(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 692 22 037 T3** 2004.12.02

(12) Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 576 521 B2**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **692 22 037.2**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP92/00716**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **92 907 161.1**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 92/17213**
(86) PCT-Anmeldetag: **28.03.1992**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **15.10.1992**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **05.01.1994**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **03.09.1997**
(97) Veröffentlichungstag des geänderten Patents beim EPA: **04.02.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **02.12.2004**

(51) Int Cl.[7]: **A61K 49/00**

(30) Unionspriorität:
9106686 28.03.1991 GB

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU, MC, NL, SE

(73) Patentinhaber:
Amersham Health AS, Oslo, NO

(74) Vertreter:
Kinzebach und Kollegen, 81679 München

(72) Erfinder:
KLAVENESS, Jo, N-0276 Oslo, NO; RONGVED, Pal, N-1454 Hellvik, NO; STRANDE, Per, N-0755 Oslo, NO

(54) Bezeichnung: **VERBESSERUNGEN BEI KONTRASTMITTELN**

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Diese Erfindung betrifft neue Kontrastmittel, insbesondere neue gasenthaltende oder gaserzeugende Kontrastmittel zur Verwendung bei der diagnostischen Ultraschallbildgebung.

[0002] Es ist seit langem bekannt, daß die Ultraschallbildgebung ein potentiell wertvolles diagnostisches Hilfsmittel darstellt, beispielsweise für Untersuchungen des Gefäßsystems, insbesondere bei der Kardiographie, und von Kleinstgefäßgewebe. Man hat eine Vielzahl von Kontrastmitteln vorgeschlagen, um die so erhaltenen Schallbilder zu verstärken; dazu zählen Suspensionen fester Partikel, emulgierte Flüssigkeitströpfchen, Gasblasen und eingekapselte Gase oder Flüssigkeiten. Es wird im allgemeinen angenommen, daß leicht komprimierbare Kontrastmittel mit geringer Dichte besonders wirksam hinsichtlich der von ihnen erzeugten akustischen Hintergrundstreuung sind; deshalb wurde der Herstellung von gasenthaltenden und gaserzeugenden Systemen besonderes Interesse entgegengebracht.

[0003] Anfängliche Untersuchungen, die durch intrakardiale Injektion physiologisch verträglicher Substanzen in vivo erzeugte, freie Gasbläschen betrafen, haben die potentielle Wirksamkeit solcher Bläschen als Kontrastmittel in der Echokardiographie belegt. Derartige Techniken sind in der Praxis allerdings durch die kurze Lebenszeit der freien Bläschen stark eingeschränkt. Dementsprechend wurde das Interesse auf Verfahren zur Stabilisierung von Gasbläschen für echokardiographische und andere Ultraschalluntersuchungen, beispielsweise unter Verwendung von Emulgatoren, Ölen, Eindickmitteln oder Zucker, gelenkt.

[0004] Die WO 80/02365 offenbart die Verwendung von Gelatine-eingekapselten Gasmikrobläschen zur Verstärkung von Ultraschallbildern. In den Abmessungen, die zur Verwendung in der Echokardiographie bevorzugt werden (1–10 μm), weisen derartige Mikrobläschen allerdings aufgrund der extremen Dünne der einkapselnden Beschichtung keine angemessene Stabilität auf.

[0005] Die EP-A-0 327 490 offenbart unter anderem Ultraschallkontrastmittel, die ein mikropartikelförmiges, synthetisches, biologisch abbaubares Polymer (beispielsweise einen Polyester einer Hydroxycarbonsäure, ein Polyalkylcyanoacrylat, eine Polyaminosäure, ein Polyamid, ein polyacryliertes Saccharid oder einen Polyorthoester) umfassen, welches ein Gas oder ein leicht verdampfendes Fluid (d. h. mit einem Siedepunkt von weniger als 60°C) in freier oder gebundener Form enthält. Emulgatoren können als Stabilisatoren bei der Herstellung derartiger Mittel eingesetzt werden; solche Emulgatoren weisen jedoch keine chemische Wechselwirkung mit dem Polymer auf.

[0006] Die US-A-4 774 958 offenbart die Verwendung von Mikrobläschendispersionen, die durch Einkapselung in denaturiertem Protein, beispielsweise Humanserumalbumin (HSA), stabilisiert werden. Derartige Systeme erlauben die Herstellung von Mikrobläschensystemen mit einer Größe von beispielsweise 2–5 μm, jedoch noch keine effiziente Visualisierung des linken Herzens und des Myokards.

[0007] Weitere, Proteine als Einkapselungsmittel verwendende Ultraschallkontrastmittel sind in der Literatur beschrieben worden, beispielsweise in der EP 0 359 246 (Molecular Biosystems), US 4,832,941 (Max-Planck Gesellschaft), US 4,844,882 (Molecular Biosystems), WO 84/02838 (Feinstein), US 4,572,203 (Feinstein), EP 0 077 752 (Schering), US 4,747,610 (The Regents of the University of California), WO 80/02365 (Rasor), US 4,774,958 (Feinstein), US 4,718,433 (Feinstein) und EP 0 224 934 (Feinstein).

[0008] Das einzige auf Protein basierende kommerzielle Ultraschallkontrastmittel besteht aus einer Suspension von gasgefülltem Albumin, Albunex®, welches durch Schallbehandlung einer Albuminlösung hergestellt wird.

[0009] Auf Albumin basierende Ultraschallkontrastmittel sind in den folgenden Veröffentlichungen beschrieben:
Feinstein et al. in Circulation 78S, 565 (1988), Reisner et al. in Circulation 78S, 565 (1988), Dick et al. in Circulation 78S, 565 (1988), Armstrong et al. in Circulation 78S, 565 (1988), Desir et al. in Circulation 78S, 566 (1988), Heidenreich et al. in Circulation 78S, 566 (1988), Keller et al. in Circulation 78S, 567 (1988), Barnhart et al. in Contrast Media Research (1989), Silverman et al. in Circulation 80S, 369 (1989), Silverman et al. in Circulation 80S, 349 (1989), Segar et al. in Clin. Res. 37, 294 (1989), Heidenreich et al. in Circulation 80S, 370 (1989), Reiser et al. in Circulation 80S, 370 (1989), Heidenreich et al. in Circulation 80S, 566 (1989), Shandas et al. in Circulation 82, 95 (1990), Geny et al. in Circulation 82, 95 (1990), Ten-Cate et al. in Eur Heart J. 19, 389 (1989), Feinstein et al. in Echocardiography 6, 27 (1989), Zotz et al. in Eur Heart J. 11, 261 (1990), Tencate et al. in Eur Heart J. 11, 261 (1990), Barnhart et al. in Invest Radiol 25S, 162 (1990), Keller et al. in J. Am Soc Echo 2, 48 (1989), Bleeker et al. in J. Acoust Soc Am 87, 1792 (1990), Feinstein et al. in J. Am. Coll. Cardiol 16, 316 (1990), Kaul et al. in J. Am Coll. Cardiol 15, 195 (1990), Bleeker et al in J. Ultrasound Med 9, 461 (1990), Hilpert et al. in Radiology 173, 361 (1989), und Shapiro et al. in J. Am. Coll. 16, 1603 (1990).

[0010] Wie oben erläutert sind die auf gasgefüllten

Proteinmikrosphären basierenden Ultraschallkontrastmittel allerdings in vivo instabil und es läßt sich noch manches verbessern. Segar et al. sind in Advances in Echocardiography (September 21–22 – 1989) zu der Schlußfolgerung gelangt, daß Charge, Mischdruck, Mischzeit und Medium den mit solchen auf Protein basierenden Produkten erhaltenen Kontrast des linken Vorhofs beeinflussen.

[0011] Feinstein et al. haben in J. Am. Coll. Cardiol. 16, 316 (1990) veröffentlicht, daß ungeachtet der Dosisgruppe, im rechten Ventrikel in 88% der Injektionen und im linken Ventrikel in 63% der Injektionen mit Albuminmikrosphären eine Opazität der Höhle auftrat. Shandas et al. haben in Circulation 82, 95 (1990) Fragen im Hinblick auf die mit dem Druck zusammenhängende Stabilität gasgefüllter Albuminmikrosphären aufgeworfen und Shapiro et al. haben kürzlich in J. Am. Coll. Cardiol. 16, 1603 (1990) das Fehlen einer myokardialen Ultraschallkontrastverstärkung nach Verabreichung von schallbehandeltem Albumin veröffentlicht.

[0012] Feinstein hat in der EP 0 224 934 auf den Seiten 4 und 8 und in Anspruch 9, in der US 4,718,433 in den Spalten 3 und 5 und in der US 4,774,958 in den Spalten 3 und 5 zur Stabilisierung von Albumingasblasen eine chemische Denaturierung vorgeschlagen:
"Die aus 5% Albumin gebildeten Mikrobläschen können andererseits zur Bildung eines kommerziell und klinisch brauchbaren Kontrastmittels stabilisiert werden, indem man eine Behandlung mit verschiedenen chemischen Mitteln vornimmt, die das Protein oder Derivate davon chemisch denaturieren oder "fixieren". Eine chemische Denaturierung des Proteins (oder der Derivate) kann erreicht werden, indem man das Protein mit einem gegenüber Protein reaktiven Aldehyd, wie Glutaraldehyd, bindet. Bei der letztgenannten Vorgehensweise zur Stabilisierung des erfundenen Mikrobläschenkontrastmittels, können die Mikrobläschen mit 0,25 g von 50%igem wäßrigem Glutaraldehyd pro Gramm Protein 6 Stunden bei pH 4,5 umgesetzt werden. Das behandelte Kontrastmittel wird dann schonend und ausgiebig gewaschen, um möglichst viel des nicht umgesetzten Glutaraldehyds zu entfernen."

[0013] Zahlreiche denaturierende Chemikalien oder quervernetzende Mittel für Proteine sind in der Literatur beschrieben worden. (Siehe beispielsweise Methods Enzymol. 172, 584 (1989) und Chemical Reagents for Protein Modification, Volume II, Seite 123, – CRC Press Inc.).

[0014] Es ist allerdings wichtig, daß ein Kontrastmittel aus dem Individium kurze Zeit nach Anwendung, d. h. vorzugsweise mit einer Halbwertszeit von nicht mehr als 48 Stunden, rasch eliminiert wird. Eine Quervernetzung mit Glutaraldehyd oder Formaldehyd muß nicht immer ein angemessenes Gleichgewicht zwischen Stabilität während der Ultraschallvisualisierung und rascher Eliminierung in wirksamer Weise herbeiführen. Das Protein selbst, nämlich Humanserumalbumin, wird nicht rasch durch vaskuläre Enzyme abgebaut und Reagenzien, wie Glutaraldehyd, bilden keine leicht biologisch abbaubaren Bindungen mit dem Protein.

[0015] Die vorliegende Erfindung basiert unter anderem auf dem Konzept, die Proteinschalen von gas- oder gasvorstufenenthaltenden Mikrobläschen, im folgenden als "Mikrosphären" bezeichnet, querzuvernetzen, wobei quervernetzende Gruppen eingeführt werden, die biologisch abbaubare Bindungen enthalten, so daß Ultraschallkontrastmittel mit angemessener Stabilität für die Dauer der Ultraschallvisualisierung aber ausreichender biologischer Abbaubarkeit zur raschen anschließenden Eliminierung bereitgestellt werden.

[0016] Gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden daher Kontrastmittel zur Verwendung bei diagnostischen Ultraschalluntersuchungen bereitgestellt, die Mikrosphären mit Gas oder einer Gasvorstufe, eingekapselt in einer Proteinschale, umfassen, welche dadurch gekennzeichnet sind, daß das Protein mit quervernetzenden Gruppen, die biologisch abbaubare Bindungen enthalten, quervernetzt ist.

[0017] Weitere Ausführungsformen der Erfindung sind in den Ansprüchen definiert.

[0018] Zu biologisch abbaubaren Bindungen, die in erfindungsgemäßen quervernetzten Kontrastmitteln verwendet werden können, zählen Amid-, Imid-, Imin-, Ester-, Anhydrid-, Acetal-, Carbamat-, Carbonat-, Carbonatester- und Disulfidgruppen. Wenigstens eine derartige Gruppe sollte vorzugsweise in der quervernetzenden Gruppe vorhanden sein. Im allgemeinen werden alle Ester und insbesondere diejenigen, die die Gruppen -CO-O- oder -O-CO-O- enthalten, biologisch abbaubar sein. Eine besonders brauchbare Klasse biologisch abbaubarer Estergruppen besitzt die Struktur

$$-(Y)_n\text{-CO-O-C}(R^1R^2)\text{-O-CO-}(Z)_n-$$

(worin Y und Z, die gleich oder verschieden sein können, für -O-, -S- oder $-NR^3-$ stehen; die Symbole n, die gleich oder verschieden sein können, für 0 oder 1 stehen; R^1 und R^2, die gleich oder verschieden sein können, für Wasserstoffatome oder kohlenstoffverknüpfte monovalente Gruppen stehen oder zusammen eine kohlenstoffverknüpfte divalente organische Gruppe bedeuten; und R^3 für ein Wasserstoffatom oder eine organische Gruppe steht). Y und Z stehen vorzugsweise für -O-. Im allgemeinen zersetzen sich derartige Gruppen unter Eliminierung einer Verbin-

dung R^1R^2CO und bilden entweder Carboxylgruppen am Rest oder können im Falle von Carbonatestern Kohlendioxid eliminieren, so daß Hydroxylgruppen am Rest gebildet werden.

[0019] R^1, R^2 und R^3 können jeweils für eine Hydrocarbyl- oder heterocyclische Gruppe, beispielsweise mit 1–20 Kohlenstoffatomen, stehen, wie z. B. eine Alkyl- oder Alkenylgruppe (vorzugsweise mit bis zu 10 Kohlenstoffatomen), eine Cycloalkylgruppe (vorzugsweise mit bis zu 10 Kohlenstoffatomen), eine Aralkylgruppe (vorzugsweise mit bis zu 20 Kohlenstoffatomen), eine Acylgruppe (vorzugsweise mit bis zu 20 Kohlenstoffatomen) oder eine heterocyclische Gruppe mit bis zu 20 Kohlenstoffatomen oder einem oder mehreren, aus O, S und N ausgewählten Heteroatomen; eine derartige Hydrocarbyl- oder heterocyclische Gruppe kann eine oder mehrere funktionelle Gruppen, wie Halogenatome oder Gruppen der Formeln $-NR^4R^5$, $-CONR^4R^5$, $-OR^6$, $-SR^6$ und $-COOR^7$ tragen, worin R^4 und R^5, die gleich oder verschieden sein könne, für Wasserstoffatome, Acylgruppen oder Hydrocarbylgruppen, wie für R^1 und R^2 definiert, stehen; R^6 für ein Wasserstoffatom oder eine Acylgruppe oder eine wie für R^1 und R^2 definierte Gruppe steht und R^7 für ein Wasserstoffatom oder eine wie für R^1 und R^2 definierte Gruppe steht; stehen R^1 und R^2 für eine divalente Gruppe, kann es sich beispielsweise um eine Alkylen- oder Alkenylengruppe (vorzugsweise mit bis zu 10 Kohlenstoffatomen) handeln, die eine oder mehrere, wie oben definierte, funktionelle Gruppen tragen kann. Im allgemeinen stehen R^1 und R^2 vorzugsweise für Wasserstoff oder kleine Gruppen, wie C_{1-4}-Alkylgruppen.

[0020] Bei der Proteinkomponente kann es sich um ein beliebiges Protein oder Derivat davon einschließlich Polyaminosäuren handeln. Albumin, Gelatine und γ-Globulin stellen repräsentative Verbindungen dar. Das Protein, beispielsweise Albumin, kann aus biologischen Quellen, beispielsweise aus menschlichem oder tierischem Blut, erhalten werden oder von einem niederen Organismus unter Verwendung rekombinanter Technologie hergestellt werden. Ein typisches Verfahren zur Herstellung von Humanserumalbumin durch Fermentation ist in der WO 90/02808 (Delta Biotechnology Ltd.) beschrieben.

[0021] Erfindungsgemäße quervernetzte Kontrastmittel können nach einem Verfahren hergestellt werden, mit dem man Mikrosphären erzeugt, die Gas oder eine Gasvorstufe, eingekapselt in eine Proteinschale, umfassen, und das Protein mit quervernetzenden Gruppen, die biologisch abbaubare Bindungen enthalten, vor, während oder vorzugsweise nach der Einkapselung quervernetzt.

[0022] Das quervernetzende Mittel kann eine Verbindung der Formel (I)

$$A^1\text{-}X\text{-}A^2 \qquad (I)$$

sein, worin X für eine Linker-Gruppe mit einer oder mehreren, biologisch abbaubaren Bindungen steht und die Gruppen A^1 und A^2, die gleich oder verschieden sein können, für funktionelle Gruppen stehen, die gegenüber Proteinen reaktiv sind.

[0023] Die Gruppe X kann ferner weitere gegenüber Proteinen reaktive Gruppen tragen, um einen noch höheren Quervernetzungsgrad herbeizuführen.

[0024] Die Gruppe X sollte vorzugsweise eine Kettenlänge von nicht mehr als 30 Atomen aufweisen.

[0025] Die Gruppe X kann somit die Form

$$-R^8\text{-}E\text{-}R^9\text{-}$$

haben, worin R^8 und R^9, die gleich oder verschieden sein können, für divalente organische Gruppen, beispielsweise Alkylen- oder Alkylidengruppen mit 1–12 Kohlenstoffatomen, stehen, welche Gruppen, die gegenüber Proteinen reaktiv sind, und/oder ferner inerte Gruppen tragen können, und die Gruppe E für eine Estergruppe, beispielsweise der Formel -O-CO-, -O-CO-C- oder $-(Y)_n\text{-CO-O-C}(R^1R^2)\text{-O-CO-}(Z)_n-$, wie oben definiert, steht.

[0026] Quervernetzende Mittel der Formel

$$A^1\text{-}R^8\text{-}(Y)_n\text{-CO-O-C}(R^1R^2)\text{-O-CO-}(Z)_n\text{-}R^9\text{-}A^2$$

worin A^1, A^2, R^1, R^2, R^8, R^9, n, Y und Z obige Bedeutungen besitzen, können hergestellt werden, indem man eine Säure der Formel $A^1\text{-}R^8\text{-}(Y)_n\text{-CO-OH}$ oder eine Form davon, worin A^1 und jede andere reaktive Gruppe geschützt ist (oder ein funktionelles Derivat davon), mit einer Verbindung der Formel $L^1\text{-}C(R^1R^2)\text{-}L^2$, worin L^1 für eine Abgangsgruppe, wie ein Halogenatom oder Mesyloxy oder Tosyloxy, steht und L^2 für eine wie für L^1 definierte Gruppe (was zu einem symmetrischen Diester führt) oder eine Gruppe der Formel $-O\text{-CO-}(Z)_n\text{-}R^9\text{-}A^2$ oder eine geschütze Form davon steht, umsetzt und gegebenenfalls anschließend Schutzgruppen entfernt. Das funktionelle Derivat der Säure kann beispielsweise ein Salz, z. B. das Kaliumsalz sein. Die Umsetzung wird üblicherweise in Lösung durchgeführt, beispielsweise in einem polaren Lösungsmittel, wie Dimethylformamid. Schutzgruppen für A^1 und A^2 sind dem Fachmann bekannt. Zu bevorzugten Schutzgruppen für Aldehyde gehören Acetale, z. B. cyclische Acetale, wie Dioxolan.

[0027] Die Verbindung $L^1\text{-}C(R^1R^2)\text{-O-CO-}(Z)_n\text{-}R^9\text{-}A^2$, worin L^1 für Halogen steht, kann aus $R^1R^2\text{-CO}$ durch Umsetzung mit einer Verbindung der Formel $Hal\text{-CO-}(Z)_n\text{-}R^9\text{-}A^2$ (worin Hal für ein Halogenatom steht) in Gegenwart einer Base, wie Pyridin, herge-

stellt werden.

[0028] Abgesehen von den bevorzugten Aldehydgruppen kann es sich bei den Gruppen A^1 und A^2 um aktivierte Carboxylgruppen handeln, wie N-Hydroxysuccinimidylgruppen (insbesondere sulfonierte N-Hydroxysuccinimidylderivate mit erhöhter Wasserlöslichkeit), Imidoester, Halonitroarylgruppen, Nitrenvorstufen, wie Azidophenyl, Carbenvorstufen, Ketongruppen, Isothiocyanatgruppen etc.

[0029] Jedes biokompatible Gas kann in den erfindungsgemäßen Kontrastmitteln eingesetzt werden, wobei der hier verwendete Ausdruck "Gas" jede Substanz umfaßt, die bei 37°C gasförmig ist. Zu repräsentativen Gasen gehören Luft, Stickstoff, Sauerstoff, Wasserstoff, Distickstoffoxid, Kohlendioxid, Helium, Argon, Schwefelhexafluorid und gegebenenfalls fluorierte Kohlenwasserstoffe mit niedrigem Molekulargewicht, die bei 37°C gasförmig sind, wie Methan, Acetylen oder Tetrafluorkohlenstoff. Die Gase können in den Mikrosphären frei vorliegen oder in einer aufnehmenden Substanz eingeschlossen sein oder mitgeführt werden.

[0030] Zu den Gasvorstufen zählen Carbonate und Bicarbonate, z. B. Natrium- oder Ammoniumbicarbonat, und Aminomalonatester.

[0031] Um bei echokardiographischen Anwendungen den freien Durchtritt durch das Lungensystem zuzulassen und Resonanz mit der bevorzugten Bildgebungsfrequenz von etwa 0,1–15 Mhz zu erhalten, kann es zweckmäßig sein, Mikrosphären mit einer mittleren Größe von 0,1–10 µm, z. B. 1–7 µm, zu verwenden. Wesentlich größere Sphären, z. B. mit mittleren Größen von bis zu 500 µm, können allerdings in anderen Anwendungen, beispielsweise der gastrointestinalen Bildgebung oder Untersuchungen des Uterus oder der Tuba uterina, brauchbar sein.

[0032] Wie oben erläutert, können die Mikrosphären stabilisiert werden, indem man ein partikelförmiges Material zusammen mit dem eingekapselten Gas einbringt. Zu derartigen Partikeln zählen beispielsweise Siliciumdioxid und Eisenoxid. Die bevorzugte Partikelgröße derartiger stabilisierender Partikel liegt im Bereich von 1 bis 500 nm, je nach Größe der Mikrosphären. Die Partikel sollten so beschaffen sein, daß sie nur teilweise durch das zur Dispergierung der Micellen verwendete fluide Medium benetzt werden, d. h. der Kontaktwinkel zwischen dem Partikelmaterial und dem Fluid sollte etwa 90° betragen.

[0033] Die stabilisierenden Partikel können funktionelle Gruppen tragen, die mit dem Protein unter Bildung kovalenter oder anderer Bindungen wechselwirken. Kolloidale Siliciumdioxidpartikel können eine Partikelgröße im Bereich von 5–50 nm aufweisen und Silanolgruppen auf der Oberfläche tragen, die in der Lage sind, mit dem Protein durch Wasserstoffbrückenbindung oder Bildung kovalenter Bindungen wechselzuwirken.

[0034] Das Protein kann das Gas oder die Gasvorstufe stabilisieren, indem eine Monoschicht an der Grenzfläche zwischen dem flüssigen Medium und dem Gas- oder Gasvorstufensystem gebildet wird, oder indem Vesikel gebildet werden, die aus einer oder mehreren, molekularen Doppelschichten bestehen, die das Gas oder die Gasvorstufe enthalten.

[0035] Die Stabilisierung des Systems durch Monoschichten oder die Vesikelbildung kann aktiviert werden, indem man – wie vollständig in der Literatur beschrieben – eine Schallbehandlung vornimmt oder sogar das Proteinmaterialgemisch in dem geeignetem Medium schüttelt, oder die Vesikel können durch jedes beliebige herkömmliche Liposom/Vesikel-bildendende Prinzip gebildet werden.

[0036] Die stabilisierten Mikrosphären können getrocknet oder gefriergetrocknet werden, oder die nicht-wäßrige Phase kann verdampft werden. Das resultierende getrocknete System kann in jedem beliebigen, physiologisch verträglichen Lösungsmittel, wie einer Salzlösung oder einem Phosphatpuffer, resuspendiert werden, wobei man gegebenenfalls ein Suspendier- oder Emulgiermittel verwendet.

[0037] Ein gaseinschließendes System kann erhalten werden, indem man eine Gasvorstufe verwendet, oder das Gas selbst kann eingeschlossen werden. Das Gas kann in die amphiphile Mischung auf einfache Weise eingeschlossen werden, indem man das Gemisch in Gegenwart von Luft heftig schüttelt, d. h. eine Gas-in-Flüssigkeit-Emulsion, wie in der US-A-4 684 479 beschrieben, erzeugt. Ein weiteres, gut etabliertes, beispielsweise in der US-A-4 774 958 beschriebenes Verfahren zur Erzeugung einer gashaltigen Blase besteht darin, das Gemisch in Gegenwart von Luft mit Schall zu behandeln. Ein weiteres, hinlänglich bekanntes Verfahren beinhaltet, daß man das Gas durch eine Spritze hindurch in das Gemisch aus Protein und der Flüssigkeit gelangen läßt. Wie in der US-A-3 900 420 beschrieben, kann die Mikrogasemulsion erzeugt werden, indem man eine Vorrichtung zum raschen Einbringen des Gases in eine schnell fließende Flüssigkeit verwendet. Ein Niedrigdruckbereich wird in einer das Proteinmaterial enthaltenden Flüssigkeit erzeugt. Das Gas wird dann in den Niedrigdruckbereich eingebracht und das Gas-in-Flüssigkeit-System wird erhalten, indem die Flüssigkeit durch das System gepumpt wird.

[0038] Durch Verwendung des Elektrolyseprinzips ist es möglich, das einzuschließende Gas direkt in einem das Proteinmaterial enthaltenden Behälter zu erzeugen. Die für die Elektrolyse benötigten Elektrolyte können sogar behilflich sein, das Proteinmaterial

weiter zu stabilisieren. Eine elektrolythaltige wäßrige Lösung kann Wasserstoffgas an der Kathode und Sauerstoff an der Anode erzeugen. Die Elektroden können durch eine Salzbrücke getrennt sein. Gibt man Hydrazin zu, kann Wasserstoffgas an der Anode erzeugt werden. Verwendet man die Kolbe-Reaktion, kann man durch Elektrolyse auch CO_2 aus Carbonsäuren erzeugen.

[0039] Wie oben beschrieben, können Mikrosphären durch Bildung von Liposomen oder Vesikeln, die aus einer oder mehreren Doppelschichten bestehen, erhalten werden. Diese Vesikel können bei erhöhten Druckbedingungen derart gebildet werden, daß das Gas in den Vesikeln eingeschlossen ist.

[0040] Gemäß einer erfindungsgemäßen Vorgehensweise wird die Einkapselung bewirkt, indem man das Protein in einem wäßrigen Medium bewegt oder mit Schall behandelt, was zu einem Proteinschaum führt, der getrocknet und danach in einer Lösung des quervernetzenden Mittels in einem polaren organischen Lösungsmittel (z. B. einem Sulfoxid, wie Dimethylsulfoxid), das in der Lage ist, den Proteinschaum zu benetzen, suspendiert wird.

[0041] Die folgenden Beispiele dienen nur zur Veranschaulichung:

Präparation 1

Methylen-bis-(α-formylacetat)

[0042] Die Herstellung des Ausgangsmaterials, der Dioxalangeschützte Aldehyd Methyl-α-formylacetat, wird von T. Hosokawa et al. J. Org. Chem. Soc. 52, (1987) 1758–1764 beschrieben. Der geschützte Aldehyd (6,0 g, 3,75 mmol) wird mit einem Gemisch aus 2 N wäßrigem Kaliumhydroxid und Tetrahydrofuran 20 : 80 (V/V) bei Rückfluß 8 Stunden behandelt. Der pH-Wert wird mit verdünnter HCl auf 8 eingestellt und das Gemisch zur Trockene eingeengt. Der Feststoff wird mit 100 ml frisch destilliertem und getrocknetem Dimethylformamid vermischt und nach 30 Minuten bei 60°C wird unlösliches Material abfiltriert. Dijodmethan (150 µl, 1,87 mmol) wird tropfenweise in 5 Minutgen zu der Lösung bei 60°C, wie in der WO 89/00988 auf Seite 13 (NYCOMED AS) beschrieben, gegeben. Nach 4-tägigem Rühren wird der Niederschlag abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Dioxolan-Schutzgruppe wird wie von P. A. Grieco et al. J. Am Chem. Soc. 99, (1977) 5773–5780 beschrieben entfernt, der Rückstand wird in Tetrahydrofuran (60 ml) gelöst, 5%ige wäßrige HCl (20 ml) wird zugegeben und das Gemisch wird 20 Stunden bei Normaltemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird unter vermindertem Druck zur Trockene eingeengt, was die Titelverbindung ergibt.

Präparation 2

Methylendimethacrylat

[0043] Eine Lösung von Kaliumhydroxid (1,00 M, 40,00 ml) wird zu Methacrylsäure (3,44 g, 40,00 mmol) bei 0°C gegeben und die Lösung 16 Stunden gefriergetrocknet. Trockenes Dimethylformamid (230 ml) wird zugegeben und die Suspension auf 60°C unter einer trockenen Stickstoffatmosphäre erhitzt. Dijodmethan (1,61 ml, 20,00 mmol) wird in zwei Portionen in 10 Minuten zugegeben und die Reaktionsmischung 4 Tage bei 60°C gehalten. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck (0,05 mmHg) entfernt, bevor Diethylether (140 ml), gesättigtes wäßriges Natriumhydrogencarbonat (50 ml) und Wasser (50 ml) zugegeben werden. Die wäßrige Schicht wird mit Diethylether (6 × 60 ml) extrahiert und die vereinigten Etherextrakte mit Wasser (4 × 50 ml) gewaschen, getrocknet ($MgSO_4$) und verdampft, was 2,63 g (72%) der Titelverbindung ergibt. ^{1}H-NMR (60 MHz, $CDCl_3$): δ 1,97 (2 × CH_3, m), 5,63 (2 × H-C=, m), 5,88 (CH_2, s), 6,18 (2 × H-C=, m). IR (film, cm^{-1}): 2987 (w), 2962 (w), 2930 (w), 1732 (str), 1638 (w), 1454 (w), 1315 (w), 1295 (w), 1158 (w), 1100 (str), 1012 (m), 989 (m). Dieses Produkt kann erfindungsgemäß verwendet werden, beispielsweise zur Quervernetzung von Acrylamidpolymeren.

Präparation 3

Methylendiacrylat

[0044] Eine Lösung von Kaliumhydroxid (1,00 M, 40,00 ml) wird zu Acrylsäure (2,88 g, 40,00 mmol) bei 0°C gegeben und die Lösung 16 Stunden gefriergetrocknet. Trockenes Dimethylformamid (200 ml) wird zugegeben und die Suspension auf 60°C unter einer trockenen Stickstoffatmosphäre erhitzt. Dijodmethan (1,61 ml, 20,00 mmol) wird in zwei Portionen in 10 Minuten zugegeben und die Reaktionslösung 4 Tage bei 60°C gehalten. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck (0,05 mmHg) entfernt, bevor Diethylether (140 ml), gesättigtes wäßriges Natriumhydrogencarbonat (50 ml) und Wasser (50 ml) zugegeben werden. Die wäßrige Schicht wird mit Diethylether (6 × 60 ml) extrahiert und die vereinigten Etherextrakte mit Wasser (4 × 50 ml) gewaschen, getrocknet ($MgSO_4$) und verdampft, was 1,06 g (34%) der Titelverbindung ergibt. ^{1}H-NMR (60 MHz, $CDCl_3$): δ 5,81–6,61 (2 × CH_2=CH-, m), 5,84 (CH_2, s). Dieses Produkt kann erfindungsgemäß verwendet werden, beispielsweise zur Quervernetzung von Acrylsäure- und Methylacrylatpolymeren.

Präparation 4

Chlormethyl-(2-methacryloyloxy)-ethylcarbonat

[0045] Pyridin (0,89 ml, 11,00 mmol) wird tropfen-

weise zu einer Lösung von Chlormethylchlorformiat (0,89 ml, 11,00 mmol) und 2-Hydroxyethylmethcrylat (1,22 ml, 10,00 mmol) in Dichlormethan (12 ml) bei 0°C unter einer trockenen Stickstoffatmosphäre gegeben. Nach 21 Stunden bei 20°C wird die Reaktionsmischung mit Chlorwasserstoffsäure (1,00 M, 10 ml), gesätitgtem wäßrigem Natriumhydrogencarbonat (10 ml) und Wasser (10 ml) gewaschen. Die organische Phase wird getrocknet ($MgSO_4$) und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck (10 mmHg) verdampft, was 1,97 g (88%) der Titelverbindung ergibt. ^{1}H-NMR (60 MHz, $CDCl_3$): δ 1,88 (CH_3, d, J = 2 Hz), 4,35 (O-CH_2-CH_2-O, m), 5,47 (H-C=, m), 5,63 (CH_2-Cl), s), 6,00 (H-C=, m).

Präparation 5

(2-Methacryloyloxy)-ethylmethacryloyloxymethylcarbonat

[0046] Eine Lösung von Kaliumhydoxid (1,00 M, 5,00 ml) wird zu Methacrylsäure (0,43 g, 5,00 mmol) bei 0°C gegeben und die Lösung 16 Stunden gefriergetrocknet. Trockenes Dimethylformamid (50 ml) wird zugegeben und zu der resultierenden Suspension wird Chlormethyl-(2-methacryloyloxy)-ethylcarbonat (1,11 g, 5,00 mmol) gegeben. 18-Krone-6 (0,066 g, 0,25 mmol) wird als Katalysator zugegeben und die Reaktion unter einer trockenen Stickstoffatmosphäre gehalten. Nach 24 Stunden bei 20°C und 6 Tagen bei 4°C werden das Lösungsmittel unter vermindertem Druck (0,05 mmHg) entfernt und Diethylether (30 ml) und Wasser (20 ml) zugegeben. Die wäßrige Schicht wird mit Diethylether (3 × 20 ml) extrahiert und die vereinigten Etherextrakte mit Wasser (20 ml) gewaschen, getrocknet ($MgSO_4$) und verdampft, was 1,26 g (93%) der Titelverbindung ergibt. ^{1}H-NMR (60 MHz, $CDCl_3$): δ 1,97 (2 × CH_3, m), 4,38 (O-CH_2-CH_2-O, m), 5,53 (2 × H-C=, m), 5,77 (CH_2, s), 6,07 (2 × H-C=, m).

Präparation 6

Ethylen-bis(chlormethylcarbonat)

[0047] Pyridin (0,89 ml, 11,00 mmol) wird tropfenweise zu einer Lösung von Chlormethylchlorformiat (1,32 ml, 14,83 mmol) und Ethylenglykol (0,28 ml, 5,00 mmol) in Dichlormethan (10 ml) bei 7°C und starkem Rühren unter einer trockenen Stickstoffatmosphäre gegeben. Nach 15 Minuten bei 7°C und 6 Stunden bei 20°C wird die Reaktionsmischung mit Hilfe von Dichlormethan (10 ml) in einen Scheidetrichter überführt. Die Reaktionsmischung wird mit Chlorwasserstoffsäure (1,00 M, 10 ml), gesättigtem wäßrigem Natriumhydrogencarbonat (10 ml) und Wasser (10 ml) gewaschen. Die organische Phase wird getrocknet ($MgSO_4$) und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck verdampft, was 1,12 g (90%) der Titelverbindung ergibt. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 4,48 (s, O-CH_2CH_2-O), 5,75 (s, 2 × Cl-CH_2-O). ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 65,8 (O-CH_2CH_2-O), 72,2 (2 × Cl-CH_2-O), 153,0 (2 × C=O).

Präparation 7

Bis-(2-chlormethoxycarbonyloxyethyl)ether

[0048] Pyridin (0,89 ml, 11,00 mmol) wird tropfenweise zu einer Lösung von Chlormethylchlorformiat (1,32 ml, 14,83 mmol) und Diethylenglykol (0,47 ml, 5,00 mmol) in Dichlormethan (10 ml) bei 7°C und starkem Rühren unter einer trockenen Stickstoffatmosphäre gegeben. Nach 10 Minuten bei 7°C und 6 Stunden bei 20°C wird die Reaktionsmischung mit Hilfe von Dichlormethan (10 ml) in einen Scheidetrichter überführt. Die Reaktionsmischung wird mit Chlorwasserstoffsäure (1,00 M, 10 ml), gesättigtem wäßrigem Natriumhydrogencarbonat (10 ml) und Wasser (10 ml) gewaschen. Die organische Phase wird getrocknet ($MgSO_4$) und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck verdampft, was 1,26 g (86%) der Titelverbindung ergibt. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 3,72 (m, 2 × CH_2-O), 4,34 (m, 2 × CH_2-O-C=O), 5,71 (s, 2 × Cl-CH_2-O). ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 67,6 (2 × CH_2-O), 68,5 (2 × $\underline{C}H_2$-O-C=O), 72,1 (2 × Cl-CH_2-O), 153,2 (2 × C=O).

Präparation 8

1-Chlorethyl-2-methacryloyloxyethylcarbonat

[0049] Pyridin (0,89 ml, 11,00 mmol) wird tropfenweise zu einer Lösung von 1-Chlorethylchlorformiat (1,20 ml, 11,00 mmol) und 2-Hydroxyethylmethacrylat (1,22 ml, 10,00 mmol) in Dichlormethan (12 ml) bei 3°C unter einer trockenen Stickstoffatmosphäre gegeben. Nach 15 Minuten bei 3°C und 17 Stunden bei 20°C wird die Reaktionsmischung mit Hilfe von Dichlormethan (10 ml) in einen Scheidetrichter überführt. Die Reaktionsmischung wird mit Chlorwasserstoffsäure (1,00 M, 10 ml), gesättigtem wäßrigem Natriumhydrogencarbonat (10 ml) und Wasser (2 × 10 ml) gewaschen. Die organische Phase wird getrocknet ($MgSO_4$) und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck verdampft, was 1,76 g (74%) der Titelverbindung ergibt. ^{1}H-NMR (60 MHz, $CDCl_3$): δ 1,85 (3H, d, J = 6 Hz, C$\underline{H}_3$-CH), 1,96 (3H, d, J = 2 Hz, CH_3-C=), 5,55 (1H, m, CH=), 6,10 (1H, m, CH=), 6,38 (1H, k, J = 6 Hz, C$\underline{H}$-CH_3).

Präparation 9

Chlormethyl-4-acryloyloxybutylcarbonat

[0050] Pyridin (0,89 ml, 11,00 mmol) wird tropfenweise zu einer Lösung von Chlormethylchlorformiat (0,98 ml, 11,00 mmol) und 4-Hydroxybutylacrylat (1,38 ml, 10,00 mmol) in Dichlormethan (12 ml) bei 3°C unter einer trockenen Stickstoffatmosphäre ge-

geben. Nach 15 Minuten bei 3°C und 17 Stunden bei 20°C wird die Reaktionsmischung mit Hilfe von Dichlormethan (10 ml) in einen Scheidetrichter überführt. Die Reaktionsmischung wird mit Chlorwasserstoffsäure (1,00 M, 10 ml), gesättigtem wäßrigem Natriumhydrogencarbonat (10 ml) und Wasser (2 × 10 ml) gewaschen. Die organische Phase wird getrocknet ($MgSO_4$) und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck verdampft, was 1,76 g (74%) der Titelverbindung ergibt. ^{1}H-NMR (60 MHz, $CDCl_3$): δ 1,82 (4H, m, CH_2-CH_2), 4,27 (4H, m, 2 × CH_2-O), 5,77 (2H, s, Cl-CH_2-O), 5,8–6,7 (3H, m, CH=CH_2).

Präparation 10

1-Chlorethyl-4-acryloyloxybutylcarbonat

[0051] Pyridin (0,89 ml, 11,00 mmol) wird tropfenweise zu einer Lösung von Chlorethylchlorformiat (1,20 ml, 11,00 mmol) und 4-Hydroxybutylacrylat (1,38 ml, 10,00 mmol) in Dichlormethan (12 ml) bei 3°C unter einer trockenen Stickstoffatmosphäre gegeben. Nach 15 Minuten bei 3°C und 17 Stunden bei 20°C wird die Reaktionsmischung mit Hilfe von Dichlormethan (10 ml) in einen Scheidetrichter überführt. Die Reaktionsmischung wird mit Chlorwasserstoffsäure (1,00 M, 10 ml), gesättigtem wäßrigem Natriumhydrogencarbonat (10 ml) und Wasser (2 × 10 ml) gewaschen. Die organische Phase wird getrocknet ($MgSO_4$) und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck verdampft, was 2,26 g (90%) der Titelverbindung ergibt. ^{1}H-NMR (60 MHz, $CDCl_3$): δ 1,80 (4H, m, CH_2-CH_2), 1,86 (3H, d, J = 5 Hz, CH_3), 4,24 (4H, m, 2 × CH_2-O), 5,7–6,6 (4H, m, CH=CH_2 und CH).

Präparation 11

1-Methacryloyloxyethyl-2-methacryloyloxyethylcarbonat

[0052] 1-Chlorethyl-2-methacryloyloxyethylcarbonat (1,183 g, 5,00 mmol), das wie in Präparation 8 beschrieben hergestellt worden ist, wird zu einer Suspension von gefriergetrocknetem Kaliummethacrylat (0,683 g, 5,50 mmol) und 18-Krone-6 (0,066 g, 0,25 mmol) in Dimethylformamid (50 ml) unter einer trockenen Stickstoffatmosphäre gegeben. Nach 5 Tagen bei 20°C wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand durch Zugabe von Dichlormethan (60 ml) und Wasser (30 ml) gelöst. Nach dem Trennen der Phasen wird die wäßrige Schicht mit Dichlormethan (3 × 30 ml) extrahiert und die vereinigte organische Phase mit gesättigtem wäßrigem Natriumhydrogencarbonat (50 ml) gewaschen. Die organische Phase wird getrocknet ($MgSO_4$) und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, was 1,10 g (77%) der Titelverbindung ergibt. ^{1}H-NMR (60 MHz, $CDCl_3$): δ 1,63 (3H, d, J = 5 Hz, C<u>H</u>$_3$-CH), 1,98 (6H, s, 2 × CH_3), 4,42 (4H, s, O-CH_2-CH_2-O), 5,62 (2H, m, CH=), 6,15 (2H, m, CH=), 6,84 (1H, k, J = 5 Hz, C<u>H</u>-CH_3).

Präparation 12

Acryloyloxymethyl-4-acryloyloxybutylcarbonat

[0053] Chlormethyl-4-acryloyloxybutylcarbonat (1,183 g, 5,00 mmol), das wie in Präparation 9 beschrieben hergestellt worden ist, wird zu einer Suspension von gefriergetrocknetem Kaliumacrylat (0,606 g, 5,50 mmol) und 18-Krone-6 (0,066 g, 0,25 mmol) in Dimethylformamid (50 ml) unter einer trockenen Stickstoffatmosphäre gegeben. Nach 5 Tagen bei 20°C wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand durch Zugabe von Dichlormethan (60 ml) und Wasser (30 ml) gelöst. Nach dem Trennen der Phasen wird die wäßrige Schicht mit Dichlormethan (3 × 30 ml) extrahiert und die vereinigte organische Phase mit gesättigtem wäßrigem Natriumhydrogencarbonat (50 ml) gewaschen. Die organische Phase wird getrocknet ($MgSO_4$) und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, was 1,24 g (91%) der Titelverbindung ergibt. ^{1}H-NMR (60 MHz, $CDCl_3$): δ 1,82 (4H, m, CH_2-CH_2-CH_2), 4,23 (4H, m, 2 × CH_2-O), 5,88 (2H, s, O-CH_2-O), 5,7–6,8 (6H, 2 × CH=CH_2).

Präparation 13

1-Acryloyloxyethyl-4-acryloyloxybutylcarbonat

[0054] 1-Chlorethyl-4-acryloyloxybutylcarbonat (1,253 g, 5,00 mmol), das wie in Präparation 10 beschrieben hergestellt worden ist, wird zu einer Suspension von gefriergetrocknetem Kaliumacrylat (0,606 g, 5,50 mmol) und 18-Krone-6 (0,066 g, 0,25 mmol) in Dimethylformamid (50 ml) unter einer trockenen Stickstoffatmosphäre gegeben. Nach 5 Tagen bei 20°C wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand durch Zugabe von Dichlormethan (60 ml) und Wasser (30 ml) gelöst. Nach dem Trennen der Phasen wird die wäßrige Schicht mit Dichlormethan (3 × 30 ml) extrahiert und die vereinigte organische Phase mit gesättigtem wäßrigem Natriumhydrogencarbonat (50 ml) gewaschen. Die organische Phase wird getrocknet ($MgSO_4$) und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, was 1,28 g (89%) der Titelverbindung ergibt. ^{1}H-NMR (60 MHz, $CDCl_3$): δ 1,58 (3H, d, J = 5 Hz, C<u>H</u>$_3$-CH), 1,80 (4H, m, CH_2-CH_2), 4,24 (4H, m, 2 × CH_2-O), 5,7–6,7 (6H, m, 2 × CH=CH_2), 6,87 (1H, k, J = 5 Hz, C<u>H</u>-CH_3).

Präparation 14

a) Methylen-bis-(3,3-dimethoxypropionat)

[0055] Cäsium-3,3-dimethoxpropionat (19,95 g, 75 mmol) wird zu trockenem DMF (1000 ml) gegeben.

Dijodmethan (10,04 g, 37,5 mmol) wird zu der Suspension gegeben und die Reaktionsmischung 2 Tage bei 60°C unter einer trockenen Stickstoffatmosphäre gerührt. DMF wird unter vermindertem Druck entfernt (0,01 mmHg). Diethylether (500 ml) wird zu dem Rückstand gegeben, welcher dann mit gesättigtem wäßrigem Natriumhydrogencarbonat (250 ml) gewaschen wird. Die wäßrige Schicht wird mit Diethylether (5 × 75 ml) extrahiert. Die vereinigten Etherextrakte werden mit Wasser (2 × 100 ml) gewaschen, getrocknet ($MgSO_4$) und verdampft, was 7,1 g (72%) des Produktes ergibt. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 2,61 (CH_2, d), 3,26 (CH_3, s).

b) Methylen-bis-(3-methoxypropenoat)

[0056] Methylen-bis(3,3-dimethoxypropionat) (14,01 g, 50 mmol), welches wie oben unter (a) beschrieben hergestellt worden ist, und eine katalytische Menge von p-Toluolsulfonsäure werden zu Toluol (250 ml) gegeben. Das Methanol wird entfernt, indem man die Reaktionsmischung unter einer Stickstoffatmosphäre erwärmt. Wenn die Reaktion beendet ist, wird das Toluol unter vermindertem Druck abdestilliert. Diethylether (250 ml) wird zugegeben und die Mischung mit gesättigtem wäßrigem Natriumhydrogencarbonat (5 × 50 ml) und Wasser (3 × 50 ml) gewaschen. Die organische Phase wird vor dem Verdampfen getrocknet ($MgSO_4$), was 8,52 g (79%) des Produktes ergibt. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 3,65 (2 × CH_3, s), 5,2 (2 × CH, d), 5,8 (O-CH_2-O), 7,65 (2 × CH_2, d).

Präparation 15

a) Methylen-bis-(10-undecenoat)

[0057] 10-Undecylensäure (12,75 g, 75 mmol) wird in 100 ml Wasser gelöst. Cäsiumcarbonat (13,04 g, 40 mmol) wird zu der Mischung gegeben. Das Wasser wird unter vermindertem Druck entfernt und das Salz 2 Stunden im Vakuum getrocknet. Das Cäsiumsalz wird mit 150 ml DMF gemischt und Dijodmethan zu der Lösung gegeben. Die Reaktion wird 3 Tage bei 60°C unter einer Stickstoffatmosphäre gerührt. DMF wird dann unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird auf Silikagel mit Hexan/Ethylacetat (8 : 2) als Elutionsmittel gereinigt. Das Lösungsmittel wird verdampft, was 7,18 g (54%) des Produktes ergibt. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1,2–1,4 (10 × CH_2, m), 1,6 (2 × CH_2, m), 2,0 (2 × CH_2, m), 2,19 (2 × CH_2, t), 4,9 (2 × H_2C=, m), 5,88 (O-CH_2-O, s), 5,9 (2 × HC=, m). ^{13}C-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 24,92–33,98 (8 × CH_2), 79,04 (O-CH_2-O), 114,18 (=CH_2), 139,11 (=CH), 172,48 (C=O).

b) Methylen-bis-(10-epoxyundecanoat)

[0058] Methylen-bis-(10-undecenoat) (8,8 g, 25 mmol), das wie oben in (a) beschrieben hergestellt worden ist, wird unter einer Stickstoffatmosphäre zu Dichlormethan gegeben und auf 0°C gekühlt. Metachlorperbenzoesäure 55% (15,75 g, 50 mmol) wird zu Dichlormethan (150 ml) gegeben und die organische Schicht wird abgetrennt und getrocknet ($MgSO_4$). Die Metachlorperbenzoesäure wird dann tropfenweise zu dem Diester gegeben. Nach beendeter Zugabe wird die Temperatur auf 25°C erhöht. Nach 5 Stunden ist die Reaktion beendet. Die Mischung wird mit gesättigtem wäßrigem Natgriumsulfit (75 ml) und gesättigtem wäßrigem Natriumhydrogencarbonat (2 × 75 ml) gewaschen. Die organische Schicht wird auf neutralem Aluminiumoxid gereinigt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt, was 8,45 g (82%) des Produktes ergibt. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1,2–1,7 (14 × CH_2, m), 2,35 (2 × CH_2CO, t), 2,45 (2 × CH, q), 2,75 (2 × CH, q), 2,90 (2 × CH, m), 5,75 (O-CH_2-O). ^{13}C-NMR (300 MHz, $CDCl_3$: δ 24,58 (CH_2), 25,99 (CH_2), 28,94 (CH_2), 29,09 (CH_2), 29,32 (2 × CH_2), 32,45 (CH_2), 33,92 (CH_2), 47,06 (CH_2-O), 52,36 (CH-O), 79,06 (O-CH_2-O), 172,2 (C=O).

Präparation 16

Methylen-bis-(4-epoxypentanoat)

[0059] Metachlorperbenzhoesäure (15,68 g, 55%, 50 mmol) wird in Dichlormethan (200 ml) gelöst. Wasser wird abgetrennt und die organische Schicht getrocknet ($MgSO_4$). Die resultierende Metachlorperbonzoesäurelösung wird tropfenweise zu Methylen-bis-(4-pentenoat) (4,10 g, 19 mmol), welches in Dichlormethan (50 ml) gelöst ist, gegeben. Die Mischung wird bei Raumtemperatur unter Stickstoff 12 Stunden gerührt, worauf die Reaktionsmischung mit gesättigter wäßriger Natriumbicarbonatlösung (50 ml) und Wasser (50 ml) gewaschen, getrocknet ($MgSO_4$) und verdampft wird, was 3,61 g (78%) der Titelverbindung als kristallines Produkt ergibt. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1,70–1,85 (2 × CH, m), 1,95–2,10 (2 × CH, m), 2,50–2,55 (2 × CH, 2 × CH_2, m), 2,75 (2 × CH, t), 3,0 (2 × CH, m), 5,8 (O-CH_2-O), s). ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 27 (2 × CH_2), 30 (2 × CH_2), 47 (2 × CH_2), 51 (2 × CH), 79,8 (O-CH_2-O), 171,8 (2 × C=O).

Präparation 17

Methylen-bis-(2-butenoat)

[0060] Vinylessigsäure (4,3 g, 50 mmol) wird zu einer wäßrigen Cäsiumcarbonatlösung (50 ml) gegeben. Die Mischung wird 5 Minuten gerührt und dann verdampft und der Rückstand wird 2 Stunden unter Vakuum getrocknet. Das resultierende Cäsiumsalz und Dijodmethan werden zu Dimethylformamid (200 ml) gegeben und die Mischung 24 Stunden bei 50°C unter Stickstoff gerührt, worauf das Dimethylformamid unter vermindertem Druck entfernt wird. Der

Rückstand wird in Diethylether (100 ml) gelöst und mit gesättigtem wäßrigem Natriumbicarbonat (25 ml) und Wasser (25 ml) gewaschen. Die organische Schicht wird getrocknet ($MgSO_4$) und verdampft, was 1,32 g (29%) des Produktes ergibt. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1,9 (2 × CH_2, m), 5,8–5,9 (2 × CH, m), 5,9 (OCH_2O, s), 7,0–7,1 (2 × CH, m).

Präparation 18

Methylen-bis(chloracetat)

[0061] Chloressigsäureanhydrid (12,75 g, 75 mmol), Paraformaldehyd (2,25 g, 75 mmol) und konzentrierte Schwefelsäure (15 Tropfen) werden zu Dichlormethan (15 ml) gegeben. Die Mischung wird 24 Stunden bei 50°C unter Stickstoff gerührt, worauf die Reaktionsmischung mit gesättigtem wäßrigem Kaliumcarbonat extrahiert wird, bis die Kohlendioxidentwicklung beendet ist. Die organische Schicht wird getrocknet ($MgSO_4$), zur Trockene eingedampft und der Rückstand destilliert (80°C, 0,15 mmHg), was 10,2 g (57%) des Produktes ergibt. ^{1}H-NMR (200 MHz, $CDCl_3$): δ 4,1 (2 × CH_2Cl, s), 5,9 (CH_2, s). ^{13}C-NMR (200 MHz, $CDCl_3$): δ 41,1 (CH_2Cl), 81,4 (O-CH_2-O), 166,4 (CO).

Präparation 19

Methylen-bis-(4-oxopentanoat)

[0062] 4-Oxopentansäure (11,6 g, 100 mmol) wird in Acetonitril (70 ml) gelöst und mit Acetonitril (30 ml) verdünntes 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (15,25 g, 100 mmol) zugegeben. Dijodmethan (13,4 g, 50 mmol) wird auf einmal zugegeben und die Reaktionsmischung unter einer Stickstoffatmosphäre und Rückfluß erhitzt. Nach 2 Stunden zeigt die Gaschromatographie den vollständigen Verbrauch von Dijodmethan an. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das verbleibende braune Öl mit Ethylacetat (200 ml) und Wasser (75 ml) in einen Scheidetrichter überführt. Die organische Phase wird mit 1 M Natriumbicarbonat (25 ml) und Wasser (3 × 25 ml) gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, was die Titelverbindung (10 g) ergibt. ^{1}H-NMR: δ 2,19 (2 × CH_3, s), 2,760–2,804 (2 × CH_2, t), 2,600–2,645 (2 × CH_2, t, 5,735 (CH_2 Brücke, s).

Präparation 20

Methylen-bis(succinimidylazelat)

[0063] 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-hydrochlorid (1,49 g, 7,71 mmol) wird portionsweise zu einer gerührten Lösung von Methylen-bis(hydrogenazelat) (1,00 g, 2,57 mmol) (Beispiel 25) und N-Hydroxysuccinimid (0,89 g, 7,71 mmol) in trockenem Dimethylformamid bei Raumtemperatur gegeben. Nach 20-stündigem Rühren wird die Reaktionsmischung in Eiswasser gegossen, worauf das Produkt als Öl ausfällt. Das farblose Öl wird in Diethylether (50 ml) gelöst, mit Wasser (3 × 10 ml) gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und Hexan (5 ml) zu dem öligen Produkt gegeben. Nach 7-tägiger Lagerung bei 4°C ist das Öl zu einem weißen wachsartigen Feststoff kristallisiert. Ausbeute: 1,50 g (69%). Schmp.: 45–47°C. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 24,42, 24,46, 25,59, 28,48, 28,63, 30,85, 33,82, 79,61, 168,6, 169,30, 172,34.

Präparation 21

Methylen-bis(sulfosuccinimidylazelat)-Natriumsalz

[0064] Methylen-bis(hydrogenazelat) (0,38 g, 1 mmol), N-Hydroxysuccinimid-Natriumsalz (0,48 g, 2,2 mmol) und Dicyclohexylcarbodiimid (0,45 g, 2,2 mmol) werden in Dimethylformamid (10 ml) gelöst. Die Suspension wird über Nacht bei Raumtemperatur unter einer Stickstoffatmosphäre gerührt. Die Reaktionsmischung wird filtriert und durch Umkehrphasenchromatographie (RP-8) mit Wasser/Acetonitril (1 : 1) als Elutionsmittel gereinigt, was die Titelverbindung ergibt.

Präparation 22

a) Methylen-bis-(10,11-dihydroxyundecanoat)

[0065] N-Methylmorpholin-N-oxid (13,5 g, 11 mmol) und Methylen-bis-(10-undecenoat) aus Präparation 15(b) (19 g, 5 mmol) werden in 400 ml einer Mischung aus Tetrahydrofuran und Wasser (3 : 1 V/V) gelöst. Eine katalytische Menge von Osmiumtetroxid wird zugegeben und die Lösung bei Raumtemperatur 20 Stunden gerührt. Eine TLC zeigt den vollständigen Verbrauch des Ausgangsmaterials an. Überschüssiges Natgriumhydrogensulfit und Natriumchlorid werden dann zu der Reaktionsmischung gegeben. Das Produkt wird aus der resultierenden Mischung mit Ethylacetat (400 ml) extrahiert und die Wasserphase mit Ethylacetat (3 × 50 ml) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden getrocknet und verdampft und das Produkt wird aus Tetrahydrofuran umkristallisiert, was 14,5 g (68%) des Produktes als weißer Feststoff ergibt. ^{13}C-NMR (45 MHz, CD_3OD): δ 24,6–34,0 (16 × CH_2), 66,6 (2 × CH_2OH), 72,3 (2 × CHOH), 79,2 (O-CH_2-O), 174,0 (2 × C=O).

b) Methylen-bis-(10-oxodecanoat)

[0066] Methylen-bis-(10,11-dihydroxyundecanoat) (2,24 g, 5 mmol) wird in 150 ml Tetrahydrofuran gelöst. Natriummetaperjodat (2,06 g, 10 mmol) wird in 150 ml Wasser gelöst und tropfenweise zu der Tetrahydrofuranlösung gegeben. Eine TLC zeigt den vollständigen Verbrauch des Diols nach 60 Minuten an,

worauf Natriumchlorid zu der Reaktionsmischung gegeben wird, bis sich die beiden Phasen trennen. Die Wasserphase wird mit Diethylether (3 × 50 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Magnesiumsulfat getrocknet und verdampft, was 1,43 g (74%) der Titelverbindung ergibt. ^{13}C-NMR (45 MHz, $CDCl_3$): δ 21,9–43,9 (16 × CH_2), 79,1 (O-CH_2-O), 173,0 (2 × C=O), 202,6 (2 × CHO).

Beispiel 1

1. Gasgefüllte Albumin-Mikrophären werden in Übereinstimmung mit der EP-A-0359 246 hergestellt und bis zur Homogenität durch schonendes Rollen auf einem Vial-Roller resuspendiert.
2. 25 ml der Suspension werden in einen 25 ml Scheidetrichter gegossen und 30 Minuten stehengelassen. Die unteren 20 ml werden verworfen.
3. Zu den verbleibenden 5 ml werden 20 ml eines Phosphatpuffers (20 mM $NaPO_4$, pH = 7,0) gegeben und die resultierende Suspension wird in ein Vial mit einer Septumkappe überführt.
4. Das Vial wird 5 Minuten mit der Oberseite nach unten bei 170 × g zentrifugiert.
5. Die Lösung unterhalb der Mikrosphärenschicht wird unter Verwendung einer Spritze abgenommen und die Mikrosphären werden in 25 ml des Phosphatpuffers durch 10-minütiges schonendes Rollen resuspendiert.
6. Punkt 4 und 5 werden zweimal wiederholt.
7. Die resultierende Suspension wird wie in Punkt 4 zentrifugiert und die Mikrosphären werden in dem Phosphatpuffer mit einer Endkonzentration von etwa 5 × 10^8 Partikeln pro ml resuspendiert.
8. Der wie in Präparation 1 beschrieben hergestellte Quervernetzer Methylen-bis(α-formylacetat) wird zu der Suspension gegeben und man läßt die Quervernetzungsreaktion für die gewünschte Zeit (üblicherweise 30–60 min) bei schonendem Rollen laufen.
9. 1,5 M Tris-HCl-Puffer (pH = 8,8) wird bis zu einer Endkonzentration von 0,25 M zugegeben und die Suspension 10 Minuten schonend gerollt.
10. Das Vial wird wie in Punkt 4 zentrifugiert und die Lösung unterhalb der Mikrosphärenschicht wird wie in Punkt 5 entfernt.
11. Die Mikrosphären werden in Phosphatpuffer resuspendiert (gleiches Volumen wie das Endvolumen in Punkt 9) und die Suspension wird 10 Minuten gerollt.
12. Punkt 10 und 11 werden zweimal wiederholt.
13. Die resultierende Suspension wird wie in Punkt 4 zentrifugiert und die Mikrosphären in dem Phosphatpuffer mit einer Endkonzentration von etwa 5 × 10^8 Partikeln pro ml resuspendiert.
14. Diese Endsuspension aus quervernetztem Gas/Albumin-Mikrosphären wird bei 4°C gelagert.

Beispiel 2–22

[0067] Die Vorgehensweise aus Beispiel 1 wird wiederholt, wobei man die wie in den Präparationen 2–22 beschrieben hergestellten quervernetzenden Mittel verwendet, außer das Dimethylsulfoxid anstatt Phosphatpuffer bei der Bearbeitung der gasgefüllten Albumin-Mikrosphären entsprechend den Schritten 3–7 verwendet wird und das quervernetzende Mittel in Schritt 8 als Dimethylsulfoxid-Lösung zugegeben wird.

[0068] Die Anzahl und Größenverteilung der Produkte werden durch Coulter-Zählanalyse bestimmt.

Patentansprüche

1. Kontrastmittel zur Verwendung bei diagnostischen Ultraschalluntersuchungen, das Mikrosphären mit Gas oder einer Gasvorstufe, eingekapselt in einer Proteinschale, umfasst, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Protein mit quervernetzenden Gruppen, die biologisch abbaubare Bindungen enthalten, quervernetzt ist.

2. Kontrastmittel nach Anspruch 1, worin die quervernetzenden Gruppen biologisch abbaubare Bindungen enthalten, die unter Amid-, Imid-, Imin-, Ester-, Anhydrid-, Acetal-, Carbamat-, Cabonat-, Carbonatester- und Disulfidgruppen ausgewählt sind.

3. Kontrastmittel nach Anspruch 2, worin die quervernetzenden Gruppen biologisch abbaubare Bindungen der Formel

$$-(Y)_n\text{-}CO\text{-}O\text{-}C(R^1R^2)\text{-}O\text{-}CO\text{-}(Z)_n-$$

enthalten, (worin Y und Z, die gleich oder verschieden sein können, für -O-, -S- oder -NR^3- stehen; R^1 und R^2, die gleich oder verschieden sein können, für Wasserstoffatome oder kohlenstoffverknüpfte monovalente organische Gruppen stehen oder zusammen eine kohlenstoffverknüpfte divalente organische Gruppe bedeuten; R^3 für ein Wasserstoffatom oder eine organische Gruppe steht; und die Symbole n, die gleich oder verschieden sein können, für 0 oder 1 stehen).

4. Kontrastmittel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, worin das Protein Albumin, Gelatine oder γ-Globulin ist.

5. Kontrastmittel nach Anspruch 4, worin das Protein Humanserumalbumin ist.

6. Kontrastmittel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, worin die Mikrosphären ein Gas umfassen, das unter Luft, Stickstoff, Sauerstoff, Wasserstoff, Distickstoffoxid, Kohlenstoffdioxid, Helium, Ar-

gon, Schwefelhexafluorid und gegebenenfalls fluorierten Kohlenwasserstoffen mit niedrigem Molekulargewicht, die bei 37°C gasförmig sind, ausgewählt ist.

7. Kontrastmittel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, das ferner einen anorganischen partikelförmigen Stabilisator enthält.

8. Kontrastmittel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, worin die Mikrosphären eine mittlere Größe von 0,1–10 µm aufweisen.

9. Kontrastmittel nach Anspruch 8, worin die Mikrosphären eine mittlere Größe von 1–7 µm aufweisen.

10. Kontrastmittel nach einem der vorhergehenden Ansprüche mit einer Halbwertszeit in vivo von nicht mehr als 48 Stunden.

11. Verfahren zur Herstellung eines Kontrastmittels nach Anspruch 1, wobei man Mikrosphären erzeugt, die Gas oder eine Gasvorstufe, eingekapselt in einer Proteinschale, umfassen, und man das Protein mit quervernetzenden Gruppen, die biologisch abbaubare Bindungen enthalten, vor, während oder nach der Einkapselung quervernetzt.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei das Quervernetzen nach Einkapselung erfolgt.

13. Verfahren nach Anspruch 11 oder Anspruch 12, wobei das Quervernetzen unter Verwendung eines quervernetzenden Mittels der Formel (I)

A^1-X-A^2

erfolgt, (worin X für eine bindende Gruppe mit einer oder mehreren, in Anspruch 2 oder Anspruch 3 definierten, biologisch abbaubaren Bindungen steht und A^1 und A^2, die gleich oder verschieden sein können, für funktionelle Gruppen stehen, die gegenüber Proteinen reaktiv sind).

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei A^1 und A^2 beide Aldehydgruppen sind.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 14, wobei die Einkapselung durch Bewegung oder Schallbehandlung des Proteins in einem wäßrigen Medium unter Erhalt eines Proteinschaums erfolgt, welcher getrocknet und anschließend in einer Lösung des quervernetzenden Mittels in einem polaren organischen Lösungsmittel suspendiert wird.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei das quervernetzende Mittel eine in Anspruch 13 definierte Verbindung der Formel (I) ist, worin A^1 und A^2 beide O-gebundene sulfonierte N-Hydroxysuccinimidylreste sind.

17. Mikrosphären, die bei der Herstellung eines Ultraschallkontrastmittels geeignet sind, wobei die Mikrosphären Schwefelhexafluorid oder einen fluorierten Kohlenwasserstoff mit niedrigem Molekulargewicht, der bei 37°C gasförmig ist, eingekapselt in einer Proteinschale, umfassen.

18. Mikrosphären nach Anspruch 17, worin das Protein Albumin, Gelatine oder γ-Globulin ist.

19. Mikrosphären nach Anspruch 18, worin das Protein Humanserumalbumin ist.

20. Mikrosphären nach einem der Ansprüche 17 bis 19 mit einer mittleren Größe von 0,1–10 µm.

21. Mikrosphären nach Anspruch 20 mit einer mittleren Größe von 1–7 µm.

22. Wäßrige Dispersion von Mikrosphären nach einem der Ansprüche 17 bis 21.

23. Verfahren zur Herstellung eines Kontrastmittels durch Erzeugung von Mikrosphären, die Schwefelhexafluorid oder einen fluorierten Kohlenwasserstoff mit niedrigem Molekulargewicht, der bei 37°C gasförmig ist, eingekapselt in einer Proteinschale, umfassen.

24. Verfahren nach Anspruch 23, wobei man ein proteinhaltiges Gemisch im Beisein von Schwefelhexafluorid oder einem fluorierten Kohlenwasserstoff mit niedrigem Molekulargewicht, der bei 37°C gasförmig ist, schüttelt oder mit Schall behandelt, so daß eine fluide Dispersion der Mikrosphären erzeugt wird.

25. Verfahren nach Anspruch 24, wobei das proteinhaltige Gemisch Protein in einem wäßrigen Medium umfaßt.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen