

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040209**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.05.04

(21) Номер заявки
201891296

(22) Дата подачи заявки
2016.12.20

(51) Int. Cl. **A61K 31/02** (2006.01)
A61K 9/107 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ВОДНОЙ ФТОРУГЛЕРОДНОЙ НАНОЭМУЛЬСИИ**

(31) **62/270,226**

(32) **2015.12.21**

(33) **US**

(43) **2019.01.31**

(86) **PCT/US2016/067650**

(87) **WO 2017/112614 2017.06.29**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**НУВОКС ФАРМА ЛЛС; УНГЕР
ЭВАН К. (US)**

(72) Изобретатель:
**Унгер Эван К., Маринелли Эдмунд Р.
(US)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) **WO-A1-2015134735
US-A1-20050037083
US-A1-20130022550
WO-A1-2013043236
US-A1-20130096204**

(57) В настоящем изобретении предложен способ получения водной наноэмульсии, включающий получение первой водной смеси, содержащей один или более перфтор-*n*-гексил-олигоэтиленокси-спиртов, в которых олигоэтиленокси-фрагменты имеют длину от 1 до 16 звеньев, и фторуглерод; пропускание первой смеси через гомогенизатор, содержащий перепускной клапан и пневматическое устройство, из первой емкости во вторую емкость и обратно в первую емкость, причем указанный перепускной клапан открыт; запуск пневматического устройства при закрытом перепускном клапане с получением гомогенизированной первичной эмульсии; подачу гомогенизированной первичной эмульсии в раствор сахарозы, находящийся в первом сосуде высокого давления, с получением второй смеси; соединение первого сосуда высокого давления со входным портом гомогенизатора; соединение второго сосуда высокого давления с выходным портом гомогенизатора; работу указанного пневматического устройства при закрытом перепускном клапане для получения наноэмульсии до тех пор, пока вторая смесь не переместится полностью во второй сосуд высокого давления; и создание давления во втором сосуде высокого давления для пропускания наноэмульсии через 0,8/0,2-микронный фильтр в третий сосуд высокого давления со стерилизацией указанной наноэмульсии.

B1

040209

040209

B1

Испрашиваемый приоритет и родственные заявки на патент

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/270226, поданной 21 декабря 2015 г., содержание которой включено в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки.

Область техники

В целом настоящее изобретение относится к композициям фторуглеродных наноземульсий, способам их получения и применения. Более конкретно настоящее изобретение относится к уникальным фторуглеродным наноземульсиям, стабилизированным одним или более перфтор-*n*-гексил-олигоэтиленоксиспиртами и фосфолипидами, способам их получения и применения.

Уровень техники

Обычные хирургические и интервенционные процедуры, а также травмы и болезненные состояния могут приводить к потере крови, ишемии или гипоксии, которые при отсутствии своевременного и надлежащего лечения могут вызывать повреждения органов и тканей, способствующие заболеваемости и смертности. Нарушение кровообращения происходит при ишемических синдромах, широко распространенных по всему телу и конечностям, и при инсультах головного мозга. Быстрая ревазуляризация и восстановление тока крови, насыщенной кислородом, остаются основными способами клинической терапии инсультов. Кроме того, наблюдается постоянный дефицит донорской крови, отчасти по причине ограниченного срока хранения донорской крови и ее склонности к вирусному заражению. Переносчики кислорода или искусственная кровь подходят для лечения различных заболеваний и состояний, в том числе при радиотерапии и химиотерапии.

Сообщалось о переносчиках кислорода на основе эмульгированных фторуглеродов (FC), например высокомолекулярных фторуглеродов (например, перфтордекалина и перфтороктилбромид). Тем не менее указанные композиции в большинстве случаев не соответствуют строгим клиническим требованиям и остаются актуальными многие проблемы, связанные с острой потребностью в безопасных, надежных и эффективных переносчиках кислорода.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение частично основано на неожиданно обнаруженном факте того, что фторуглеродные наноземульсии, уникальным образом полученные с применением поверхностно-активных веществ или стабилизирующих агентов, выбранных из перфтор-*n*-гексил-олигоэтиленоксиспиртов, фосфолипидов или их комбинаций, разрешают критически важные проблемы бионакопления метаболитов и продуктов разложения, которые образуются из фторсодержащих поверхностно-активных веществ с перфторалкильными группами, содержащими более 6 полностью фторированных атомов углерода.

Фторуглеродные наноземульсии согласно настоящему изобретению обладают значительным преимуществом благодаря наличию в поверхностно-активном веществе более короткой перфторуглеродной цепи, поскольку не происходит бионакопления продуктов выделения и метаболизма, как в случае с более крупными перфторалкильными фрагментами.

В одном из аспектов настоящее изобретение в целом относится к композиции фторуглеродной наноземульсии, которая содержит

фторуглерод, содержащий от 4 до 8 атомов углерода; и

одно или более поверхностно-активных веществ, выбранных из перфтор-*n*-гексил-олигоэтиленоксиспиртов, фосфолипидов или их комбинаций.

В некоторых вариантах реализации одно или более поверхностно-активных вещества включают перфтор-*n*-гексил-олигоэтиленоксиспирт и/или смесь трех фосфолипидов.

В другом аспекте настоящее изобретение в целом относится к способу получения наноземульсии. Способ включает

получение первой водной смеси, содержащей PEG-теломер В и фторуглерод;

пропускание первой смеси через гомогенизатор, содержащий перепускной клапан и пневматическое устройство, из первой емкости во вторую емкость и обратно в первую емкость, причем указанный перепускной клапан открыт;

запуск пневматического устройства при закрытом перепускном клапане с получением гомогенизированной первичной наноземульсии;

подачу гомогенизированной первичной наноземульсии в водный раствор сахарозы или другого вискогена и необязательно одного или более из фармацевтически приемлемых буферных солей и микробицидных агентов, находящихся в первом сосуде высокого давления с получением второй смеси;

соединение первого сосуда высокого давления со входным портом гомогенизатора;

соединение второго сосуда высокого давления с выходным портом гомогенизатора;

работу указанного пневматического устройства при закрытом перепускном клапане для дополнительной гомогенизации до тех пор, пока вторая смесь не переместится полностью во второй сосуд высокого давления с получением наноземульсии; и

создание давления во втором сосуде высокого давления для пропуска наноземульсии через 0,8/0,2-микронный фильтр в третий сосуд высокого давления со стерилизацией указанной наноземульсии.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения наноземульсии, вклю-

чающему

получение первой водной смеси, содержащей один или более фосфолипидов и фторуглерод;
пропускание первой смеси через гомогенизатор, содержащий перепускной клапан и пневматическое устройство, из первой емкости во вторую емкость и обратно в первую емкость, причем указанный перепускной клапан открыт;

запуск пневматического устройства при закрытом перепускном клапане с получением гомогенизированной первичной эмульсии;

подачу гомогенизированной первичной эмульсии в раствор сахарозы, находящийся в первом сосуде высокого давления, с получением второй смеси;

соединение первого сосуда высокого давления со входным портом гомогенизатора;

соединение второго сосуда высокого давления с выходным портом гомогенизатора;

работу указанного пневматического устройства при закрытом перепускном клапане для получения наноэмульсии до тех пор, пока вторая смесь не переместится полностью во второй сосуд высокого давления; и

создание давления во втором сосуде высокого давления для пропускания наноэмульсии через 0,8/0,2-микронный фильтр в третий сосуд высокого давления со стерилизацией указанной наноэмульсии.

В другом аспекте настоящее изобретение в целом относится к способу получения наноэмульсии. Способ включает

получение первой водной смеси, содержащей один или более перфтор-*n*-гексил-олигоэтиленокси-спиртов, в которых олигоэтиленокси фрагменты имеют длину от 1 до 16 звеньев, и фторуглерод;

пропускание первой смеси через гомогенизатор, содержащий перепускной клапан и пневматическое устройство, из первой емкости во вторую емкость и обратно в первую емкость, причем перепускной клапан открыт;

запуск пневматического устройства при закрытом перепускном клапане с получением гомогенизированной первичной эмульсии;

подачу гомогенизированной первичной эмульсии в водный раствор сахарозы, необязательно содержащий один или более из фармацевтически приемлемых буферных солей, вискогенов и микробиоцидных агентов, находящийся в первом сосуде высокого давления, с получением второй смеси;

соединение первого сосуда высокого давления со входным портом гомогенизатора;

соединение второго сосуда высокого давления с выходным портом гомогенизатора;

работу пневматического устройства при закрытом перепускном клапане для получения наноэмульсии до тех пор, пока вторая смесь полностью не переместится во второй сосуд высокого давления; и

создание давления во втором сосуде высокого давления для пропускания наноэмульсии через 0,8/0,2-микронный фильтр в третий сосуд высокого давления со стерилизацией указанной наноэмульсии.

В другом аспекте настоящее изобретение в целом относится к способу получения наноэмульсии. Способ включает

получение первой водной смеси, содержащей перфтор-*n*-гексил-олигоэтиленокси-спирт, сахарозу и необязательно одну или более фармацевтически приемлемые буферные соли, вискогены и одобренные биоцидные стерилизующие агенты;

внесение первой смеси в колбу при помощи шприца и иглы, прикрепленной к шприцу;

добавление в колбу фторуглерода, закупоривание и обжимание крышки колбы с последующим перемешиванием содержимого колбы на вортексе (vortex) и обработкой ультразвуком.

В другом аспекте настоящее изобретение в целом относится к способу получения наноэмульсии. Способ включает

получение смеси, содержащей один или более фосфолипидов, воду, глицерин, одноосновный фосфат натрия и двухосновный фосфат натрия;

пропускание смеси через 0,2-микронный фильтр в стерильный сосуд;

внесение смеси в колбу;

добавление в колбу фторуглерода и немедленное закупоривание и обжимание крышки колбы с последующим перемешиванием содержимого колбы на вортексе (vortex) и обработкой ультразвуком.

В другом аспекте настоящее изобретение в целом относится к наноэмульсии, получаемой способом, описанным в настоящей заявке.

Краткое описание чертежей

Настоящее изобретение будет лучше понято посредством ознакомления с представленным ниже подробным описанием совместно с чертежами, на которых одинаковые условные обозначения применяются для обозначения одинаковых элементов и на которых

фиг. 1 представляет собой блок-схему, кратко характеризующую иллюстративный вариант реализации способа согласно настоящему изобретению для получения стабилизированных PEG-теломером В наноэмульсий перфторуглеродов путем гомогенизации под высоким давлением;

фиг. 2 представляет собой блок-схему, кратко характеризующую дополнительные стадии иллюстративного варианта реализации способа согласно настоящему изобретению из фиг. 1;

фиг. 3 наглядно демонстрирует данные стабильности эмульсий наночастиц TDFH-PTB из иллюст-

ративного варианта реализации способа согласно настоящему изобретению, которые хранили при 4°C, и таких же эмульсий, которые хранили при 23°C;

фиг. 4 наглядно демонстрирует данные стабильности эмульсий наночастиц TDFH-РТВ из иллюстративного варианта реализации способа согласно настоящему изобретению, которые хранили при 4°C, и эмульсий наночастиц TDFH-соединения 20a (DuPont Capstone FS-3100), которые хранили при 4°C;

фиг. 5 представляет собой блок-схему, кратко характеризующую иллюстративный вариант реализации способа согласно настоящему изобретению получения стабилизированных фосфолипидами наноэмульсий перфторуглеродов;

фиг. 6 представляет собой блок-схему, кратко характеризующую иллюстративный вариант реализации способа согласно настоящему изобретению получения стабилизированных наноэмульсий перфторуглеродов, содержащих компоненты, смешанные в концентрациях, соответствующих концентрациям в конечном продукте, путем перемешивания на вортексе и обработки ультразвуком;

фиг. 7 представляет собой диаграмму иллюстративного аппарата для измерения поглощения растворенного кислорода из раствора до и после добавления исследуемого раствора наноэмульсий перфторуглерода и поверхностно-активного вещества;

фиг. 8 представляет собой график содержания растворенного кислорода в водном растворе до и после добавления наноэмульсии перфторуглерода из примера 5;

фиг. 9 представляет собой график, демонстрирующий снижение уровня растворенного кислорода в водном растворе после добавления состава из примера 7;

фиг. 10 представляет собой график, демонстрирующий снижение уровня растворенного кислорода в водном растворе после добавления состава из примера 8.

Подробное описание изобретения

В настоящем изобретении предложены фторуглеродные наноэмульсии, уникальным образом полученные с применением поверхностно-активных веществ или стабилизирующих агентов, выбранных из перфтор-н-гексил-олигоэтиленокси-спиртов и фосфолипидов. Указанные наноэмульсии фторуглеродов разрешают ключевые проблемы, характерные для обычных искусственных переносчиков кислорода на основе фторуглеродов, включая бионакопление метаболитов и продуктов разложения. Указанные нежелательные примеси образуются из фторсодержащих поверхностно-активных веществ с перфторалкильными группами, содержащими более 6 полностью фторированных атомов углерода и приводят к несоответствию строгим нормативным стандартам. Наноэмульсии фторуглеродов согласно настоящему изобретению обладают значительным преимуществом благодаря наличию в поверхностно-активном веществе более короткой перфторуглеродной цепи, поскольку не происходит бионакопления продуктов выделения и метаболизма, как в случае с более крупными перфторалкильными фрагментами.

В одном из аспектов настоящее изобретение в целом относится к композиции наноэмульсии фторуглерода, которая содержит

фторуглерод, содержащий от 4 до 8 атомов углерода; и

одно или более поверхностно-активных веществ, выбранных из перфтор-н-гексил-олигоэтиленокси-спиртов и фосфолипидов.

В некоторых вариантах реализации фторуглерод включает перфторбутан, перфторпентан, перфторгексан, перфторгептан, перфтороктан или смесь двух или более указанных соединений.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации фторуглерод включает перфторпентан.

В некоторых вариантах реализации одно или более поверхностно-активные вещества включают перфтор-н-гексил-олигоэтиленокси-спирт и/или смесь трех фосфолипидов.

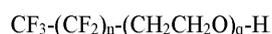
Например, перфтор-н-гексил-олигоэтиленокси-спирт включает одно или более соединений из



где n равняется 5, и

q представляет собой целое число от 1 до 50.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации перфтор-н-гексил-олигоэтиленокси-спирт представляет собой



где n равняется 5, и

q представляет собой целое число от 1 до 16 (например, от 3 до 16, от 6 до 16, от 10 до 16, от 3 до 10).

Фторуглерод может составлять любую подходящую массовую долю в наноэмульсии, например, от 1 до 50% (например, от 1 до 40%, от 1 до 30%, от 1 до 20%, от 1 до 10%, от 1 до 5%).

Перфтор-н-гексил-олигоэтиленокси-спирт может составлять любую подходящую массовую долю в наноэмульсии, например, от 0,10 до 7,5% (например, от 0,10 до 5%, от 0,10 до 4%, от 0,10 до 3%, от 0,10 до 1,5%).

Фосфолипиды могут иметь любую подходящую длину углеродной цепи, например, от 12 атомов углерода до 18 атомов углерода (например, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18) в длину.

Фосфолипиды могут составлять любую подходящую массовую долю в наноэмульсии, например, от 0,10 до 7,5% (например, от 0,10 до 5%, от 0,10 до 4%, от 0,10 до 3%, от 0,10 до 1,5%).

Раскрытие документа PCT/US15/35681, озаглавленного "Phospholipid Composition And Microbubbles and Emulsions Formed Using Same" и поданного 12 июня 2015 г., явно включено в настоящую заявку посредством ссылки во всех отношениях.

В некоторых вариантах реализации, где композиция содержит смесь трех фосфолипидов, иллюстративные фосфолипиды и их относительные количества могут составлять, например, от 75 до 87 мол.% фосфатидилхолина, от 5 до 15 мол.% фосфатидилэтаноламина и от 3 до 20 мол.% фосфатидилэтаноламин-MPEG, где MPEG относится к группе PEG, имеющей концевую метоксигруппу. В настоящей заявке MPEG может иметь молекулярную массу от 350 до 5000 (например, от 350 до 4000, от 350 до 3000, от 350 до 2000, от 500 до 5000, от 1000 до 5000, от 1500 до 5000, от 2000 до 5000, от 3000 до 5000, от 4000 до 5000). Фосфатидилэтаноламин-PEG, в котором олигоэтиленокси фрагмент молекулы содержит концевую гидроксигруппу вместо концевой метоксигруппы в MPEG-фосфолипидах, можно применять в составе вместо фосфатидилэтаноламин-MPEG. Также в качестве содержащего олигоэтиленокси фрагмент фосфолипидного компонента указанных составов можно применять комбинации фосфатидилэтаноламин-MPEG и фосфатидилэтаноламин-PEG в любых относительных количествах.

В вариантах реализации, в которых композиция содержит смесь трех фосфолипидов, приведенные в качестве примера фосфолипиды и их относительные количества могут составлять, например, от 80 до 85 мол.% фосфатидилхолина, от 8 до 13 мол.% фосфатидилэтаноламина и от 6 до 11 мол.% фосфатидилэтаноламин-MPEG (или фосфатидилэтаноламин-PEG).

В некоторых вариантах реализации фосфатидилэтаноламин содержит группу PEG с молекулярной массой от 350 до 5000 (например, от 350 до 4000, от 350 до 3000, от 350 до 2000, от 500 до 5000, от 1000 до 5000, от 1500 до 5000, от 2000 до 5000, от 3000 до 5000, от 4000 до 5000).

В некоторых вариантах реализации композиции согласно настоящему изобретению содержат PEG-теломер В (PTB), специально очищенный до фармацевтической степени чистоты продукт DuPont Zonyl FS-100 или DuPont FSO. В некоторых вариантах реализации композиции согласно настоящему изобретению содержат перфтор-*n*-гексил-олигоэтиленокси-спирт. Конкретная форма перфтор-*n*-гексил-олигоэтиленокси-спирта представляет собой фторсодержащий поверхностно-активный продукт, известный как DuPont Capstone FS-3100, и в некоторых вариантах реализации композиции согласно настоящему изобретению содержат указанный материал или специально очищенную версию указанного материала. В некоторых вариантах реализации композиции согласно настоящему изобретению содержат тетрадекафтор-*n*-гексан (TDFH). В некоторых вариантах реализации композиции согласно настоящему изобретению содержат тетрадекафторгексан, который может состоять из смеси 2 или более своих возможных структурных изомеров, присутствующих в любых пропорциях. В некоторых вариантах реализации композиции согласно настоящему изобретению содержат додекафтор-*n*-пентан (DDFP). В некоторых вариантах реализации композиции согласно настоящему изобретению содержат додекафторпентан, который может состоять из смеси 2 или более своих возможных структурных изомеров, присутствующих в любых пропорциях. В некоторых вариантах реализации композиции согласно настоящему изобретению содержат одно или более соединений из додекафтор-*n*-пентана, 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолина, солей 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-5000], например натриевой соли, и 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина.

В некоторых вариантах реализации композиции согласно настоящему изобретению содержат одно или более соединений из 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолина, солей 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000], например натриевой соли, и 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина. В некоторых вариантах реализации композиции согласно настоящему изобретению содержат одно или более соединений из 1,2-дидодеканоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолина, натриевой соли 1,2-дидодеканоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] и 1,2-дидодеканоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина.

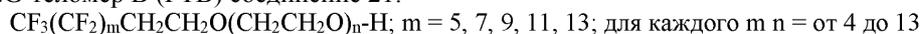
Один из аспектов настоящего изобретения относится к способу получения наноэмульсий перфторуглеродов. Для получения наноэмульсий перфторуглеродов применяют водные смеси одного или более фторуглеродных поверхностно-активных веществ, которые содержат фторуглеродный фрагмент, имеющий только одну длину цепи. На стадии (110) способа на фиг. 1 готовят 6% мас./об. смесь фторсодержащего поверхностно-активного вещества в воде для инъекций (WFI) с применением магнитной мешалки в сосуде, расположенном в бане при 2-5°C, в течение периода времени от 15 до 60 мин при отслеживании температуры раствора и поддержании температуры в диапазоне 2-5°C. В некоторых вариантах реализации фторуглерод на стадии (110) включает тетрадекафтор-*n*-гексан. В некоторых вариантах реализации фторуглерод на стадии (110) включает тетрадекафторгексан, который может представлять собой смесь 2 или более структурных изомеров. В некоторых вариантах реализации фторуглерод на стадии (110) включает додекафтор-*n*-пентан. В некоторых вариантах реализации фторуглерод на стадии (110) включает додекафторпентан, который может представлять собой смесь 2 или более структурных изомеров.

В некоторых вариантах реализации фторуглерод на стадии (110) состоит из тетрадекафтор-*n*-гексана. В некоторых вариантах реализации фторуглерод на стадии (110) состоит из тетрадекафторгекса-

на. В некоторых вариантах реализации фторуглерод на стадии (110) состоит из додекафтор-н-пентана. В некоторых вариантах реализации фторуглерод на стадии (110) состоит из додекафторпентана.

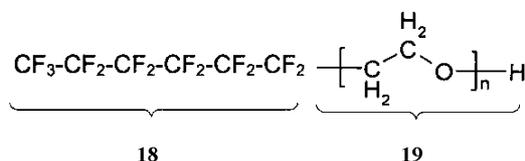
Далее на стадии (110) способа согласно настоящему изобретению в сосуд быстро добавляют аликвоту холодного (0-4°C) перфторуглерода, сосуд закрывают крышкой, а затем перемешивают получившуюся первую смесь в течение 1 ч.

В некоторых вариантах реализации фторуглеродное поверхностно-активное вещество на стадии (110) включает PEG-теломер В (ПТВ) соединение 21.



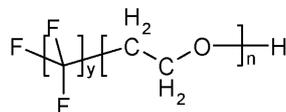
21

В некоторых вариантах реализации фторуглеродное поверхностно-активное вещество на стадии (110) включает перфтор-н-гексил-олигоэтиленокси-спирт. В некоторых вариантах реализации фторуглеродное поверхностно-активное вещество на стадии (110) состоит из PEG-теломера В, который представляет собой смесь соединений, обозначенных выше как 21. В некоторых вариантах реализации фторуглеродное поверхностно-активное вещество на стадии (110) состоит из перфтор-н-гексил-олигоэтиленокси-спирта. В некоторых вариантах реализации фторсодержащее поверхностно-активное вещество на стадии (110) представляет собой перфтор-н-гексил-олигоэтиленокси-спирт, поверхностно-активное вещество 17, которое имеет неизменный перфтор-н-гексильный фрагмент 18 в комбинации с изменяющимся этиленоксидным фрагментом 19.



17

В некоторых вариантах реализации фторсодержащее поверхностно-активное вещество на стадии (110) включает перфтор-н-алкил-олигоэтиленокси-спирт 20, в котором у составляет более 6. В некоторых вариантах реализации фторсодержащее поверхностно-активное вещество на стадии (110) включает соединение 20, в котором у равняется 7 и в котором n больше или равно 1 и меньше или равно 16.



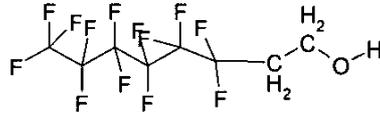
20 a,b

В некоторых вариантах реализации фторсодержащее поверхностно-активное вещество на стадии (110) включает перфтор-н-алкил-олигоэтиленокси-спирт 20а, в котором у равняется 6 и в котором n больше или равно 1 и меньше или равно 16 (например, фторсодержащее поверхностно-активное вещество DuPont Capstone FS-3100). В некоторых вариантах реализации соединение 20а можно применять в форме, получаемой от производителя. В некоторых вариантах реализации соединение 20а можно подвергать специально разработанной процедуре обработки или процедуре очистки перед применением. В некоторых вариантах реализации фторсодержащее поверхностно-активное вещество на стадии (110) включает соединение 20b, в котором у равняется 5 и в котором n больше или равно 1 и меньше или равно 16.

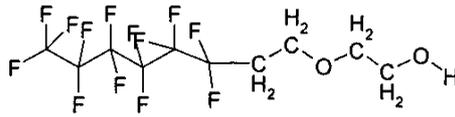
В некоторых вариантах реализации фторсодержащее поверхностно-активное вещество на стадии (110) включает соединение 1. В некоторых вариантах реализации фторсодержащее поверхностно-активное вещество на стадии (110) включает соединение 2.

В некоторых вариантах реализации фторсодержащее поверхностно-активное вещество на стадии (110) включает соединение 3. В некоторых вариантах реализации фторсодержащее поверхностно-активное вещество на стадии (110) включает соединение 4. В некоторых вариантах реализации фторсодержащее поверхностно-активное вещество на стадии (110) включает соединение 5. В некоторых вариантах реализации фторсодержащее поверхностно-активное вещество на стадии (110) включает соединение 6. В некоторых вариантах реализации фторсодержащее поверхностно-активное вещество на стадии (110) включает соединение 7. В некоторых вариантах реализации фторсодержащее поверхностно-активное вещество на стадии (110) включает соединение 8. В некоторых вариантах реализации фторсодержащее поверхностно-активное вещество на стадии (110) включает соединение 9. В некоторых вариантах реализации фторсодержащее поверхностно-активное вещество на стадии (110) включает соединение 10. В некоторых вариантах реализации фторсодержащее поверхностно-активное вещество на стадии (110) включает соединение 11. В некоторых вариантах реализации фторсодержащее поверхностно-активное вещество на стадии (110) включает соединение 12. В некоторых вариантах реализации фторсодержащее поверхностно-активное вещество на стадии (110) включает соединение 13. В некоторых

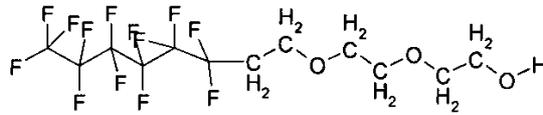
вариантах реализации фторсодержащее поверхностно-активное вещество на стадии (110) включает соединение 14. В некоторых вариантах реализации фторсодержащее поверхностно-активное вещество на стадии (110) включает соединение 15. В некоторых вариантах реализации фторсодержащее поверхностно-активное вещество на стадии (110) включает соединение 16.



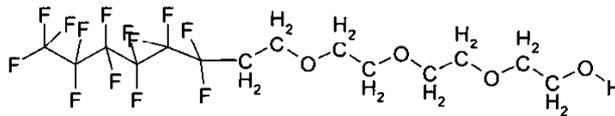
1



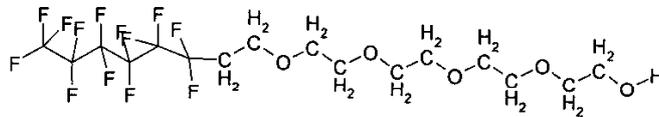
2



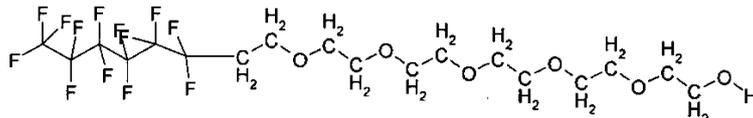
3



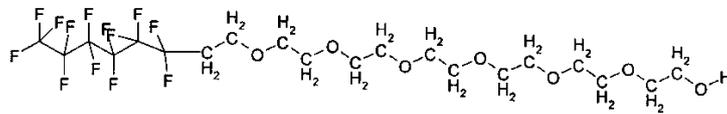
4



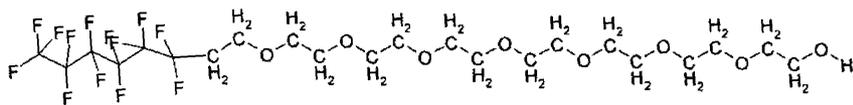
5



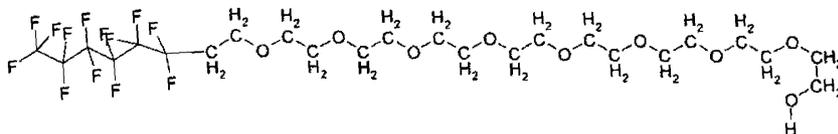
6



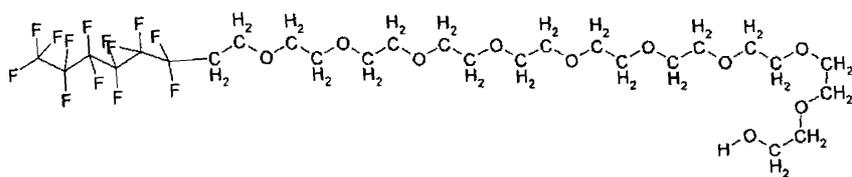
7



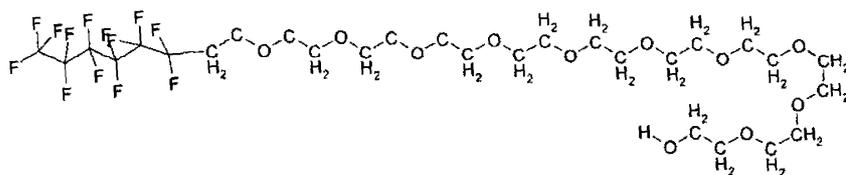
8



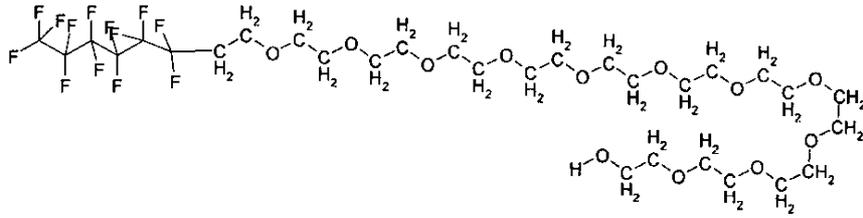
9



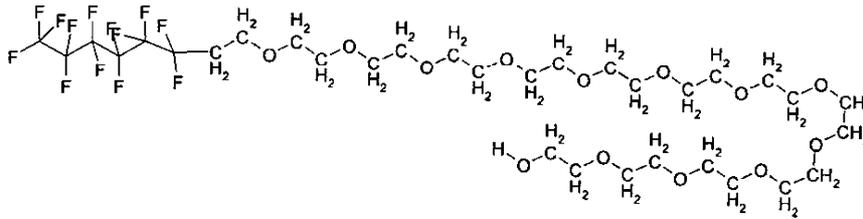
10



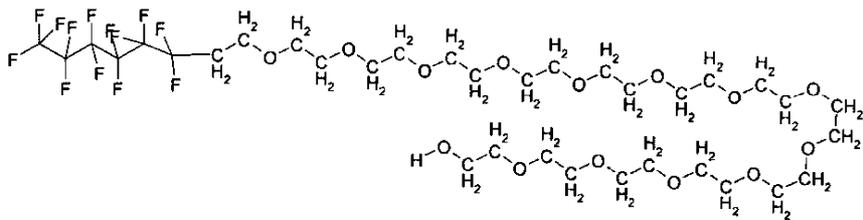
11



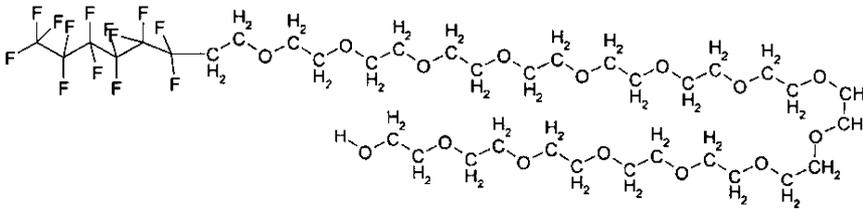
12



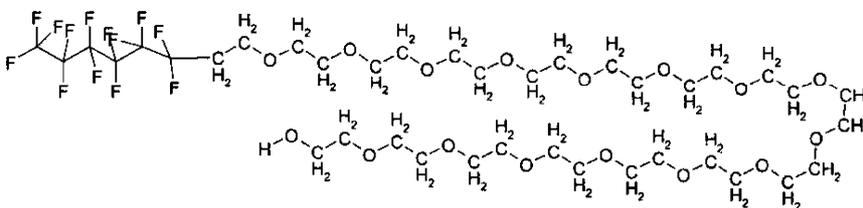
13



14



15



16

В некоторых вариантах реализации фторсодержащее поверхностно-активное вещество состоит из смесей соединений 1-16, которые могут содержать любые комбинации указанных соединений и в которых могут отсутствовать любое из указанных соединений или отдельные элементы из группы соединений 1-16.

В некоторых вариантах реализации для получения наноземulsion перфторуглеродов согласно настоящему изобретению применяют другие фторуглеродные поверхностно-активные вещества, содержащие перфтор фрагмент 18, обладающие различными пенообразующими и смачивающими свойствами. Например, можно применять другие аниогенные поверхностно-активные вещества на основе сложных

эфиров сульфоновых кислот (DuPont FS-10) или фосфорной кислоты (DuPont FS-61, FS-63, FS-64); цвиттер-ионные и амфотерные поверхностно-активные вещества (DuPont FS-50 и DuPont FS-51 соответственно); неионогенные поверхностно-активные вещества на основе перфторалкилированных полиоксиэтиленоксиспиртов, такие как DuPont FS-30, DuPont FS-31, DuPont FS-3100, DuPont FS34 и DuPont FS-35 и т.п. В некоторых вариантах реализации для получения наноэмульсий перфторуглеродов согласно настоящему изобретению применяют фторуглеродное соединение, содержащее фрагмент 18 в комбинации с этиленоксидными фрагментами 19 различной длины. В некоторых вариантах реализации n составляет от 3 до 6. В других вариантах реализации n больше или равно 1 и меньше или равно 16 для получения стабильных наноэмульсий с низкомолекулярными перфторуглеродами, такими как додекафторпентан (DDFP), тетрадекафторгексан (TDFH), гексадекафторгептан (HDFH) и октадекафтороктан (ODFO).

В некоторых вариантах реализации для получения наноэмульсий перфторуглеродов, описанных в настоящей заявке, применяют поверхностно-активные вещества, представляющие собой пегилированные перфторалкилолигоэтиленоксиспирты в форме, представленной в виде соединения 22



22

где независимо m представляет собой целое число от 1 до 50 (например, от 1 до 25, от 1 до 12, от 1 до 6, от 6 до 50, от 12 до 50, от 25 до 50),

n представляет собой целое число от 1 до 50 (например, от 1 до 25, от 1 до 12, от 1 до 6, от 6 до 50, от 12 до 50, от 25 до 50), и

q представляет собой целое число от 1 до 50 (например, от 1 до 25, от 1 до 12, от 1 до 6, от 6 до 50, от 12 до 50, от 25 до 50).

В некоторых более предпочтительных вариантах реализации класс соединений, которые можно применять, выбирают из подмножества соединений 22, представленных ниже,



где m =от 1 до 50, n =от 1 до 12 и q =от 1 до 50.

В некоторых наиболее предпочтительных вариантах реализации класс соединений, которые можно применять, выбирают из подмножества соединений 22, представленных ниже,



где m =от 1 до 50, n =от 1 до 6 и q =от 1 до 50.

В некоторых вариантах реализации индивидуальные члены группы соединений или любую комбинацию индивидуальных членов группы соединений, представленных в виде соединения 22, используют в качестве фторуглеродного поверхностно-активного вещества, применяемого для получения наноэмульсий перфторуглеродов, описанных в настоящей заявке.

В некоторых вариантах реализации смесь соединений, представленных в виде структуры 22, перед применением можно подвергать обработке или очистке согласно специально разработанному протоколу для получения наноэмульсий перфторуглеродов, описанных в настоящей заявке.

В некоторых вариантах реализации любые индивидуальные химические соединения или комбинации индивидуальных членов группы соединений, представленных в виде структуры 22, перед применением можно подвергать обработке или очистке согласно специально разработанному протоколу для получения наноэмульсий перфторуглеродов, описанных в настоящей заявке.

В некоторых вариантах реализации вместо магнитной системы для перемешивания для получения начальной грубой эмульсии можно применять Ultra Turbax или аналогичные устройства для диспергирования. Ultra Turbax имеет высокоскоростной электродвигатель для перемешивания (1000-25000 об/мин), к которому через вал присоединен диспергирующий элемент. Таким образом, при применении Ultra Turbax для получения грубой эмульсии требуется меньшее время (0,5-5 мин) по сравнению с применением магнитной системы для перемешивания. На протяжении всей операции температуру раствора поддерживают в диапазоне 2-6°C для минимизации потерь низкокипящей фторуглеродной жидкости.

Кроме того, для получения грубой эмульсии можно применять энергичное перемешивание, создаваемое при помощи ультразвуковых зондов или гомогенизаторов, имеющих высокоскоростной электродвигатель для перемешивания и диспергирующее приспособление.

Затем в соответствии с фиг. 1 на стадиях (140c)-(160c) или (140d)-(175d) грубую эмульсию гомогенизируют с получением тонкодисперсной эмульсии, имеющей средний размер частиц, меньший или равный 400 нм, и 99% кумулятивное распределение, меньшее или равное 900 нм.

В одном из вариантов реализации применяют гомогенизатор (Avestin model C5). В другом варианте реализации применяют ручной гомогенизатор Kirkland Products с пневматическим вспомогательным устройством или без него. В некоторых вариантах реализации давление гомогенизации составляет от 1000 фунт/кв. дюйм (6,89 МПа) до 14000 фунт/кв. дюйм (96,53 МПа). Кроме того, в других вариантах реализации гомогенизатор используют в режиме непрерывной гомогенизации или в режиме прерывистой гомогенизации. Количество проходов при прерывистой гомогенизации или продолжительность непрерывной гомогенизации можно регу-

лировать для обеспечения получения тонкодисперсной эмульсии.

В соответствии с фиг. 1 на стадии (180) после завершения получения тонкодисперсной эмульсии из грубой эмульсии путем гомогенизации полученную тонкодисперсную эмульсию переносят в другой сосуд, содержащий охлажденную (0-10°C) перемешиваемую дисперсионную среду, состоящую из WFI. Кроме того, дисперсионная среда необязательно содержит буферный агент, вискоген, вспомогательные вещества и консерванты (микробиоцидные агенты) для ингибирования роста любых случайно занесенных микроорганизмов.

В некоторых вариантах реализации перенос можно проводить путем пропускания эмульсии из первого сосуда с помощью гомогенизатора во второй сосуд, при этом гомогенизатор необязательно находится под давлением. Объем дисперсионной среды составляет от 1- до 100-кратного объема пропускаемой эмульсии. В некоторых вариантах реализации тонкодисперсную эмульсию перемешивают в течение 10-30 мин под избыточным давлением азота (2-10 фунт/кв. дюйм (0,01-0,07 МПа)) для обеспечения равномерного распределения тонкодисперсной эмульсии в объеме дисперсионной среды. Специалисту в данной области понятно, что конфигурация устройства и количество получаемого продукта могут требовать изменения времени, применяемого в предыдущих процессах с применением других количеств веществ и другого оборудования. На стадии (180) способа тонкодисперсную эмульсию вводят в раствор сахарозы, расположенный в первом сосуде высокого давления (PV1), для получения второй смеси. В соответствии с фиг. 2 на стадии (210) способа в первом сосуде высокого давления (PV1) создают давление при перемешивании второй смеси на стадии (210).

На стадиях (220) и (230) способа вторую смесь переносят во второй сосуд высокого давления (PV2) при помощи гомогенизатора.

На стадиях (240) и (250) способа второй сосуд высокого давления (PV2) соединяют с третьим сосудом высокого давления (PV3) при помощи 0,8/0,2-микронного фильтра, а затем во втором сосуде высокого давления создают давление для перемещения второй смеси в третий сосуд высокого давления с фильтрованием и стерилизацией второй смеси. В некоторых вариантах реализации на стадии фильтрования применяют шприцевой мембранный фильтр, картриджный мембранный фильтр или капсульный мембранный фильтр или любые другие мембраны, которые изготовлены из материалов, совместимых со средой, и способны удалять твердые частицы, включая микроорганизмы, такие как бактерии, плесень, споры плесени и грибки, имеющие размер 0,2 микрона или даже 0,1 микрона. Например, мембранный материал может представлять собой мембрану Supor® (полиэфирсульфон) производства Pall Sciences, мембраны фильтров серии Pall EKV® или мембрану Pall Sciences GHP Polypro®.

После завершения стадии (250) способа полученную стерилизованную вторую смесь перемешивают под небольшим избыточным давлением азота для получения однородной дисперсии отфильтрованного раствора. В некоторых вариантах реализации способ дополнительно включает перемещение отфильтрованной второй смеси в закупоренные и обжатые колбы при помощи перистальтического насоса, дозирующего насоса, шестереночного насоса или другого подходящего устройства для переноса жидкостей. Во избежание микробного загрязнения при проведении всех указанных операций соблюдают меры предосторожности и такие меры предосторожности для операций асептического наполнения известны специалисту в данной области. В соответствии с фиг. 6 в некоторых вариантах реализации наноэмульсии, содержащие фторуглеродное поверхностно-активное вещество 20а или 21, можно получать, например, путем обработки объединенных компонентов ультразвуком. Например, DDFP (в виде чистой жидкости), забуференную фосфатом водную сахарозу (в виде раствора) и поверхностно-активное соединение 20а (в виде чистой жидкости или предварительно смешанное с забуференным фосфатом водным раствором сахарозы) применяют для получения эмульсии наночастиц DDFP.

На стадии (610) способа готовят водный раствор забуференной фосфатом сахарозы и фторсодержащего поверхностно-активного соединения 21 (PEG-теломер В). На стадии (620) способа во множество колб вносят раствор со стадии (610) и каждую из колб закрывают крышкой. На стадии (630) способа колбы помещают в охлажденную среду, в которой колбы охлаждаются до температуры, при которой во время добавления перфторуглерода к раствору в колбе не произойдет значительного испарения перфторуглерода. На стадии (640) в каждую из колб добавляют фторуглерод, а затем немедленно обжимают крышки каждой из колб. На стадии (650) способа каждую из колб подвергают перемешиванию на вортексе с последующей обработкой ультразвуком для получения наноэмульсий перфторуглеродов согласно настоящему изобретению. На стадии (650) компоненты в закупоренных и обжатых колбах смешивают путем встряхивания или перемешивания на вортексе с получением грубой эмульсии, распределение частиц по размерам которой может находиться в диапазоне от примерно 200 нанометров до 15 микрон. Размеры частиц являются иллюстративными, и специалисту в данной области известно, что в реальной практике размеры могут находиться ниже или выше указанного диапазона.

Затем в способе согласно настоящему изобретению колбу обрабатывают ультразвуком, например, в ванне для ультразвуковой очистки, такой как устройство VWR Aquasonic 75HT, которое обеспечивает частоту ультразвуковой обработки примерно 40 КГц и общую выходную мощностью примерно 75-80 Вт в течение периода времени от 1 с до 1 ч, с получением эмульсии наночастиц с желаемым распределением

частиц по размерам.

В соответствии с фиг. 5 в некоторых вариантах реализации один или более фосфолипиды применяют в качестве эмульгирующей поверхностно-активной системы. В соответствии с фиг. 5 на стадии (510) способа готовят первую смесь воды и глицерина, содержащую одноосновный и двухосновный фосфатный буфер, которую перемешивают при температуре от температуры окружающей среды до 100°C. На стадии (520) к первой смеси добавляют фосфолипиды в виде твердого материала или в виде раствора в подходящем растворителе при температуре от температуры окружающей среды до 100°C, совместимой с процессом получения второй смеси. На стадии (530) вторую смесь фильтруют через 0,2-микронный фильтр в второй сосуд. На стадии (540) отфильтрованный раствор охлаждают до температуры окружающей среды, если температура его получения превышает температуру окружающей среды. На стадии (550) способ раствора со стадии (540) переносят во множество колб и колбы закупоривают. На стадии (560) в колбы добавляют выбранный фторуглерод, подлежащий эмульгированию, и крышки колб немедленно обжимают. На стадии (570) способ указанные колбы со стадии (560) перемешивают на вортексе, а затем обрабатывают ультразвуком в течение времени от 1 с до 1 ч для получения эмульсии фторуглерода. Время обработки ультразвуком можно регулировать для получения желаемого распределения частиц по размерам, которое может являться оптимальным для конкретных применений. В некоторых вариантах реализации один или более фосфолипиды являются насыщенными, частично насыщенными или полностью ненасыщенными. Например, первую наноэмульсию получают с применением DPPC (16:0), DPPE-MPEG-2000 или DPPE-MPEG-5000 и необязательно DPPE (16:0). Вторую наноэмульсию получают с применением фосфолипидов яичного желтка индивидуально или в комбинации с другими добавленными фосфолипидами или производными фосфолипидов. Третью наноэмульсию получают с применением 16:0-18:1 PC, 16:0-18:1 PE и 16:0-18:1 PE-MPEG-2000 или 16:0-18:1 PE-MPEG-5000. Четвертую наноэмульсию получают с применением DPPC (16:1), DPPE-MPEG-2000 или DPPE-MPEG-5000 и необязательно DPPE (16:1). Пятую наноэмульсию получают с применением DMPC, DMPE и DMPE-MPEG-2000 или DMPE-MPEG-5000. Шестую наноэмульсию получают с применением 14:1 ($\Delta 9$ -цис) PC, 14:1 ($\Delta 9$ -цис) PE, 14:1 ($\Delta 9$ -цис) MPEG-2000 или 14:1 ($\Delta 9$ -цис) MPEG-5000. Шестую наноэмульсию получают с применением 14:1 ($\Delta 9$ -транс)PC, 14:1 ($\Delta 9$ -транс)PE, 14:1 ($\Delta 9$ -транс) MPEG-2000 или 14:1 ($\Delta 9$ -транс) MPEG-5000. Седьмую наноэмульсию получают с применением DLPC (12:0), DLPE-MPEG-2000 или DLPE-MPEG-5000, DLPE (12:0).

Кроме того, в некоторых вариантах реализации относительные пропорции фосфолипидных компонентов, описанных в настоящей заявке, можно варьировать для оптимизации состава с точки зрения растворимости, стабильности эмульсии, поглощения кислорода и кинетики высвобождения. Например, первую наноэмульсию можно получать при мольном отношении, составляющем 82 DPPC (16:0), 8 DPPE (16:0)-MPEG-2000 и 10 DPPE (16:0), в растворе смеси вода-пропиленгликоль-глицерин 85/10/5 об./об./об. и при общей концентрации липидов от 0,75 до 50 мг/мл. Если растворимость липидов в выбранных растворителях является низкой, можно увеличивать относительные количества пропиленгликоля и глицерина относительно воды. Фосфолипидные компоненты, которые можно применять, не ограничиваются соединениями, описанными в приведенных выше примерах. В некоторых составах могут требоваться смеси фосфолипидов, состоящие из определенной фракции полностью насыщенных фосфолипидов в комбинации с определенной фракцией их ненасыщенных конгенов. Регулировка и настройка свойств, таких как температура фазового перехода от геля к жидкокристаллическому состоянию, хорошо понятны специалисту в данной области.

В некоторых вариантах реализации может потребоваться добавление фосфолипидов с головными группами, которые являются гомологичными указанным в наборе примеров. Например, если MPEG-350 применяют вместо MPEG-2000, относительные пропорции компонентов в системах, в которых применяют MPEG-2000, могут отличаться из-за потребности в большей пропорции MPEG фосфолипидов по сравнению с фосфолипидами с головной группой холина. Это также относится к применению пегилированных фосфолипидов или комбинаций MPEG-фосфолипидов и PEG-фосфолипидов в качестве поверхностно-активной системы.

В некоторых вариантах реализации головные группы на основе холина могут содержать более крупные или более мелкие алкильные группы или менее трех алкильных групп.

В некоторых вариантах реализации фосфолипиды с катионными фрагментами в головных группах, такие как диацилфосфатидилэтаноламинные фосфолипиды, могут быть полностью или частично заменены фосфолипидами с нейтральными головными группами, такими как фосфолипиды на основе диацилфосфатидилглицерина, или с анионными головными группами, такими как диацилфосфатидная кислота. В некоторых вариантах реализации низкомолекулярные вещества можно применять в качестве вискогенных вспомогательных веществ, которые могут замедлять осаждение (расслоение) эмульсии фторуглерода в форме наночастиц и регулировать общую плотность, вязкость и тоничность раствора для приближения к аналогичным параметрам крови, в которую вводят раствор продукта. Например, вещества, такие как пропиленгликоль, глицерин и сахарные спирты, такие как сорбит, ксилит, маннит и эритрит, можно применять в качестве вискогенов. Аналогично также в качестве вискогенов можно применять другие

полигидроксисоединения, такие как моно-, ди- или трисахариды, обладающие подходящей растворимостью в среде. Примерами являются фруктоза, глюкоза, ксилоза, сахароза, трегалоза, раффиноза, стахиоза, альгинаты, циклодекстрины, замещенные циклодекстрины и декстраны. Кроме того, в качестве вискогенов также можно применять полиэтиленгликоли с линейной цепью или многолучевые полиэтиленгликоли, такие как PEG300, PEG400, PEG600 и PEG с более высокой молекулярной массой, составляющей вплоть до 10000.

В некоторых вариантах реализации специалистам в области медицины необходимо контролировать скорость инъекирования раствора наноземульсии для минимизации влияния несоответствия тоничности раствора наноземульсии и крови. Тем не менее инъекируемая наноземульсия не обязательно должна являться изотонической. Указанный инъекируемый раствор наноземульсии может являться гипотоническим или гипертоническим при условии, что степень отклонения от изотоничности не приводит к дискомфорту пациента или повреждению тканей сверх переходного действия. В некоторых вариантах реализации указанную наноземульсию можно инъекировать в больший объем разбавителя, такого как 0,9% солевой раствор, необязательно содержащего другие компоненты, такие как фосфатный буфер, который применяется для получения забуференного фосфатом солевого раствора. В некоторых вариантах реализации для поддержания pH указанных наноземульсии можно применять буферы, отличные от буферных систем на основе фосфата натрия. Указанные буферы могут представлять собой соли или комбинации формы свободной кислоты и формы соли, например, уксусной кислоты, аргинина, аспарагиновой кислоты, бензойной кислоты, угольной кислоты, лимонной кислоты, глюконовой кислоты, лактона глюконовой кислоты, глицина, гистидина, лизина, меглумина, фосфорной кислоты или трометамина, где соли кислот являются частью буферной системы. Кроме того, противоионы обычно представляют собой катионы натрия, меглумина или другие катионы, которые являются биохимически совместимыми и подходят для применения в лекарственных средствах для парентерального применения.

В некоторых вариантах реализации хелатирующий агент, такой как двунариевая соль ЭДТК, можно применять для связывания ионов окисленных металлов, таких как Fe^{3+} , для защиты наноземульсий, содержащих ненасыщенные фосфолипиды. Кроме того, для обеспечения указанной защиты можно добавлять другие антиоксидантные вспомогательные вещества, такие как смесь ацетона и бисульфата натрия, атмосфера 100% аргона в свободном пространстве над эмульсией, аскорбилпальмитат, аскорбат (натрий/кислота), бисульфит натрия, бутилированный гидроксианизол (БГА), бутилированный гидрокситолуол (БГТ), цистеин/цистеинат HCl, дитионит натрия (Na-гидросульфит, Na-сульфоксилат), гентициновая кислота, этаноламинавая соль гентициновой кислоты, глутатион, формальдегидсульфоксилат, метабисульфит натрия, метабисульфит калия, метионин, атмосфера 100% азота (в свободном пространстве над эмульсией), пропиленгаллат, сульфит натрия, альфа-токоферол, гидросукцинат альфа-токоферола или тиогликолят натрия.

Кроме того, в некоторых вариантах реализации в составы можно добавлять противомикробные средства, такие как бензалкония хлорид, бензиловый спирт, бензойная кислота, хлорбутанол, м-крезол, миристил-гамма-пиколиния хлорид, метилпарабен, пропиленпарабен или тимеросал, в количествах, которые могут варьироваться в диапазоне от 0,005 до 5% мас./об в зависимости от конкретного применяемого средства.

Примеры

Пример 1.

Проводили эксперименты для исследования распределения частиц наноземульсий по размерам. Додекафторпентан ((DDFP) FluoroMed, Round Rock, TX) эмульгировали в концентрации 2% (мас./об.) в 30% (мас./об.) растворе сахарозы, забуференном при физиологическом pH (~7). Очищенную до медицинской степени чистоты форму фторсодержащего поверхностно-активного соединения 21 (PEG-теломер B) применяли в концентрации 0,3% (мас./об.) в сочетании с применением гомогенизатора Emulsiflex C-5 (Avestin, Ontario, Canada) для снижения и стабилизации размера частиц на уровне ~250 нм.

По причине летучести DDFP (BP 29°C) спроектировали и изготовили сосуды высокого давления (PV) из нержавеющей стали (316 л) с рубашками для охлаждения для контролирования температуры и создания давления продукта в течение 3 фаз способа получения смеси. Все технологические потоки между PV обеспечивали с применением гибких нейлоновых трубок со внутренним диаметром 1/4 дюйма (0,6 см). Концы трубопроводов снабжали мини-1/2-дюймовыми (1,3 см) санитарно-техническими трехзажимными фитингами, обеспечивающими ровное и асептическое соединение для потоков между гомогенизатором и PV. Таким образом, продукт полностью изолировали от комнатной среды на протяжении всего производственного процесса. Температуру процесса поддерживали в диапазоне 4-6°C и давление в свободном пространстве над содержимым в сосудах поддерживали в диапазоне 5-7 фунт/кв. дюйм (0,03-0,05 МПа) с применением сжатого азота. Эмульсию рециркулировали (непрерывная гомогенизация) через гомогенизационный клапан 6 раз (эффективно) при 14000 фунт/кв. дюйм (96,53 МПа), а затем немедленно фильтровали через 0,2 мкм стерильный капсульный фильтр. При помощи устройства для заполнения Unispence® (Wheaton, Millville, NJ) полученный продукт вносили в 5 мл колбы, которые быстро закупоривали вручную и обжимали пневматическим устройством для обжима Power Crimper (Kebby

Industries).

Распределение частиц эмульсии по размерам три раза оценивали через 0, 1, 2, 3 недели и 1,2, 4, 6 и 11 месяцев. В каждый контрольный момент времени случайным образом выбирали 3 колбы и анализировали путем динамического светорассеяния с применением анализатора размеров субмикронных частиц PSS Nicomp 380 DLS (Particle Sizing Systems, Port Richie, FL). Для минимизации влияния постепенного повышения температуры в процессе определения размеров температуру образцов поддерживали на уровне 19°C. Средний размер частиц, определяемый как средневзвешенный на интенсивность диаметр (IWM), не превышал 260 нм. Кроме того, 99% измеренных на протяжении всего исследования частиц имели диаметр, меньший или равный 400 нм. Менее 0,8% общего объема частиц составляли частицы, имеющие размер от 0,5 до 50 мкм.

Пример 2.

С применением TDFH/соединение 21 (PTB) проводили эксперименты для исследования размера субмикронных частиц, размера частиц в области от 0,5 до 50 микрон, стабильности эмульсий наночастиц при различных температурах. 6% Раствор специально очищенного до медицинской степени чистоты соединения 21 (J. Tech Sales, Boca Raton, FL) получали путем разбавления 1,2 г аликвоты соединения 21, в котором у равняется 5 и n составляет от 1 до 16, до отметки, соответствующей предварительно измеренному объему 20 мл, в стеклянной сцинтилляционной колбе водой для инъекций (HyPure® производства Hyclone) и перемешивания при 5°C в течение 0,5 ч с применением небольшой крестообразной магнитной мешалки. Раствор хранили в холодильнике при 4°C. Ранее полученный раствор соединения 21 в воде доставали из холодильника и 12,12 мл порцию вносили в 15 мл круглодонную колбу (общая вместимость 21 мл), снабженную небольшой бочкообразной магнитной мешалкой. Затем добавляли 3,17 мл, (5,29 г) холодного (4°C) TDFH (Sigma Aldrich Co. St. Louis, MO), колбу закупоривали 14/20 резиновой перепусковой и погружали в 2°C водяную баню со льдом. Смесь перемешивали в течение 1 ч.

В течение периода перемешивания охлаждающую емкость для шприца и охлаждающую емкость для PV1-PV3 заполняли водой со льдом. Сосуды высокого давления, содержащие плавучие магнитные мешалки, закрывали крышками, каждая из которых снабжена двухпозиционным измерительным шаровым клапаном с расположенным в нижней части входом Swagelok™, соединенным с погружной трубкой с наружным диаметром 0,25" (0,6 см) 316SS (для введения и вывода продукта из сосудов), и трехходовым трехпозиционным запорным краном, который выступает в качестве впускного порта для азота и системы вентиляции. В PV1 с крышкой и большой крестообразной мешалкой вносили раствор забуференной фосфатом сахарозы (216,8 мл), сосуд помещали в охлаждающую емкость для PV1-PV3 и начинали перемешивание. PV2 помещали в емкость и соответствующим образом размещали в непосредственной близости от PV1 таким образом, чтобы обе мешалки находились в движении. PV3 помещали на ледяную баню для охлаждения перед подачей продукта из PV2. Для соединения с впускным портом измерительного клапана PV3 готовили 0,8/0,2-микронный фильтр Pall Acrodisc™ (мембрана Supor).

После эксплуатации ручной гомогенизатор Kirkland Products ("гомогенизатор") очищали от остатков WFI, а затем промывали холодной WFI (25 мл). 25 мл стеклянные шприцы Perfektum MicroMate™ со стеклянными поршнями и охлажденными термостатирующими рубашками соединяли со входным и выходным замочными фитингами Люэра гомогенизатора. Приемный шприц снабжали двухходовым запорным краном с фитингами Люэра. Входную газовую линию (80 фунт/кв. дюйм (0,55 МПа)) присоединяли к пневматическому поршневому агрегату гомогенизатора. После завершения периода перемешивания первичной эмульсии выходной шприц отсоединяли от гомогенизатора и снабжали иглой 17 калибра. Первичную эмульсию отбирали в шприц, а затем снимали иглу и шприц быстро присоединяли ко входному порту гомогенизатора. Перистальтический насос BioRad Econopump применяли для последовательного перекачивания ледяной воды через шприцы из бани охлаждающей емкости для шприцов. Перистальтический насос снабжали двумя трубками диаметром 1/8" (0,3 см) Pharmed®, которые соединяли со входным и выходным портами при помощи Y-соединителей для обеспечения общей скорости потока 38 мл/мин. Линии подачи охлаждающей жидкости из перистальтического насоса последовательно соединяли с выходным шприцем и входным шприцем и начинали циркуляцию охлаждающей жидкости. Перепусковой клапан гомогенизатора открывали и первичную эмульсию несколько раз переносили между выходным шприцем и входным шприцем путем изменения положения поршней шприцев; конечное положение первичной эмульсии находилось во входном шприце. Перепусковой клапан закрывали и применяли пневматическое устройство при скорости откачки ~30 мл/мин. После полного переноса содержимого входного шприца в выходной шприц перепусковой клапан быстро открывали и при помощи надавливания на поршень выходного шприца быстро переносили гомогенизированную первичную эмульсию обратно во входной шприц, перепусковой клапан закрывали и проводили второй проход. Таким образом, первичную эмульсию 20 раз пропускали через гомогенизатор. В конце указанной процедуры первичная эмульсия находилась в выходном шприце.

Выходной шприц отсоединяли от выходного порта гомогенизатора и иглу помещали примерно на 2 дюйма (5,1 см) ниже поверхности перемешанного раствора в PV1. Первичную эмульсию вводили при помощи шприца в PV1. В PV1 создавали давление с применением азота (~8-10 фунт/кв. дюйм

(0,06-0,07 МПа) и смесь перемешивали в течение 5 мин, в течение которых при помощи 1/16" (0,2 см) трубок (оплетенная вулканизированным платиной силиконом) соединяли погружную трубку запорного крана PV1 со входным портом гомогенизатора и погружную трубку запорного крана PV2 с выходным портом гомогенизатора. В PV1 поддерживали давление азота, а PV2 сообщали с атмосферой. Открывали шаровой клапан погружной трубки PV2, а затем PV1 с одновременным запуском гомогенизатора. Это приводило к перемещению перемешанного раствора первичной эмульсии в 32% растворе сахарозы из PV1 в PV2 за один гомогенизирующий проход. После перемещения раствора в PV2, PV1 извлекали из охлаждающей емкости для PV1-PV3 и пару PV2-PV3 располагали таким образом, чтобы обеспечить в них перемешивание. 0,8/0,2-Микронный фильтр Pall Sciences Acrodisc 20™ устанавливали между PV2 и PV3 путем соединения погружной трубки входного/выходного порта с шаровым клапаном. Затем в PV2 создавали давление с применением азота на уровне ~12 фунт/кв. дюйм (0,08 МПа) для инициирования перемещения раствора из PV2 в PV3 с фильтрованием. Фильтрование требовало примерно 30-40 мин для завершения, и перенос являлся почти количественным.

Отфильтрованный раствор в PV3 переносили в чашку-кристаллизатор, содержащую воду со льдом, закрепляли зажимом, создавали давление с применением азота примерно 8 фунт/кв. дюйм (0,06 МПа) и раствор перемешивали в течение ~15 мин. Затем два лотка для колб Wheaton с 50 колбами для сыворотки номинальным объемом 2 мл (общая вместимость 3 мл) с серыми крышками из бутылкаучука доставали из холодильника. Оплетенную силиконовую трубку со внутренним диаметром 1/16" (0,2 см), снабженную переходником типа SS 12 калибра на своем выходном порте, соединяли с выходным портом измерительного клапана PV3. Давление в PV3 регулировали до примерно 5 фунт/кв. дюйм (0,03 МПа) и погружную трубку запорного крана открывали по направлению к трубкам. Колбы наполняли (группами по 10) путем снятия с колб крышек с выемкой, открывания и закрывания запорного крана на дальнем конце трубки, прикрепленной к PV3, и возвращения крышек с выемкой на место.

После заполнения 10 колб их закупоривали и обжимали. Указанную процедуру повторяли до израсходования раствора в PV3. В результате получали 65 колб с объемом содержимого 2,6-2,7 мл. Для исследования стабильности колбы в лотке хранили при 4°C. Вторую партию материала готовили аналогичным образом и хранили при 23°C для определения влияния температуры хранения на стабильность частиц.

Таблица 1

Определение размеров субмикронных частиц наноэмульсии TDFH-соединение 21, которую хранили при 4°C, путем динамического светорассеяния с применением Nicomp 380 DLS

| № колбы | IWMD (нм) | Стандартное отклонение (нм) | 99% кумулятивное распределение (нм) |
|----------------|--------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| 1 | 186,9 | 56,1 | <358,9 |
| 10 | 184,5 | 67,7 | <404,8 |
| 18 | 187,8 | 45,8 | <321,3 |
| 26 | 189,2 | 45,4 | <321,1 |
| 34 | 183,7 | 54,7 | <351,2 |
| Среднее | 186,4 | 53,9 (28,9%) | <351,5 |
| Ст. откл. | 2,29 | 9,13 | 34,39 |
| ОСО (%) | 1,23 | 16,93 | 9,79 |

Данные размеров субмикронных частиц, полученные с применением анализатора размеров субмикронных частиц PSS Nicomp 380 DLS (Particle Sizing Systems, Port Richie, Fl) сразу после получения, приведены в табл. 1. Средний размер частиц наноэмульсии TDFH-соединение 21, измеренный в виде IWMD, не изменялся и оставался в пределах спецификации для выпуска. Кроме того, 99% частиц, измеренных на всем протяжении исследования, имели диаметр, меньший или равный 400 нм.

Таблица 2

Определение размеров частиц наноэмульсии TDFH-соединение 21, которую хранили при 4°C, путем оптического измерения отдельных частиц с применением анализатора размеров частиц PSS Accusizer 780 SIS в диапазоне 0,5-500 микрон

| № колбы | Общее количество частиц с размером > порогового значения 0,5 микрон | Количество частиц с размером 5,02-50,45 микрон | Об. % всей эмульсии, занимаемый частицами с размером 5,02-50,45 микрон |
|----------------|---|--|--|
| 2 | 62145 | 690 | 0,899 |
| 16 | 58232 | 779 | 0,746 |
| 31 | 55441 | 544 | 0,714 |
| Среднее | 58606 | 671 | 0,786 |
| Ст. откл. | 3368 | 118,65 | 0,10 |
| % ОСО | 5,75 | 17,68 | 12,57 |

Данные размера частиц в диапазоне от 0,5 до 50 микрон получали с применением устройства, работающего по принципу светоблокировки, PSS 780 SIS (Particle Sizing Systems, Port Richie, FL) и приводили в табл. 2. Менее 0,8% от общего объема частиц составляли частицы с размером от 0,5 до 50 мкм, и основной объем частиц составляли частицы с размером меньше порогового значения 0,5 микрон.

Данные размера частиц и 99% кумулятивного распределения при 4 и 23°C приведены в табл. 3 и 4 соответственно.

Таблица 3

Стабильность частиц во времени для наноэмульсии TDFH-соединение 21, которую хранили при 4°C

| Время после получения (недели) | IWMD (нм) | Ст. откл. (нм) | СКО% | 99% кумулятивное распределение < (нм) |
|--------------------------------|-----------|----------------|------|---------------------------------------|
| 0 | 186,4 | 53,9 | 28,9 | 351,5 |
| 1 | 200,1 | 43,3 | 21,6 | 326,4 |
| 6 | 211,3 | 47,1 | 22,3 | 346,7 |
| 11 | 220,9 | 39,6 | 17,9 | 330,3 |
| 23 | 225,9 | 49,5 | 21,9 | 370,0 |

В случае хранения наноэмульсии TDFH-соединение 21 при 4°C средний размер частиц, измеренный в виде IWMD, изменялся очень медленно и оставался в пределах спецификации для выпуска. Кроме того, 99% частиц, измеренных на всем протяжении исследования, имели диаметр ≤ 400 нм.

Таблица 4

Данные стабильности размера частиц для наноэмульсии TDFH-соединение 21, которую хранили при 23°C

| Время после получения (недели) | IWMD (нм) | Стандартное отклонение (нм) | 99% кумулятивное распределение (нм) |
|--------------------------------|-----------|-----------------------------|-------------------------------------|
| 0 | 220,2 | 49,7 | <363 |
| 1 | 223,7 | 54,3 | <382,2 |
| 4 | 257,4 | 42,7 | <374,5 |
| 6 | 270,7 | 55,6 | <427,3 |
| 8 | 282,4 | 48,9 | <417,6 |
| 10 | 291,1 | 52,6 | <436,1 |
| 13 | 305,3 | 51,0 | <443,9 |
| 19 | 322,1 | 65,6 | <506,7 |
| 24 | 339,2 | 67,0 | <526,8 |

В случае хранения наноэмульсии TDFH-соединение 21 при 23°C средний размер частиц, измеренный в виде IWMD, медленно изменялся, но при этом оставался в пределах спецификации для выпуска. Кроме того, 99% частиц, измеренных на всем протяжении исследования, имели диаметр ≤ 530 нм.

Таблица 5

Изменение размера частиц и 99% кумулятивного распределения \leq со временем для наноэмульсии TDFH-соединение 21, которую хранили при 4 и 23°C

| Время после получения (недели) | IWMD (нм) при 4°C | IWMD (нм) при 23°C | 99% кумулятивное распределение < (нм) при 23°C | 99% кумулятивное распределение < (нм) при 4°C |
|--------------------------------|-------------------|--------------------|--|---|
| 0 | 186,4 | 220,0 | 363,0 | 351,5 |
| 1 | 200,1 | 223,7 | 382,2 | 326,4 |
| 6 | 211,3 | 270,7 | 427,3 | 346,7 |
| 10 | | 291,1 | 436,1 | |
| 11 | 220,9 | | | 330,3 |
| 13 | | 305,3 | 443,9 | |
| 23 | 225,9 | | | 370,0 |
| 24 | | 339,2 | 526,8 | |

Данные, приведенные выше в табл. 3, 4 и 5, наглядно демонстрируют, что наноэмульсия TDFH-соединение 21 остается в пределах спецификации для выпуска и спецификации в течение срока хранения при температуре хранения 4 и 23°C. Кроме того, тенденция, наблюдаемая в данных, указывает, что спецификация в течение срока хранения не превышает через 26 недель.

Пример 3. Эмульсия наночастиц тетрадекафтор-н-гексана (TDFH) и соединения 20а, полученная путем гомогенизации под высоким давлением.

Проводили эксперименты для исследования размера частиц эмульсии наночастиц TDFH и соединения 20а, размера частиц эмульсии наночастиц TDFH и соединения 20а при 4°C, стабильности размера частиц эмульсии наночастиц TDFH и соединения 20а при 23°C и изменения размера частиц и 99% кумулятивного распределения со временем для эмульсий TDFH-соединение 20а и TDFH-соединение 20а, которые хранили при 4°C.

6% Раствор соединения 20а (J. Tech Sales, Boca Raton, FL) (20 мл) готовили путем добавления 1,2 г аликвоты поверхностно активного вещества, разбавленной до отметки, соответствующей предварительно измеренному объему 20 мл, в стеклянной скитилляционной колбе водой для инъекций (NuPure производства NuSlope), и перемешивания при 5°C в течение 0,5 ч с применением небольшой крестообразной магнитной мешалки. Раствор являлся прозрачным при 5°C и его хранили в холодильнике (3°C). Указанный раствор можно хранить и применять для различных экспериментов. 6,25 мл Порцию раствора соединения 20а вносили в 15 мл колбу для сыворотки, снабженную небольшой бочкообразной магнитной мешалкой. Затем добавляли 1,52 мл (2,53 г) холодного (4°C) TDFH (Sigma Aldrich Co. St. Louis, MO), колбу закупоривали резиновой перегородкой и погружали в водяную баню со льдом (2°C), смесь перемешивали в течение 1 ч при указанной температуре.

Из холодильника доставали прямоугольный поддон из нержавеющей стали, содержащий охлаждающую баню для циркуляции через шприц с холодной термостатирующей рубашкой и отдельную охлаждающую баню для сосудов высокого давления, и обе охлаждающие бани заполняли водой со льдом. PV1, PV2 и PV3, каждый из которых представлял собой 125 мл сосуд, снабженный аксессуарами, как описано для более крупных сосудов, содержащих большие крестообразные магнитные мешалки, описанных в примере 2, снабжали крышками с подходящими входными и выходными портами с клапанами для продукта и газообразного азота. В PV1 вносили 10 мМ забуференный фосфатом (pH 7) раствор сахарозы (32% мас./об. сахарозы, 104 мл), сосуд помещали в охлаждающую емкость для PV1-PV3 и начинали перемешивание. Также в емкость помещали PV2 и PV3 и начинали перемешивание.

Гомогенизатор, соединенный с пневматическим насосом, очищали от остатков WFI, а затем промывали холодной WFI (25 мл). 10 мл Стеклообразные шприцы Porring & Sons со стеклянными поршнями и охлажденными термостатирующими рубашками соединяли с входным и выходным замочными фитингами Люэра гомогенизатора. Перепускной клапан гомогенизатора открывали и первичную эмульсию несколько раз переносили между выходным шприцем и выходным шприцем путем изменения положения поршней шприцев, причем конечное положение первичной эмульсии находилось во входном шприце. Перепускной клапан закрывали и применяли пневматическое устройство при скорости откачки 30 мл/мин. После полного переноса содержимого входного шприца в выходной шприц перепускной клапан быстро открывали и при помощи надавливания на поршень выходного шприца быстро переносили гомогенизованную первичную эмульсию обратно во входной шприц, затем перепускной клапан закрывали и проводили второй проход. Таким образом первичную эмульсию 20 раз пропускали через гомогенизатор. В конце указанной процедуры первичная эмульсия находилась в выходном шприце.

Выходной шприц отсоединяли от выходного порта гомогенизатора, соединяли с PV1 и первичную

эмульсию вводили при помощи шприца в PV1. В PV1 создавали давление с применением азота (~8-10 фунт/кв. дюйм (0,06-0,07 МПа)) и смесь перемешивали в течение 5 мин. В PV1 поддерживали давление азота, а PV2 сообщали с атмосферой. Перенос перемешанного раствора первичной эмульсии, смешанной с 32% раствором сахарозы, из PV1 в PV2 осуществляли за один гомогенизирующий проход. Затем 32 мм 0,8/0,2-микронный шприцевой фильтр Pall Sciences Acrodisc устанавливали между PV2 и PV3. В PV2 создавали давление с применением азота на уровне ~12 фунт/кв. дюйм (0,08 МПа) и PV3 сообщали с атмосферой для инициирования перемещения раствора из PV2 в PV3 с фильтрованием. Через ~5 мин давление увеличивали до 15 фунт/кв. дюйм (0,10 МПа) и через примерно 10 мин давление увеличивали до 25 фунт/кв. дюйм (0,17 МПа). Фильтрование требовало примерно 30-40 мин для завершения, и перенос являлся почти количественным.

В PV3, охлажденном до ~4°C, создавали давление азота на уровне примерно 8 фунт/кв. дюйм (0,06 МПа) и раствор перемешивали в течение ~15 мин. Затем лоток для колб Wheaton с 40 колбами для сыворотки объемом 2 мл (номинальный объем) с серыми крышками с выемкой из бутилкаучука доставали из холодильника. Оплетенную силиконовую трубку со внутренним диаметром 1/16" (0,2 см), снабженную на входной стороне замковым соединителем в виде конуса Люэра и снабженную на выходной стороне фитингом в виде канюли Люэра, соединенным с двойным соединителем в виде конуса Люэра, одноходовым запорным краном (в закрытом положении) и иглой 16 калибра на конце, соединяли с погружной трубкой запорного крана PV3. Давление в PV3 регулировали до 5 фунт/кв. дюйм (0,03 МПа) и первые 2 мл раствора отбрасывали. Затем колбы наполняли (группами по 10) путем снятия с колб крышек с выемкой, открывания и закрывания запорного крана на дальнем конце трубки, соединенной с PV3, и возвращения крышек с выемкой на место. После заполнения 10 колб их обжимали вручную. Указанную процедуру повторяли до израсходования раствора в PV3, в результате чего получали 34 колбы с примерным объемом содержимого 2,6-2,7 мл (~88-91% выход продукта). Колбы проверяли на герметичность и при необходимости повторно обжимали для обеспечения плотного обжима. Колбы хранили в холодильнике при 4°C для исследования стабильности.

Таблица 6

Определение размеров субмикронных частиц наноэмульсии TDFH-соединение 20а, которую хранили при 4°C, путем динамического светорассеяния с применением PSS Nicomp 380 DLS

| № колбы | IWMD (нм) | Стандартное отклонение (нм) | 99% кумулятивное распределение (нм) |
|------------------|--------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| 1 | 217,0 | 17,8 | <261,6 |
| 10 | 213,2 | 28,8 | <289,1 |
| 18 | 220,0 | 22,7 | <278,0 |
| 26 | 213,5 | 56,6 | <381,6 |
| 34 | 216,3 | 55,6 | <380,4 |
| Среднее | 216,0 | 36,3 (16,8%) | <318,1 |
| Ст. откл. | 2,79 | 18,5 | 58,2 |
| ОСО (%) | 1,29 | 51,0 | 18,3 |

Исследование размера частиц продукта сразу после получения проводили с применением анализатора размеров субмикронных частиц Nicomp 380 DLS (Particle Sizing Systems, Port Richie, FL) на 5 колбах с материалом, выбранных из всего набора заполненных колб.

Средний размер частиц наноэмульсии TDFH-соединение 20а, измеренный в виде IWMD, составлял примерно 216 нм и не сильно отличался в разных образцах. Кроме того, среднее значение 99% кумулятивного распределения наноэмульсии TDFH-соединение 20а составляло менее 318 нм.

Таблица 7

Определение размеров частиц наноземulsion TDFH-соединение 20a, которую хранили при 4°C. путем оптического измерения отдельных частиц с применением анализатора размеров частиц PSS Accusizer 780 SIS в диапазоне 0,5-500 микрон

| № колбы | Общее количество частиц с размером > порогового значения 0,5 микрон | Количество частиц с размером 5,02-50,45 микрон | Об.% всей эмульсии, занимаемый частицами с размером 5,02-50,45 микрон |
|----------------|---|--|---|
| 2 | 134919 | 422 | 1,12 |
| 16 | 182911 | 405 | 0,53 |
| 33 | 180519 | 296 | 1,12 |
| Среднее | 166116 | 374 | 0,923 |
| Ст. откл. | 27044 | 68,37 | 0,340 |
| %ОСО | 16,28 | 18,26 | 36,69 |

Определение размеров частиц в диапазоне от 0,5 до 50 микрон проводили путем метода светоблокировки с применением PSS Accusizer 780 SIS (Particle Sizing Systems, Port Richie, FL). В среднем примерно 0,9% от общего объема наноземulsion TDFH-соединение 20 составляли частицы с размером 5,02-50,45 микрон.

Таблица 8

Данные стабильности размера частиц для наноземulsion соединения TDFH-соединение 20a, которую хранили при 4°C*

| Время после получения | IWMD (нм) | | | Стандартное отклонение (нм) | | | 99% кумулятивное распределение < (нм) | | |
|-----------------------|--------------|-------------------|------|-----------------------------|-------------------|-------|---------------------------------------|-------------------|------|
| | Среднее (нм) | Среднее ст. откл. | ОСО | Среднее (нм) | Среднее ст. откл. | ОСО | Среднее (нм) | Среднее ст. откл. | ОСО |
| Недели | | | | | | | | | |
| 0 | 216,0 | 2,79 | 1,29 | 36,3 | 18,49 | 50,95 | 318,1 | 58,21 | 18,3 |
| 1 | 257,9 | 2,34 | 0,91 | 37,7 | 13,68 | 36,27 | 360,0 | 41,81 | 11,6 |
| 5 | 299,0 | 7,98 | 2,67 | 74,3 | 23,26 | 31,32 | 520,1 | 82,63 | 15,9 |
| 10 | 318,0 | 4,65 | 1,46 | 116,7 | 7,92 | 6,78 | 698,0 | 36,88 | 5,28 |
| 22 | 351,0 | 7,45 | 2,12 | 155,7 | 10,32 | 6,63 | 892,0 | 48,52 | 5,44 |

* N=3 для каждого контрольного момента времени.

Таблица 9

Изменение размера частиц и 99% кумулятивного распределения < со временем для наноземulsion TDFH-соединение 21 и TDFH-соединение 20a, которые хранили при 4°C*

| Время после получения (недели) | TDFH-соединение 21 IWMD (нм) при 4°C | TDFH-соединение 20a IWMD (нм) при 4°C | TDFH-соединение 21 99% кумулятивное распределение < (нм) при 4°C | TDFH-соединение 20a 99% кумулятивное распределение < (нм) при 4°C |
|--------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--|---|
| 0 | 186,4 | 216 | 351,5 | 318,1 |
| 1 | 200,1 | 257,9 | 326,4 | 360,0 |
| 5 | | 299,0 | | 520,1 |
| 6 | 211,3 | | 346,7 | |
| 10 | | 318,0 | | 698,0 |
| 11 | 220,9 | | 330,3 | |
| 22 | | 351,0 | | 892,0 |
| 23 | 225,9 | | 370,0 | |

* N=3 для каждого контрольного момента времени.

Пример 4. Эмульсия наночастиц DDFP и соединения 20a, полученная путем гомогенизации под высоким давлением.

Проводили эксперименты для исследования размеров субмикронных частиц наноземulsion DDFP-соединение 20a, полученных путем гомогенизации под высоким давлением. Наноземulsion получали

при помощи способа из примера 3, за исключением того что вместо TDFH использовали DDFP (Fluogomed, Round Rock, TX). Определение размеров субмикронных частиц проводили с применением анализатора размеров субмикронных частиц PSS Nicomp 380 DLS (Particle Sizing Systems, Port Richie, FL).

Таблица 10

Определение размеров субмикронных частиц наноэмульсии DDFP-DuPont соединение 20а, полученной путем гомогенизации под высоким давлением, с применением анализатора размеров субмикронных частиц Nicomp 380 DLS

| № колбы | IWMD (нм) | Стандартное отклонение нм, % | 99% кумулятивное распределение (нм) |
|----------------|--------------|------------------------------|-------------------------------------|
| 19 | 238 | 68,8, 28,9% | 446,8 |
| 7 | 234,8 | 52,4, 22,3% | 384,6 |
| Среднее | 236,4 | 60,6, 25,6% | 415,7 |

Средневзвешенный на интенсивность диаметр 236,4 нм и 99% кумулятивное распределение менее 415,7 нм, определенные при исследовании размеров субмикронных частиц наноэмульсии DDFP-соединение 20, по существу эквивалентны начальным значениям, полученным для наноэмульсии DDFP-соединение 21, TDFH-соединение 21 и TDFH-соединение 20а.

Пример 5. Эмульсия наночастиц DDFP и соединения 20а, полученная путем перемешивания на вортексе с последующей обработкой ультразвуком.

Проводили эксперименты для исследования размеров субмикронных частиц наноэмульсии DDFP-соединение 20а, полученных путем перемешивания на вортексе с последующей обработкой ультразвуком. Цилиндрическую стеклянную колбу общей вместимостью 262 мл оснащали плавучей магнитной мешалкой, крышкой с резьбой, снабженной двумя входными портами для газа и комбинацией двухпозиционного шарового клапана с расположенным в нижней части входом с погружной трубкой, и продували сухим сверхчистым газообразным азотом. Затем в 262 мл колбе смешивали 210 мл водного (WFI, NuPure производства Nuclone) забуференного фосфатом (10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 6,9) раствора сахарозы (30% мас./об.) и раствор соединения 20 (J. Tech Sales, Boca Raton, FL) (0,672 г в 10,68 мл отфильтрованной на 0,2-микронном фильтре дистиллированной деионизированной воды) и смесь перемешивали при охлаждении до 4°C. После перемешивания в течение 5 мин в сосуде создавали давление с применением азота уровня 3 фунт/кв. дюйм (0,02 МПа). Один из выходных портов шарового клапана соединяли с трубкой Dow Corning Silastic® (внутренний диаметр 1/8" (0,3 см)), которую соединяли с 3-ходовым стерильным одноразовым запорным краном через фитинг Люэра, один из портов которого соединяли с 1/8" (0,3 см) переходником-елочкой. Два оставшихся порта оснащали 10 мл стерильным одноразовым шприцем Becton & Dickinson (Franklin Lakes, NJ) и 1,5" (3,8 см) стерильной одноразовой иглой 18 калибра.

Устанавливали положение трехходового запорного крана, обеспечивающее перекачивание раствора из сосуда в шприц до достижения объема содержимого шприца 7,8 мл. Затем положение запорного крана устанавливали таким образом, чтобы обеспечить доставку раствора из шприца через иглу 18 калибра. В 25 установленных в лотке колб для сыворотки номинальным объемом 5 мл (общая вместимость 9 мл) (которые продували сухим газообразным азотом, снабжали крышками из галобутилового каучука и выдерживали в холодильнике при 4°C в течение 1 ч) вносили 7,8 мл аликвоты раствора путем небольшого приподнятия крышки, расположения конца иглы в горлышке колбы, надавливания на поршень шприца и быстрого возвращения крышки на место. После заполнения всех колб раствором в каждую из колб быстро вносили холодный (~0°C) DDFP (0,156 г, 0,089 мл) с применением 0,5 мл шприца-ручки Lo Dose U-100 производства Becton & Dickinson и колбы сразу закупоривали и обжимали.

Для получения наночастиц содержимое колбы перемешивали на вортексе при 4500 об/мин в течение 1 мин в вертикальном положении, в течение 1 мин в перевернутом положении и в течение 1 мин в вертикальном положении. Затем колбу располагали горлышком вверх по центру ванны для ультразвуковой очистки VWR Aquasonic 75HT и обрабатывали ультразвуком в течение 5 мин. Вторую колбу обрабатывали таким же образом и исследовали размер и распределение частиц с применением анализатора размеров субмикронных частиц PSS Nicomp 380 DLS (Particle Sizing Systems, Port Richie, FL).

Таблица 11

Определение размеров субмикронных частиц наноэмульсии DDFP-соединение 20а, полученной путем перемешивания на вортексе и обработки ультразвуком, с применением анализатора размеров субмикронных частиц Nicomp 380 DLS

| № колбы | IWMD (нм) | Стандартное отклонение нм, % | 99% кумулятивное распределение (нм) |
|----------------|--------------|------------------------------|-------------------------------------|
| 2 | 274 | 95,1, 34,7% | 578 |
| 22 | 275 | 105,3, 38,3% | 622 |
| Среднее | 274,5 | 100,2, 36,5% | 600 |

Средний диаметр 274,5 нм и 99% кумулятивное распределение менее 600 нм, определенные при исследовании размеров субмикронных частиц наноэмульсии DDFP-соединение 20а, превышали исходные значения, полученные для наноэмульсии DDFP-соединение 21, TDFH-соединение 21 и TDFH-соединение 20а, но находились в пределах спецификации для выпуска и спецификации в течение срока хранения для наноэмульсии, описанных в настоящей заявке.

Состав предназначен для поглощения кислорода перфторуглеродом в областях с повышенным содержанием кислорода и для высвобождения кислорода после доставки к тканям с дефицитом кислорода, приводящим к низкому напряжению кислорода (гипоксические ткани). Следовательно, когда состав вводят в среду с повышенным содержанием кислорода или в среду, в которой концентрация кислорода превышает концентрацию в эмульгированном перфторуглероде, состав сперва поглощает растворенный кислород из раствора, в котором он присутствует. Когда частицы наноэмульсии переносят к гипоксическим тканям или тканям, в которых концентрация растворенного кислорода ниже концентрации в наночастицах, кислород высвобождается из наночастиц благодаря физическому градиенту концентрации кислорода. Для оценки способности состава согласно настоящему примеру поглощать кислород из водного раствора проводили исследование *in vitro* с применением установки, показанной на фиг. 7. Мерный стакан с термостатирующей рубашкой, содержащий примерно 200 мл 0,9% солевого раствора и мешалку, соединяли с водяной баней с циркуляцией (Темп.=37±0,3°C) и помещали на плиту смесителя (Скорость=550 об/мин). Верхнюю часть мерного стакана закрывали резиновой крышкой, которая имела отверстие для доступа зонда для определения растворенного кислорода Oakton DO 110 (Vernon Hills, IL) и отверстие меньшего размера для введения состава. После уравнивания показаний температуры и растворенного кислорода через небольшое отверстие для доступа в 0,9% солевой раствор вводили 5 мл состава. Затем отверстие для доступа герметизировали с применением заглушки Люэра и верх сосуда оборачивали пленкой Parafilm для предотвращения попадания кислорода в сосуд. Показания растворенного кислорода получали в течение 90 мин с интервалом 30 с и автоматически переносили на портативный компьютер с применением соединения с последовательным портом на датчике растворенного кислорода и поставляемого поставщиком программного обеспечения для сбора данных CyberComm Portable. Отчетливое снижение уровня кислорода в течение периода измерения в графическом виде показано на фиг. 8. Соответствующий график с применением контрольного солевого раствора не демонстрировал снижение уровня растворенного кислорода за тот же период.

Пример 6. Применение поверхностно-активной системы фосфолипидов на основе C16 для получения наноэмульсии DDFP.

Проводили эксперименты для исследования размеров субмикронных частиц наноэмульсии DDFP, полученной с применением поверхностно-активной системы фосфолипидов на основе пальмитоила. 22 мл Аликвоту пропиленгликоля в 50 мл мерном стакане при перемешивании нагревали до 55°C. Следовательно при перемешивании добавляли 1,2-дидипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (399 мг), натриевую соль 1,2-пальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-5000] (305 мг) и 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (45,88 мг) и смесь перемешивали до полного растворения фосфолипидов (5-15 мин). Затем раствор фосфолипидов в пропиленгликоле по каплям в течение примерно 2 мин при перемешивании добавляли к смеси вода/глицерин 95/5 об./об. (200,7 мл), содержащей одноосновный фосфат натрия•H₂O (173,9 мг) и безводный двухосновный фосфат натрия (137,87 мг), при 55°C. Раствор перемешивали в течение 5 мин после добавления раствора фосфолипидов в глицерине. Раствор сразу фильтровали, продавливая через 32 мм 0,2-микронный фильтр Pall Sciences GN Polyrp® в 250 мл бутылку, которую сразу продували сухим ультрачистым азотом. Раствору давали остыть до температуры окружающей среды. Затем в колбы для сыворотки номинальным объемом 5 мл (фактическая вместимость 9 мл) вносили 7,56 мл аликвоты суспензии фосфолипида, а затем свободное пространство над эмульсией продували сухим ультрачистым азотом и колбы закупоривали крышками из галобутилового каучука. Закупоренные колбы (в лотках) выдерживали в холодильнике при 4°C до приведения температуры содержимого колб до указанной температуры. Затем лотки доставали, в колбы вносили DDFP (Fluoromed, Round Rock, TX) и колбы обжимали, как описано в примере 5. Наноэмульсию получали путем перемешивания на вортексе и обработкой ультразвуком (в течение различных периодов

времени), как описано в примере 5. Время обработки ультразвуком составляло 2, 8 и 16 мин.

Таблица 12

Определение размеров субмикронных частиц наноэмульсии DDFP-DPPC-
DPPE-DPPE-MPEG-5000, полученной путем перемешивания на вортексе и об-
работки ультразвуком смешанных компонентов

| Обработка образца | IWMD (нм) | Ст. откл. (нм) | % Ст. откл. | 99% распределение < (нм) | χ^2 | VWMD* (нм) | NWMD* (нм) |
|------------------------------------|------------|----------------|--------------|--------------------------|-------------|------------|------------|
| Вортекс 1 мин Ультразвук 2 мин | 396 | 163,8 | 41,41 | 950,7 | 0,11 | 451,8 | 201,3 |
| Вортекс 1 мин Ультразвук 8 мин | 372 | 139,7 | 37,51 | 830,1 | 0,12 | 414,2 | 222,3 |
| Вортекс 1 мин Ультразвук 16 мин | 360 | 103,7 | 28,81 | 674,6 | 0,58 | 386,9 | 286 |

* VWMD=Средневзвешенный на объем диаметр, NWMD=Средневзвешенный на количество частиц диаметр.

Согласно данным из табл. 12 наноэмульсия, полученная после обработки ультразвуком в течение 16 мин, характеризуется оптимальным значением средневзвешенного на интенсивность диаметра, и значение 99% кумулятивного распределения < сравнимо с желаемым значением для наноэмульсии DDFP, полученной с применением поверхностно-активных систем на основе перфторуглеродов.

Пример 7. Получение наноэмульсии DDFP с применением системы фосфолипидов на основе C14 в качестве поверхностно-активного вещества и обработки ультразвуком колб со смесью компонентов.

22 мл Аликвоту пропиленгликоля в 50 мл мерном стакане при перемешивании нагревали до 55°C. Последовательно при перемешивании добавляли 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (677,9 мг), натриевую соль 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (174 мг) и 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (50,95 мг) и смесь перемешивали до полного растворения фосфолипидов (~15 мин). Затем раствор фосфолипидов в пропиленгликоле по каплям в течение примерно 2 мин при перемешивании добавляли к смеси вода/глицерин 95/5 об./об. (200,7 мл), содержащей одноосновный фосфат натрия•H₂O (173,9 мг) и безводный двухосновный фосфат натрия (137,87 мг), при 55°C. Раствор перемешивали в течение 5 мин после добавления раствора фосфолипидов в глицерине. Раствор сразу фильтровали, продавливая через 32 мм 0,2-микронный фильтр Pall Sciences GN Polurgo® в 250 мл бутылку, которую сразу продували азотом. Раствору давали остыть до температуры окружающей среды. Затем в колбы для сыrovотки номинальным объемом 5 мл (фактическая вместимость 9 мл) вносили 7,56 мл аликвоты суспензии фосфолипида, а затем свободное пространство над эмульсией продували сухим ультрачистым азотом и колбы закупоривали крышками из галобутилового каучука. Закупоренные колбы (в лотках) выдерживали в холодильнике при 4°C до приведения температуры содержимого колб до указанной температуры. Затем лотки доставали, в колбы вносили DDFP (Fluogomed, Round Rock, TX) и колбы обжимали, как описано в примере 5. Наноэмульсию получали путем перемешивания колб на вортексе и обработки ультразвуком, как описано в примере 5.

Таблица 13

Данные размеров субмикронных частиц для состава
DDFP-фосфолипиды-30% забуференная сахароза из примера 7

| IWMD (нм) | VWMD (нм) | NWMD (нм) | Стандартное отклонение (%) | χ^2 | IW99% CUM< (нм) | VW99% CUM< (нм) |
|-----------|-----------|-----------|----------------------------|----------|-----------------|-----------------|
| 301,6 | 313,6 | 240,7 | 25,9 | 0,22 | 532,4 | 553,7 |

Оценивали способность состава поглощать кислород из областей с повышенным содержанием кислорода, как описано для оценки состава в примере 5. Отчетливое снижение уровня кислорода в течение периода измерения в графическом виде показано на фиг. 9. Соответствующий график с применением контрольного солевого раствора не демонстрировал снижение уровня растворенного кислорода за тот же период.

Пример 8. Получение наноэмульсии DDFP с применением системы фосфолипидов на основе C14 в комбинации с соединением 20a (DuPont FS-3100) в качестве поверхностно-активного вещества и обработки колб со смесью компонентов ультразвуком.

В состав, включающий 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (677,9 мг), натриевую соль 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (174 мг) и 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (50,95 мг), добавляли чистое соединение 20a DuPont Capstone FS-3100 (16 мкл, 23 мг, 0,3% мас./об.), а затем DDFP (0,153 г, 89 мкл, 2% мас./об.). Колбу сразу

перемешивали на вортексе в течение 1 мин в вертикальном положении и в течение 1 мин в перевернутом положении. Затем колбу обрабатывали ультразвуком в течение 8 мин в ванне для ультразвуковой очистки VWR Aquasonic 75HT. Затем из колбы отбирали 5,2 мл аликвоту эмульсии, 0,1 мл аликвоту использовали для определения размеров частиц с применением анализатора размеров субмикронных частиц PSS Nicomp 380 DLS и 5 мл аликвоту использовали в исследовании поглощения кислорода, описанном выше. Данные размеров частиц для указанного состава после обработки ультразвуком приведены в табл. 14.

Таблица 14

Данные размеров субмикронных частиц для состава DDFP-Capstone FS-3100-фосфолипиды-30% забуференная сахароза из примера 7

| IWMD (нм) | VWMD (нм) | NWMD (нм) | Стандартное отклонение (%) | χ^2 | IW99% CUM< (нм) | VW99% CUM< (нм) |
|--------------|--------------|--------------|----------------------------------|----------|-----------------------|-----------------------|
| 204,1 | 171,1 | 105,1 | 34,9 | 0,25 | 432,3 | 363,7 |

Отчетливое снижение уровня кислорода в течение периода измерения в графическом виде показано на фиг. 10. Соответствующий график с применением контрольного солевого раствора не демонстрировал снижение уровня кислорода за тот же период.

Пример возможного применения 1. Получение наноэмульсии DDFP с применением системы фосфолипидов на основе C14 в качестве поверхностно-активного вещества и гомогенизации первичной эмульсии с последующим гомогенизирующим пропусканием и фильтрованием с отделением субмикронных частиц.

22 мл Аликвоту пропиленгликоля в 50 мл мерном стакане при перемешивании нагревали до 55°C. Последовательно при перемешивании добавляли 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (677,9 мг), натриевую соль 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (174 мг) и 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (50,95 мг) и смесь перемешивали до полного растворения фосфолипидов (~15 мин). Раствору давали остыть до температуры окружающей среды, а затем добавляли воду для инъекций (20 мл), охлажденную до 10°C, и холодный DDFP (4,51 г, 2,61 мл) и смесь быстро перемешивали в течение 30 мин при 10°C. Полученный материал подвергали дискретной гомогенизации с применением ручного гомогенизатора Kirkland Products при 5°C в общей сложности в течение 20 проходов. Затем указанный материал добавляли к раствору глицерина в воде для инъекций. Затем наноэмульсию при перемешивании добавляли к 205,4 мл 30% раствора сахарозы и смесь перемешивали в течение 10 мин в атмосфере азота (5 фунт/кв. дюйм (0,03 МПа)). Затем раствор пропускали через гомогенизатор во второй сосуд, который выдерживали при температуре 2-5°C, после чего смесь перемешивали в течение 15 мин, фильтровали через 0,8/0,2-микронный фильтр Pall Sciences Acropak 200 в третий сосуд при 2-5°C и после переноса перемешивали в течение 15 мин при указанной температуре. Затем материал вносили в колбы Wheaton номинальным объемом 5 мл, закупоривали серыми крышками из галобутилового каучука, обжимали и хранили.

Пример возможного применения 2. Получение наноэмульсии TDFH с применением системы фосфолипидов на основе C14 в качестве поверхностно-активного вещества.

22 мл Аликвоту пропиленгликоля в 50 мл мерном стакане при перемешивании нагревали до 55°C. При перемешивании добавляли фосфолипиды из примера 1 и смесь перемешивали до растворения фосфолипидов (~15 мин). Затем раствор фосфолипидов в пропиленгликоле по каплям в течение примерно 2 мин при перемешивании добавляли к смеси вода/глицерин 95/5 об./об. (200,7 мл), содержащей одноосновный фосфат натрия•Н₂O (173,9 мг) и безводный двухосновный фосфат натрия (137,87 мг), при 55°C. Раствор перемешивали в течение 5 мин после добавления раствора фосфолипидов в глицерине. Раствор немедленно фильтровали, продавливая через 32 мм 0,2-микронный фильтр Pall Sciences GH Polypro® в 250 мл бутылку, которую сразу продували азотом. Раствору давали остыть до температуры окружающей среды. Затем в колбы для сыворотки номинальным объемом 5 мл (фактическая вместимость 9 мл) вносили 7,56 мл аликвоты суспензии фосфолипида, а затем свободное пространство над эмульсией продували сухим ультрачистым азотом и закупоривали крышками из галобутилового каучука. Закупоренные колбы (в лотках) выдерживали в холодильнике при 4°C до приведения температуры содержимого колб до указанной температуры. Затем лотки доставали, в колбы вносили TDFH (Sigma Aldrich Co. St. Louis, MO) и колбы обжимали, как описано в примере 5. Наноэмульсию получали путем перемешивания колб на вортексе и обработки ультразвуком, как описано в примере 5.

Пример возможного применения 3. Получение наноэмульсии DDFP с применением системы фосфолипидов на основе C14 с соединением 20a в качестве вспомогательного поверхностно-активного вещества и обработки ультразвуком колб со смесью компонентов.

Применяли способы из примера 6, за исключением того что поверхностно-активная система содержала 30 мол.% соединения 20a в дополнение к системе на основе C14-фосфолипидов. Далее наноэмульсию получали аналогичным образом. Процедуры и техники, аналогичные приведенным в примерах 1-6 и примерах возможного применения 1 и 2, можно применять для получения наноэмульсий на основе по-

верхностно-активных систем фосфолипидов на основе лауроила (C12).

Хотя были подробно описаны предпочтительные варианты реализации согласно настоящему изобретению, следует понимать, что специалист в данной области способен разрабатывать модификации и адаптации указанных вариантов реализации без отступления от объема настоящего изобретения.

Пример возможного применения 4. Получение наноэмульсии DDFP с применением системы фосфолипидов на основе C12 в качестве поверхностно-активного вещества и гомогенизации первичной эмульсии с последующим пропусканием через гомогенизатор и фильтрованием с отделением субмикронных частиц.

22 мл Аликвоту пропиленгликоля в 50 мл мерном стакане при перемешивании нагревали до 55°C. Последовательно при перемешивании добавляли 1,2-дидодеканоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (677,9 мг), натриевую соль 1,2-дидодеканоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (174 мг) и 1,2-дидодеканоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (50,95 мг) и смесь перемешивали до полного растворения фосфолипидов (~15 мин). Раствору давали остыть до температуры окружающей среды, а затем добавляли воду для инъекций (20 мл), охлажденную до 10°C, и холодный DDFP (4,51 г, 2,61 мл) и смесь быстро перемешивали в течение 30 мин при 10°C. Полученный материал подвергали гомогенизации с применением ручного гомогенизатора Kirkland Products при 5°C в общей сложности в течение 20 проходов. Затем указанный материал добавляли к раствору глицерина в воде для инъекций. Затем наноэмульсию при перемешивании добавляли к 205,4 мл 30% раствора сахарозы и смесь перемешивали в течение 10 мин в атмосфере азота (5 фунт/кв. дюйм (0,03 МПа)). Затем раствор пропускали через гомогенизатор во второй сосуд, который выдерживали при температуре 2-5°C, после чего смесь перемешивали в течение 15 мин, фильтровали через 0,8/0,2-микронный фильтр Pall Sciences Acropak 200 в третий сосуд при 2-5°C и после переноса перемешивали в течение 15 мин при указанной температуре. Затем материал вносили в колбы Wheaton номинальным объемом 5 мл, закупоривали серыми крышками из галобутилового каучука, обжимали и хранили.

Настоящее изобретение описано в настоящей заявке при помощи предпочтительных вариантов реализации со ссылками на фигуры, в которых одинаковые числа представляют собой одни и те же или аналогичные элементы. В настоящем описании ссылка на "один из вариантов реализации", "вариант реализации" или аналогичные фразы означает, что конкретная отличительная особенность, структура или характеристика, описанная в связи с вариантом реализации, включена по меньшей мере в один из вариантов реализации согласно настоящему изобретению. Таким образом, применение в настоящем описании фраз "в одном из вариантов реализации", "в варианте реализации" или аналогичных фраз необязательно может ссылаться на один и тот же вариант реализации. Описанные отличительные особенности, структуры или характеристики согласно настоящему изобретению можно комбинировать любым подходящим способом в одном или более вариантах реализации. В настоящем описании описаны многочисленные конкретные детали для обеспечения полного понимания вариантов реализации настоящего изобретения. Тем не менее специалисту в соответствующей области понятно, что композицию и/или способ согласно настоящему изобретению можно использовать без одной или более конкретных деталей или с другими способами, компонентами, материала и т.п. В других случаях хорошо известные структуры, материалы или операции не показаны или не описаны подробно во избежание неясности аспектов настоящего изобретения. Схематичные блок-схемы, как правило, представлены в виде логических блок-схем (например, фиг. 1, 2, 3, 4 и 5). Таким образом, изображенный порядок и отмеченные стадии описывают один из вариантов реализации представленного способа. Могут быть предложены другие стадии и способы, которые являются функциональными или логическими эквивалентами, или эффекты на одну или более стадии представленного способа или их части. Кроме того, применяемые формат и символы представлены для объяснения логических стадий способа и не ограничивают объем способа. Хотя в блок-схемах можно использовать различные типы стрелок и линий, они не ограничивают объем соответствующего способа (например, фиг. 1, 2, 3, 4 и 5). Действительно некоторые стрелки или другие соединители можно применять только для указания логической последовательности способа. Например, стрелка может указывать период ожидания или мониторинга неопределенной продолжительности между указанными стадиями изображенного способа. Кроме того, порядок, в котором осуществляют конкретный способ, может строго соответствовать или не соответствовать показанному порядку соответствующих стадий.

В настоящем описании и в пунктах прилагаемой формулы изобретения формы единственного числа включают формы множественного числа, если контекст явно не диктует иное.

Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в настоящей заявке, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области. Хотя любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в настоящей заявке, также можно применять в практике или исследованиях согласно настоящему изобретению, в настоящей заявке описаны предпочтительные способы и материалы. В дополнение к конкретному описанному порядку способы, описанные в настоящей заявке, можно осуществлять в любом порядке, который логически возможен.

Включение посредством ссылки.

В настоящем описании представлены ссылки на другие документы, такие как патенты, заявки на

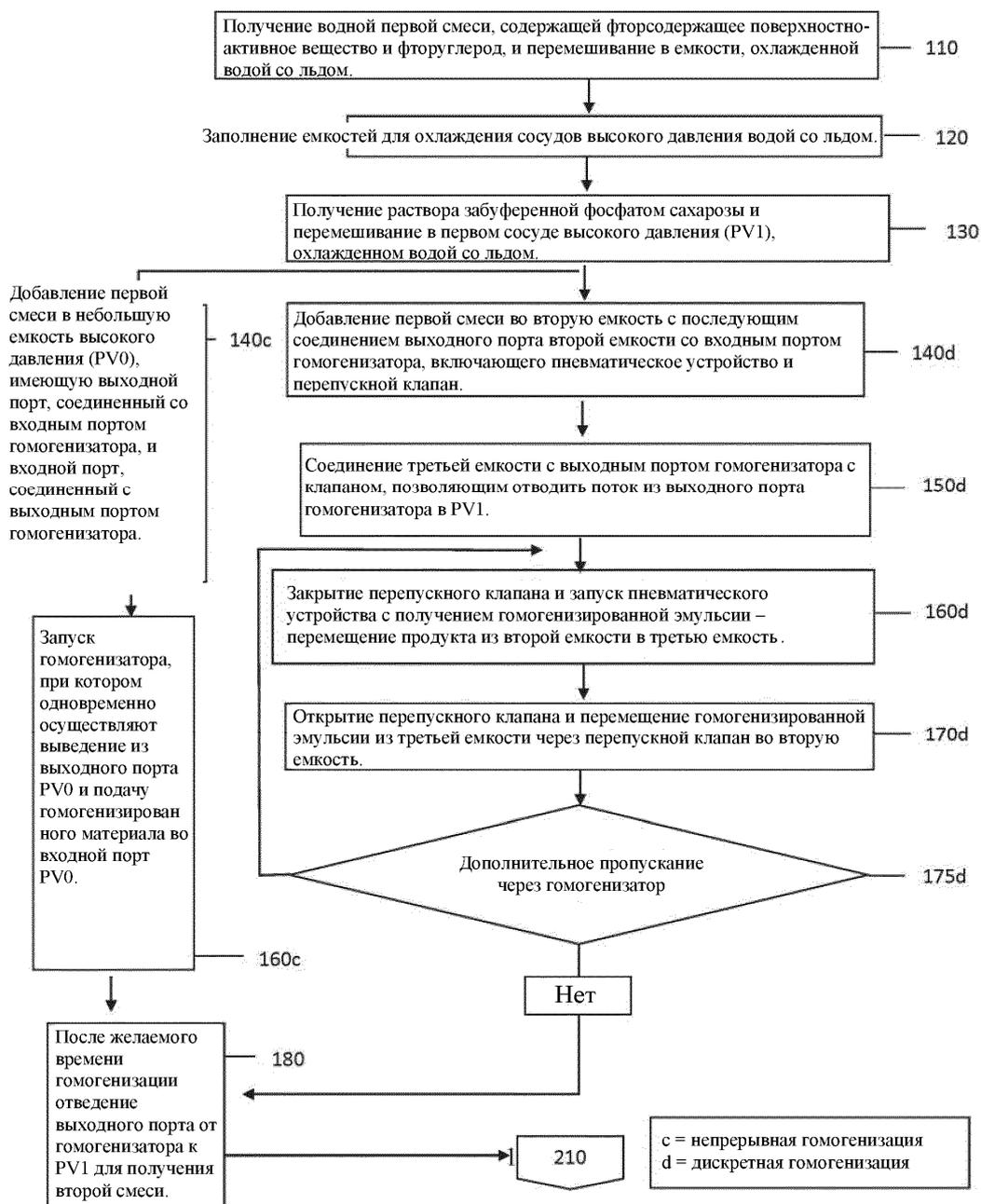
патенты, опубликованные патенты, журналы, книги, документы, веб-контент. Все такие документы включены в настоящую заявку во всей полноте во всех отношениях посредством ссылок. Любой материал или его часть, который включен в настоящую заявку посредством ссылки, но который противоречит существующим определениям, утверждениям или другим материалам настоящей заявки, явно изложенным в настоящей заявке, включен только в той степени, в которой не возникает конфликта между включенным материалом и материалом настоящей заявки. В случае конфликта он разрешается в пользу настоящего описания, как предпочтительного описания.

Эквиваленты.

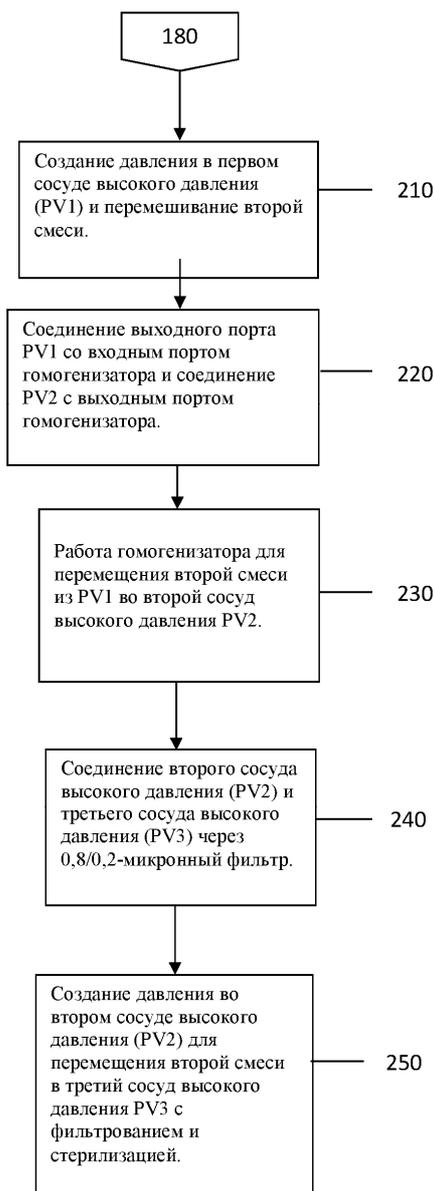
Типовые примеры предназначены для иллюстрации изобретения и не ограничивают или не должны считаться ограничивающими объем настоящего изобретения. Действительно различные модификации согласно настоящему изобретению и многие другие варианты реализации настоящего изобретения, в дополнение к представленным и описанным в настоящей заявке, станут очевидны специалистам в данной области из полного содержания настоящего документа, включая примеры и ссылки на научную и патентную литературу, включенные в настоящую заявку. Примеры содержат важную дополнительную информацию, иллюстративные примеры и руководство, которые можно адаптировать к практической реализации различных вариантов реализации настоящего изобретения и их эквивалентов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

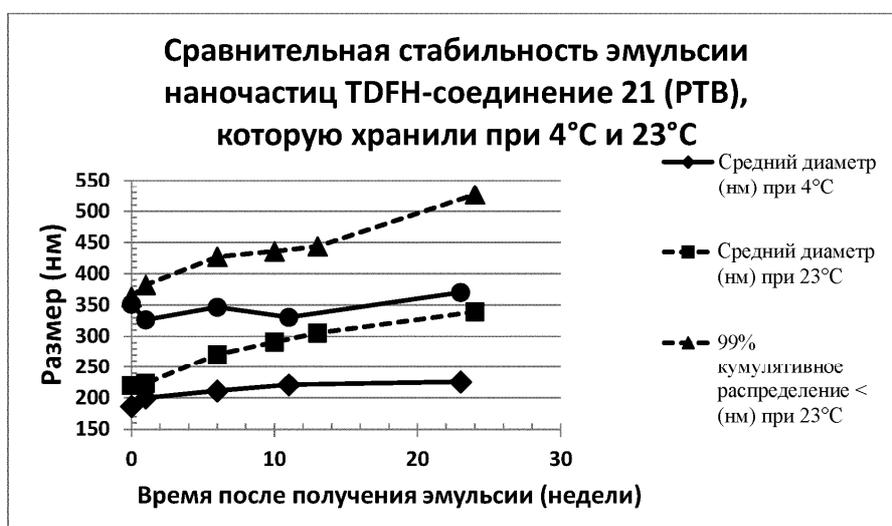
1. Способ получения водной наноэмульсии, включающий
 - получение первой водной смеси, содержащей один или более перфтор-*n*-гексил-олигоэтиленокси-спиртов, в которых олигоэтиленокси-фрагменты имеют длину от 1 до 16 звеньев, и фторуглерод;
 - пропускание первой смеси через гомогенизатор, содержащий перепускной клапан и пневматическое устройство, из первой емкости во вторую емкость и обратно в первую емкость, причем указанный перепускной клапан открыт;
 - запуск пневматического устройства при закрытом перепускном клапане с получением гомогенизированной первичной эмульсии;
 - подачу гомогенизированной первичной эмульсии в раствор сахарозы, находящийся в первом сосуде высокого давления, с получением второй смеси;
 - соединение первого сосуда высокого давления со входным портом гомогенизатора;
 - соединение второго сосуда высокого давления с выходным портом гомогенизатора;
 - работу указанного пневматического устройства при закрытом перепускном клапане для получения наноэмульсии до тех пор, пока вторая смесь не переместится полностью во второй сосуд высокого давления; и
 - создание давления во втором сосуде высокого давления для пропускания наноэмульсии через 0,8/0,2-микронный фильтр в третий сосуд высокого давления со стерилизацией указанной наноэмульсии.
2. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный раствор сахарозы содержит одно или более из фармацевтически приемлемых буферных солей, вискогенов и микробиоцидных агентов.
3. Способ по п.2, отличающийся тем, что указанный фторуглерод составляет от 1 до 10 мас.% от общей массы наноэмульсии и указанный перфтор-*n*-гексил-олигоэтиленокси-спирт составляет от 0,10 до 7,5 мас.% от общей массы наноэмульсии.
4. Способ по п.3, отличающийся тем, что указанный фторуглерод включает тетрадекафторгексан.
5. Способ по п.3, отличающийся тем, что указанный фторуглерод состоит из тетрадекафторгексана, выбранного из или включающего два или более возможных структурных изомера, присутствующих в любых соотношениях.
6. Способ по п.3, отличающийся тем, что указанный фторуглерод включает додекафторпентан.
7. Способ по п.3, отличающийся тем, что указанный фторуглерод состоит из додекафторпентана, выбранного из или включающего два или более возможных структурных изомера, присутствующих в любых соотношениях.



Фиг. 1



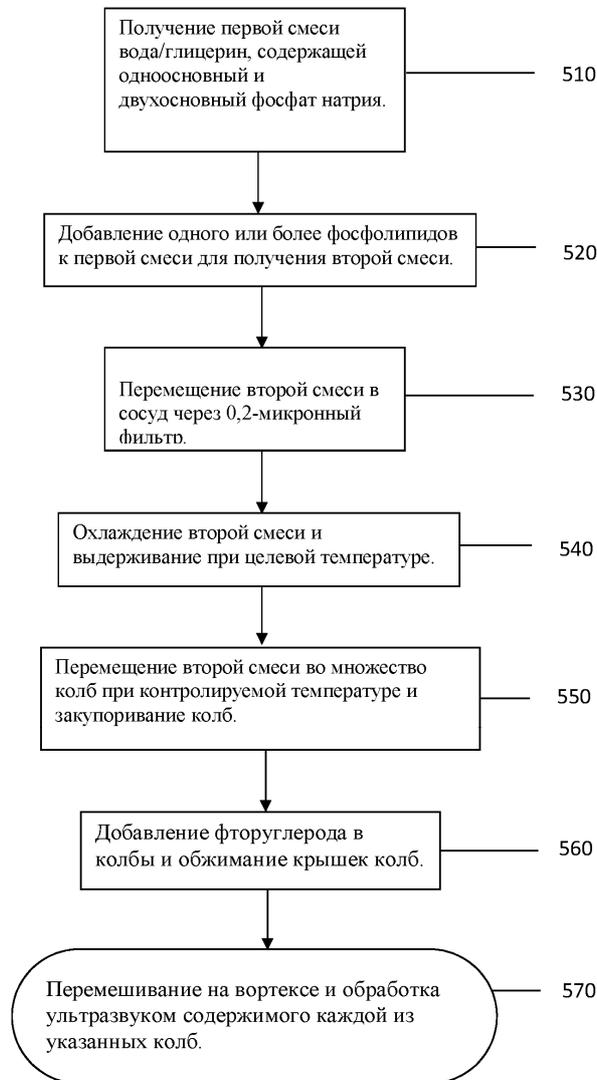
Фиг. 2



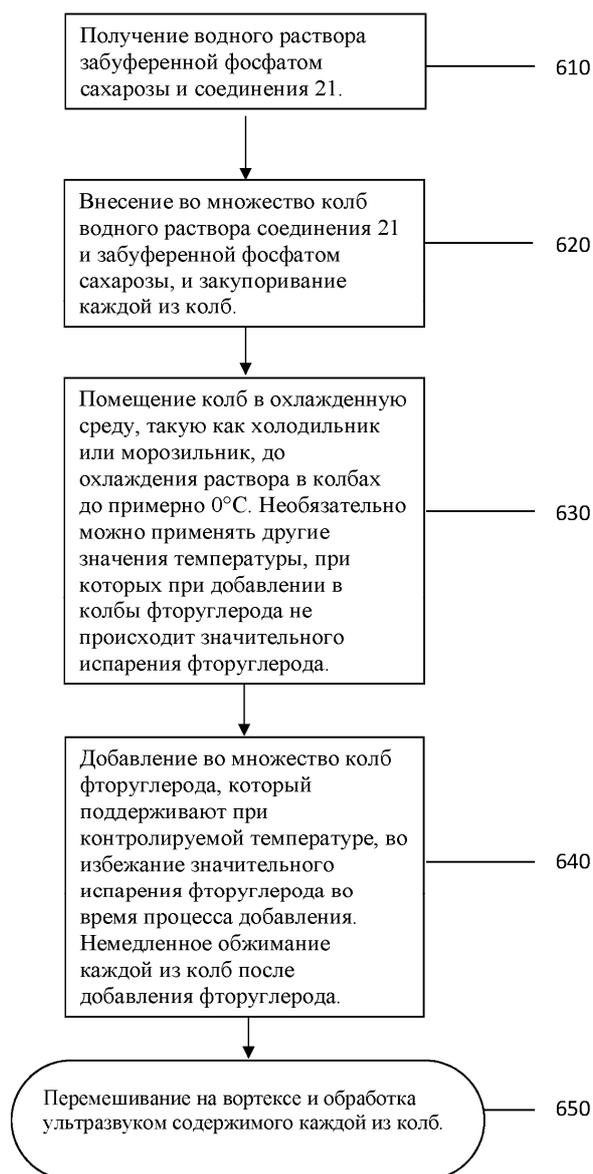
Фиг. 3



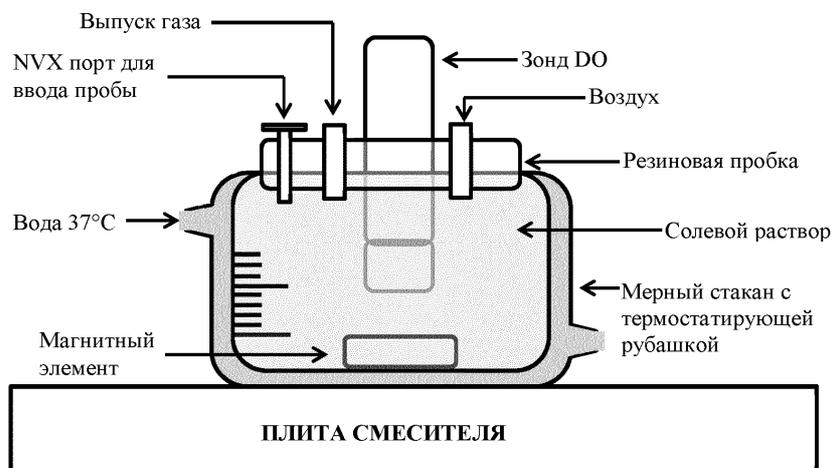
Фиг. 4



Фиг. 5

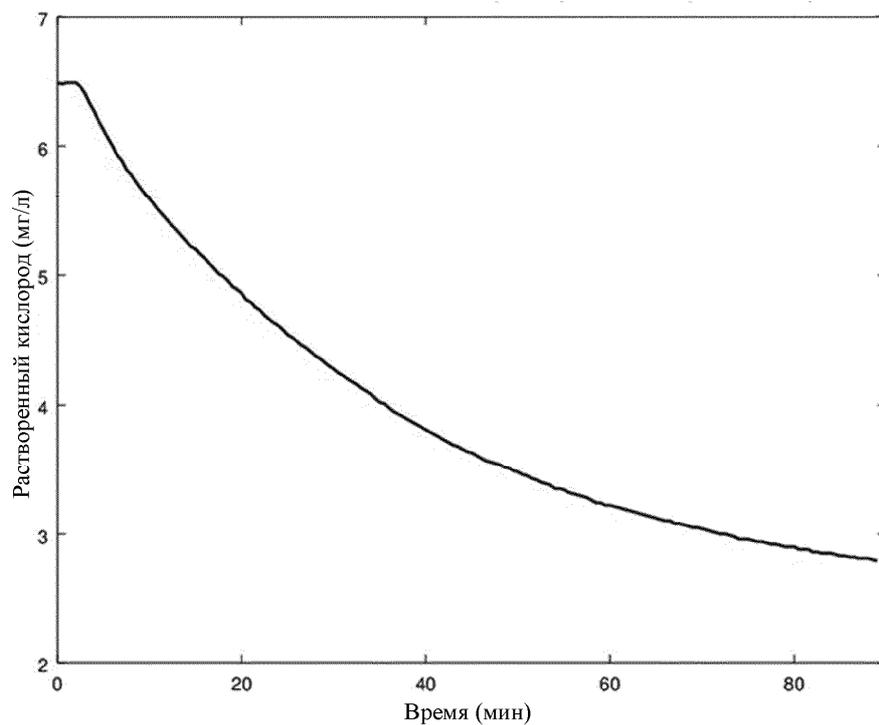


Фиг. 6



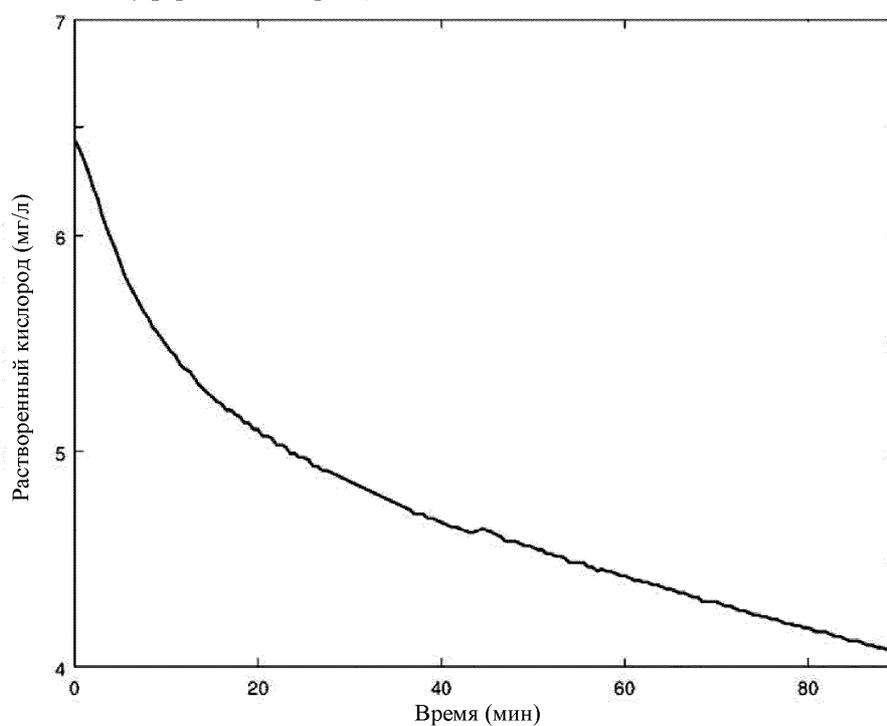
Фиг. 7

Снижение уровня растворенного кислорода в водном растворе после добавления состава из примера 5 (DDFP-соединение 20a)



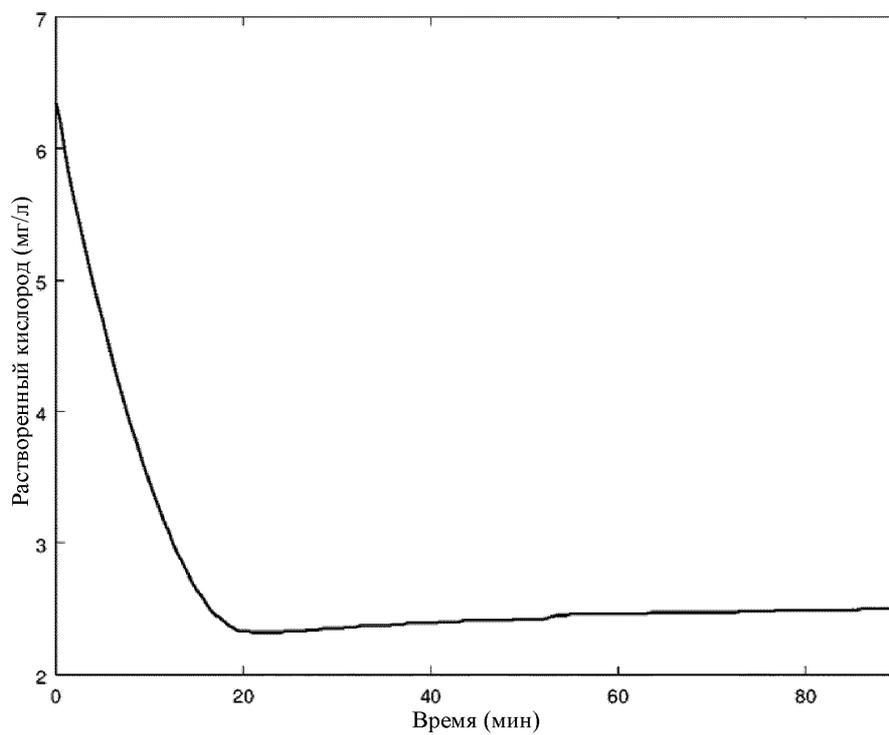
Фиг. 8

Снижение уровня растворенного кислорода в водном растворе после добавления состава из примера 7 (DDFP-C14 фосфолипиды-буферная сахароза)



Фиг. 9

Снижение уровня растворенного кислорода в водном растворе после добавления состава из примера 8 (DDFP-C14 фосфолипиды-соединение 20а-буферная сахароза)



Фиг. 10



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2