at* nevnte biodegraderbare bindinger foreligger i de amfifile enhetene.

4. Kontrastmidler ifølge krav 3 *karakterisert ved at* at nevnte biodegraderbare bindinger foreligger i de hydrofile deler av de amfifile enhetene.

5. Kontrastmidler ifølge et av kravene 2 til 4 *karakterisert ved at* de inneholder biodegraderbare bindinger valgt fra amid-, imid-, imin-, ester-, anhydrid-, acetal-, karbamat-, karbonat-, karbonatester- og disulfidgrupper.

6. Kontrastmidler ifølge krav 5 *karakterisert ved at* de inneholder biodegraderbare kryssbindende grupper.

7. Kontrastmidler ifølge krav 6 *karakterisert ved at* de biodegraderbare kryssbindende grupper inkluderer enheter av formel

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

   (der Y og Z, som kan være like eller forskjellige, er -O-, -S- eller $-NR^3-$; R^1 og R^2, som kan være like eller forskjellige, er hydrogenatomer eller karbonbundne monovalente organiske grupper eller de utgjør sammen en karbonbundet divalent organisk gruppe; R^3 er et hydrogenatom eller en organisk gruppe; og symbolene n, som kan være like eller forskjellige, er null eller 1).

8. Kontrastmidler ifølge krav 1 *karakterisert ved at* de er dannet fra polymeriserbare amfifile enheter inneholdende umettede lipofile kjeder som eventuelt kan være oleyl- eller linoleylgrupper eller inneholde diacetylen-, akryloyl- eller metakryloylgrupper.

9. Kontrastmidler ifølge ethvert av kravene foran *karakterisert ved at* de hydrofile delene av de amfifile enhetene inneholder en eller flere grupper valgt fra kvarternært ammonium, hydroksyl, karboksy, karboksylation, amid, fosfat, sulfat og sulfonat.

10. Kontrastmidler ifølge krav 9 *karakterisert ved at* de hydrofile delene av de amfifile enhetene inneholder triglycerylenheten av et fosfolipid, et jodinert røntgenkontrastmiddel, et karbohydrat, eller en cholin-, etanolamin-, serin- eller glycerol-rest.

11. Kontrastmidler ifølge et av kravene 1 til 8 *karakterisert ved at* de hydrofile delene av de amfifile enhetene inneholder en polyoksyetylenglykol-rest som kan være foretret.

12. Kontrastmidler ifølge krav 11 *karakterisert ved at* de amfifile enhetene inneholder tetraetylenglykol mono-12-(metakryloyloksy) dodekanoat, polyetylenglykol (550) metyleter 12-(metakryloyloksy) dodekanoat, polyetylenglykol (2000) metyleter 12-(metakryloyloksy) dodekanoat, tetraetylenglykol mono 16-(metakryloyloksy) heksadekanoat, polyetylenglykol (350) metyleter 16-(metakryloyloksy) heksadekanoat eller tetraetylenglykol mono-12-(metakryloyloksy) dodekanoat.

13. Kontrastmidler ifølge ethvert av kravene foran *karakterisert ved at* mikroboblene inneholder gass valgt fra luft, nitrogen, oksygen, hydrogen, dinitrogenoksid, karbondioksid, helium, argon, svovelheksafluorid og valgfritt fluorerte hydrokarboner som er i gassform ved 37 °C.

14. Kontrastmidler ifølge krav 13 *karakterisert ved at* nevnte gass inneholder svovelheksafluorid eller et fluorert hydrokarbon som er i gassform ved 37 °C.

15. Kontrastmidler ifølge ethvert av kravene foran *karakterisert ved at* de videre inneholder en uorganisk stabilisator i partikkelform.

16. Kontrastmidler ifølge ethvert av kravene foran *karakterisert ved at* mikroboblene har en midlere størrelse på 0,1-10 μm, foretrukket1-7 μm.

17. Kontrastmidler ifølge ethvert av kravene foran *karakterisert ved at* det har en halveringstid *in vivo* på ikke mer enn 48 timer, foretrukket 1-12 timer.

18. Framgangsmåte for framstilling av et kontrastmiddel ifølge krav 1 *karakterisert ved at* det dannes en væskedispersjon av vesikler inneholdende en gass eller gassforløper innkapslet av monolag eller ett eller flere dobbeltlag av ikke-proteinholdig amfifilt materiale, eventuelt ved sonikering for å danne en olje-i-vann emulsjon, hvorved et lettfordampelig hydrokarbon blir innkapslet av monolag eller ett eller flere dobbeltlag av nevnte amfifile materiale, og nevnte lettfordampelige hydrokarbon blir delvis eller fullstendig fjernet fra vesiklene etter kryssbinding eller polymerisering av det amfifile materiale.

19. Framgangsmåte ifølge krav 18 *karakterisert ved at* kontrastmidlet blir isolert ved frysetørring.

20. Væskedispersjon av vesikler som er anvendbar ved framstilling av et ultralydkontrastmiddel *karakterisert ved at* nevnte vesikler inneholder svovelheksafluorid eller et fluorert hydrokarbon som er i gassform ved 37 °C, innkapslet av monolag eller ett eller flere dobbeltlag av ikke-proteinholdig amfifilt materiale som ikke omfatter et polymeriserbart aldehyd.

21. Væskedispersjon ifølge krav 20 *karakterisert ved at* de hydrofile delene av det amfifile materiale inneholder en eller flere grupper valgt fra kvarternært ammonium, hydroksyl, karboksy, karboksylation, amid, fosfat, sulfat og sulfonat.

22. Væskedispersjon ifølge krav 21 *karakterisert ved at* de hydrofile delene av det amfifile materiale inneholder triglycerylenheten av et fosfolipid, et jodinert røntgenkontrastmiddel, et karbohydrat, eller en cholin-, etanolamin-, serin- eller glycerol-rest.

23. Væskedispersjon ifølge et av kravene 20 til 22 *karakterisert ved at* de hydrofile delene av det amfifile materiale inneholder en polyoksyetylenglykol-rest som kan være foretret.

24. Væskedispersjon ifølge krav 20 *karakterisert ved at* det amfifile materiale inneholder et fosfolipid.

25. Væskedispersjon ifølge et av kravene 20 til 24 *karakterisert ved at* vesiklene har en midlere størrelse på 0,1-10 μm, foretrukket 1- 7 μm.

26. Framgangsmåte for framstilling av et ultralydkontrastmiddel *karakterisert ved at* en væskedispersjon av vesikler som inneholder inneholder svovelheksafluorid eller et fluorert hydrokarbon som er i gassform ved 37 °C, innkapslet av monolag eller ett eller flere dobbeltlag av ikke-proteinholdig amfifilt materiale som ikke omfatter et polymeriserbart aldehyd, dannes ved risting eller sonikering av nevnte ikke-proteinholdige amfifile materiale i vann i nærvær av nevnte svovelheksafluorid eller fluorerte hydrokarbon.

27. Olje-i-vann emulsjon som er anvendbar ved framstilling av et ultralydkontrastmiddel *karakterisert ved at* oljefasen av nevnte emulsjon består av et lettfordampelig hydrokarbon innkapslet i monolag eller ett eller flere dobbeltlag av ikke-proteinholdig amfifilt materiale som ikke omfatter et polymeriserbart aldehyd.

28. Olje-i-vann emulsjon ifølge krav 27 *karakterisert ved at* det amfifile materialet omfatter et fosfolipid.