(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118662440 A
(43)申请公布日 2024.09.20

(21)申请号 202410295358.5
(22)申请日 2016.12.20
(30)优先权数据
62/270,226 2015.12.21 US
(62)分案原申请数据
201680081126.3 2016.12.20
(71)申请人 努沃克斯制药有限责任公司
地址 美国
申请人 埃文·C·昂格尔
(72)发明人 E·C·昂格尔 E·R·玛利尼里
(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
专利代理师 于巧玲
(51)Int.Cl.
A61K 9/107(2006.01)
A61K 9/00(2006.01)
A61K 31/02(2006.01)
A61K 47/69(2017.01)
A61K 47/06(2006.01)
A61K 47/02(2006.01)
A61K 47/24(2006.01)
A61K 47/10(2017.01)
A61P 7/08(2006.01)
C08L 27/12(2006.01)
B82Y 5/00(2011.01)

权利要求书6页 说明书26页 附图9页

(54)发明名称

氟碳化合物纳米乳液的组合物及其制备方法和用途

(57)摘要

本发明提供了包含一种或多种含氟表面活性剂和磷脂的氟碳化合物纳米乳液的新组合物，及其制备方法和用于增强氧递送的用途。

CN 118662440 A

1.一种形成纳米乳液的方法,包括:

制备含有PEG调聚物B和氟碳化合物的含水第一混合物;

通过包括旁通阀和气动单元的均化器将所述第一混合物在第一容器和第二容器之间转移并返回第一容器,其中旁通阀是打开的;

使用关闭的旁通阀启动所述气动单元,通过将材料从第一容器均化到第二容器中形成均化的初级纳米乳液;

任选地,当需要多于一次均化通过时,打开所述旁通阀并将溶液转移到第一容器中,关闭旁通阀并进行从第一容器到第二容器的第二次均化通过;

将均化的初级纳米乳液置于蔗糖或另一种粘精和任选地,一种或多种药学上可接受的缓冲盐和杀微生物剂的水溶液中,所述水溶液置于第一压力容器中,以形成第二混合物;

将第一压力容器连接到均化器的输入端;

将第二压力容器连接到均化器的输出端;

在旁通阀关闭的情况下操作气动单元以进一步均化第二混合物直至所有第二混合物转移到第二压力容器中;和

加压第二压力容器以使纳米乳液通过0.8/0.2微米过滤器转移和灭菌并进入第三压力容器。

2.权利要求1的方法,其中所述氟碳化合物包含十四氟-正己烷,任选地包括两种或更多种其可能的结构异构体。

3.权利要求1的方法,其中所述氟碳化合物包括十二氟戊烷,任选地包括两种或更多种其可能的结构异构体。

4.一种形成纳米乳液的方法,包括:

制备含有一种或多种全氟-正己基-低聚乙烯氧基-醇和氟碳化合物的含水第一混合物,其中低聚乙烯氧基部分的长度为1-16个单元;

通过包括旁通阀和气动单元的均化器将第一混合物在第一容器和第二容器之间转移并返回第一容器,其中旁通阀是打开的;

用关闭的旁通阀启动气动单元,形成均化的初级乳液;

将均化的初级乳液置于蔗糖溶液中,所述蔗糖溶液任选地包含一种或多种药学上可接受的缓冲盐、粘精和杀微生物剂并且置于第一压力容器中,以形成第二混合物;

将第一压力容器连接到均化器的输入端;

将第二压力容器连接到均化器的输出端;

在旁通阀关闭的情况下操作气动单元以形成纳米乳液,直到所有第二混合物转移到第二压力容器中;和

加压第二压力容器以使纳米乳液通过0.8/0.2微米过滤器转移和灭菌并进入第三压力容器。

5.权利要求4的方法,其中所述氟碳化合物包含十四氟-正己烷,任选地包括两种或更多种其可能的结构异构体。

6.权利要求4的方法,其中所述氟碳化合物包括十二氟戊烷,任选地包括两种或更多种其可能的结构异构体。

7.权利要求4-6任一项的方法,其中全氟-正己基-低聚乙烯氧基-醇是DuPont

Capstone FS-3100含氟表面活性剂,任选地由制造商或常规精制的DuPont Capstone FS-3100含氟表面活性剂提供来使用。

8.一种形成纳米乳液的方法,包括:

制备含有一种或多种磷脂和氟碳化合物的含水第一混合物;

通过包括旁通阀和气动单元的均化器将第一混合物在第一容器和第二容器之间转移并返回第一容器,其中旁通阀是打开的;

用关闭的旁通阀启动气动单元,形成均化的初级乳液;

将均化的初级乳液置于蔗糖溶液中,所述蔗糖溶液任选地包含一种或多种药学上可接受的缓冲盐、粘精和杀生物剂并且置于第一压力容器中,以形成第二混合物;

将第一压力容器连接到均化器的输入端;

将第二压力容器连接到均化器的输出端;

在旁通阀关闭的情况下操作气动单元以形成纳米乳液,直到所有第二混合物转移到第二压力容器中;和

加压第二压力容器以使纳米乳液通过0.8/0.2微米过滤器转移和灭菌并进入第三压力容器。

9.权利要求8的方法,其中所述一种或多种磷脂由以下组成:1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷脂酰胆碱,1,2-棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-5000]钠盐和1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺。

10.权利要求8的方法,其中所述一种或多种磷脂由以下组成:1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷脂酰胆碱,1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]钠盐和1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺。

11.权利要求8的方法,其中所述一种或多种磷脂由以下组成:1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-磷脂酰胆碱,1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]钠盐和1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺。

12.权利要求8的方法,其中所述含水第一混合物由全氟-正己基-低聚乙烯氧基-醇和一种或多种磷脂或磷脂混合物的共混物组成,所述磷脂或磷脂混合物衍生自C12、C13、C14、C15、C16、C17、C18饱和或不饱和的脂肪酸、其混合物。

13.一种形成纳米乳液的方法,包括:

制备含水第一混合物,其含有全氟-正己基-低聚乙烯氧基-醇,蔗糖和任选地,一种或多种药学上可接受的缓冲盐、粘精和经批准的杀微生物剂;

使用注射器和连接到注射器的针头将第一混合物置于小瓶中;

将氟碳化合物加入小瓶中,用塞子塞住小瓶并压褶封盖小瓶,和

对小瓶进行涡旋和超声处理。

14.权利要求13的方法,其中所述氟碳化合物包含十四氟-正己烷,任选地包括两种或更多种其可能的结构异构体。

15.权利要求13的方法,其中所述氟碳化合物包括十二氟戊烷,任选地包括两种或更多种其可能的结构异构体。

16.一种形成纳米乳液的方法,包括:

形成包含一种或多种磷脂,水,甘油,磷酸二氢钠和无水磷酸氢二钠的混合物;

将所述混合物通过0.2微米过滤器转移到无菌容器中;

将所述混合物置于小瓶中;

向小瓶中加入氟碳化合物并立即用塞子塞住小瓶并压褶封盖小瓶;和

对小瓶进行涡旋和超声处理。

17.权利要求16的方法,其中所述一种或多种磷脂由以下组成:1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷脂酰胆碱,1,2-棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-5000]钠盐和1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺。

18.权利要求16的方法,其中一种或多种磷脂由以下组成:1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷脂酰胆碱,1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]钠盐和1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺。

19.权利要求16的方法,其中一种或多种磷脂由以下组成:1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-磷脂酰胆碱,1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]钠盐和1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺。

20.一种全氟戊烷纳米乳液的组合物,包含:

全氟戊烷;和

一种或多种选自全氟-正己基-低聚乙烯氧基-醇的表面活性剂,

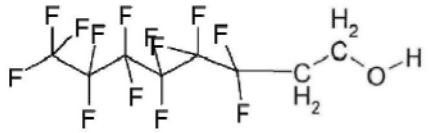
其中所述纳米乳液的特征在于,

其中所述全氟戊烷占所述纳米乳液的重量百分比为约1%至约10%,

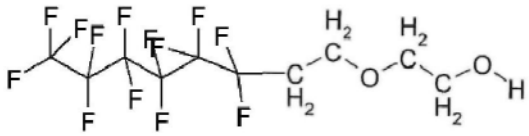
所述全氟-正己基-低聚乙烯氧基-醇占所述纳米乳液的重量百分比为约0.10%至约7.5%,

其中99%的颗粒被测定具有小于或等于400nm的颗粒直径的粒度分布,和

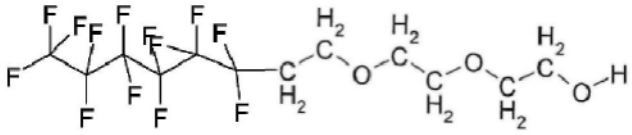
所述全氟-正己基-低聚乙烯氧基-醇选自:



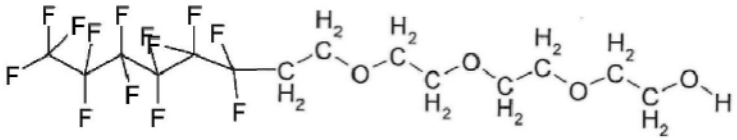
1



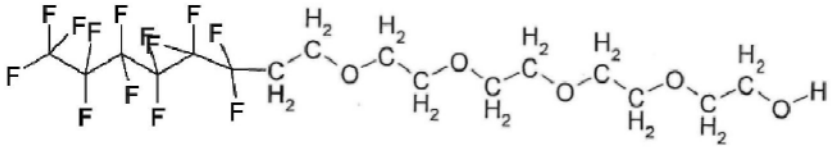
2



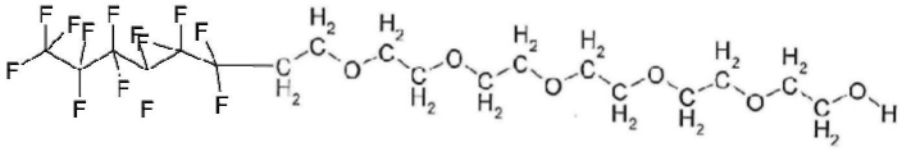
3



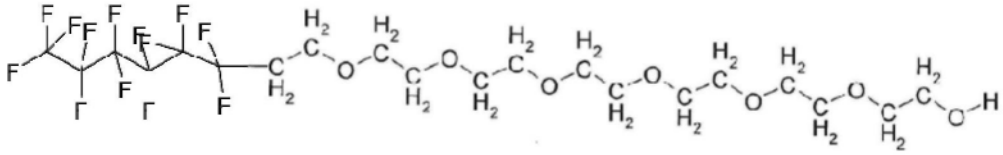
4



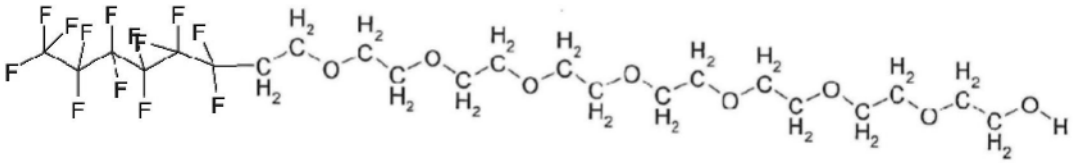
5



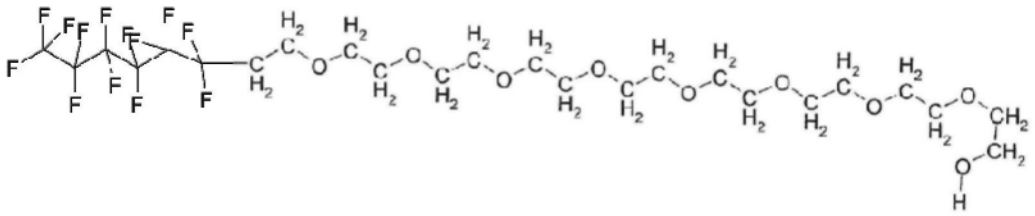
6



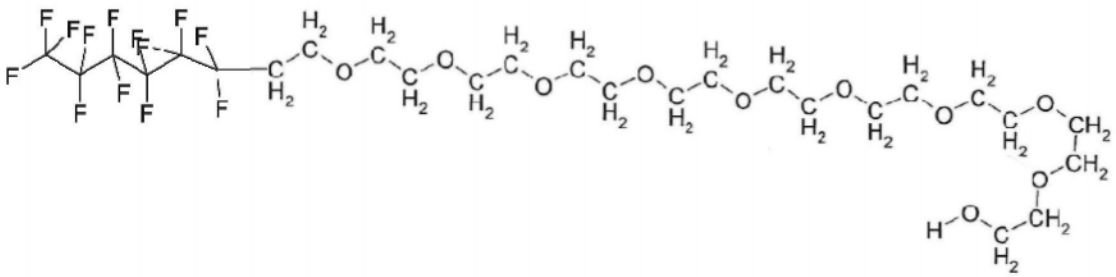
7



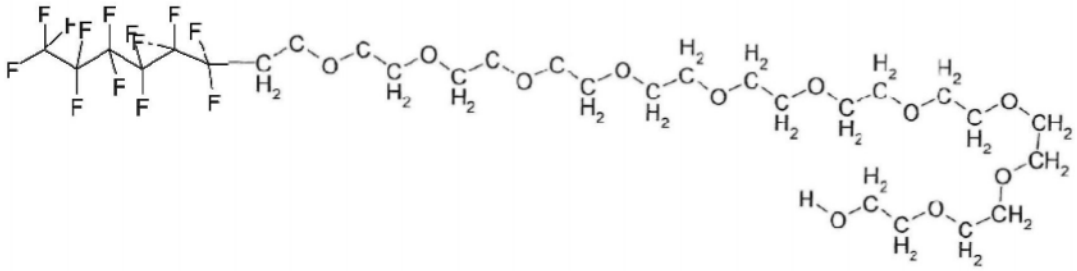
8



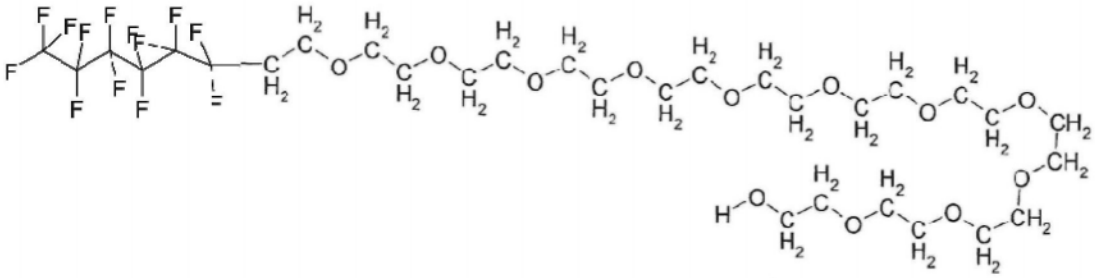
9



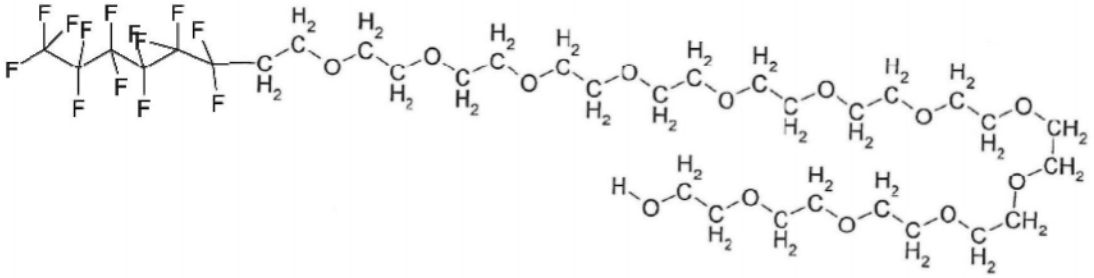
10



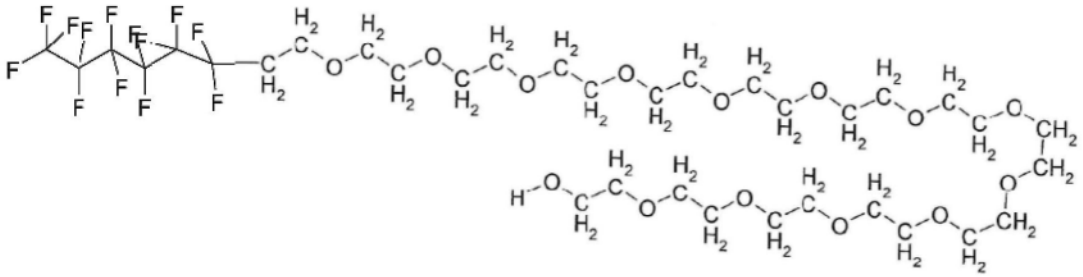
11



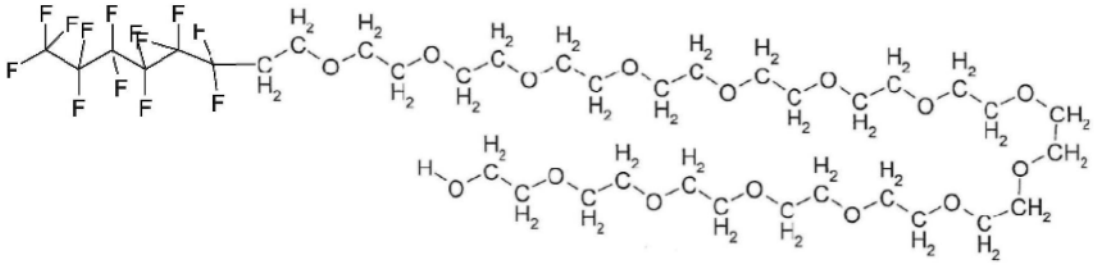
12



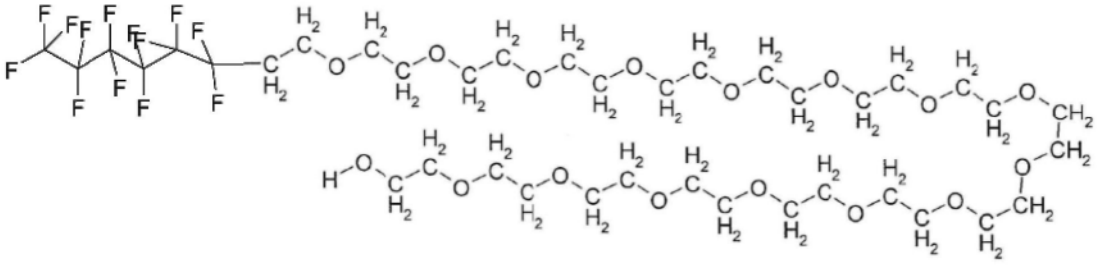
13



14



15



16 。

氟碳化合物纳米乳液的组合物及其制备方法和用途

[0001] 本申请为中国专利申请号201680081126.3(PCT/US2016/067650),申请日2016年12月20日,发明名称为“氟碳化合物纳米乳液的组合物及其制备方法和用途”的分案申请。

[0002] 优先权要求和相关专利申请

[0003] 本申请要求2015年12月21日提交的美国临时申请序列号62/270226的优先权权益,其全部内容在此通过引用以其整体合并于本文。

技术领域

[0004] 本发明总体上涉及氟碳化合物纳米乳液的组合物和它们的制备和使用方法。更具体地,本发明涉及采用全氟-正己基-低聚乙烯氧基-醇和磷脂中的一种或多种稳定化的独特的氟碳化合物纳米乳液,和其制备方法和应用。

背景技术

[0005] 常见的外科和介入程序以及创伤和自然疾病状态可能导致失血,局部缺血或缺氧,其如果不及时妥善治疗则可导致器官和组织的损伤,这引起发病率和死亡率。失血发作呈现为缺血综合征,广泛分布于全身和四肢,并且在脑中作为中风。氧合血流的快速血运重建和恢复仍然是临床中风治疗的重点。此外,捐献的血液似乎一直处于短缺状态,部分原因是捐献血液的货架期有限,并且容易受到病毒污染。氧载体或人造血液可用于帮助治疗各种疾病和病症,包括用于放射疗法和化学疗法。

[0006] 乳化的氟碳化合物(FC)为基础的氧载体已有报道,例如,利用较高分子量的氟碳化合物(例如,全氟萘烷和全氟辛基溴)。然而,这些组合物在很大程度上满足不了严格的临床要求,仍然存在解决安全、可靠和有效的氧载体的迫切需求的许多挑战。

发明概述

[0008] 本发明基于以下意外发现的部分:用选自全氟-正己基-低聚乙烯氧基-醇、磷脂或其组合的表面活性剂或稳定剂独特地配制的氟碳化合物纳米乳液解决了代谢物和降解产物的生物累积的关键问题,所述产物由具有超过6个全氟化碳的全氟烷基的含氟表面活性剂(fluorosurfactant)形成。

[0009] 本发明的氟碳化合物纳米乳液通过使用较短的全氟化碳链的表面活性剂而获得显著益处,因为排泄和代谢产物不生物累积,而采用较长全氟烷基部分时排泄和代谢产物生物累积。

[0010] 在一个方面,本发明一般涉及氟碳化合物纳米乳液的组合物,其包含范围为约4至约8个碳的氟碳化合物;和一种或多种选自全氟-正己基-低聚乙烯氧基-醇、磷脂或其组合的表面活性剂。在某些实施方案中,一种或多种表面活性剂包括全氟-正己基-低聚乙烯氧基-醇和/或三种磷脂的混合物。

[0011] 在另一方面,本发明一般涉及形成纳米乳液的方法。该方法包括:制备包含PEG调聚物B和氟碳化合物的含水第一混合物;通过包括旁通阀和气动单元的均化器将第一混合

物在第一容器和第二容器之间转移并将第一混合物转移回第一容器,其中旁通阀是打开的;使用关闭的旁通阀启动气动单元以形成均化的初级纳米乳液;将均化的初级纳米乳液置于蔗糖或另一种粘精(viscogen)和任选地,一种或多种药学上可接受的缓冲盐和杀微生物剂的水溶液中,所述水溶液置于第一压力容器中,以形成第二混合物;将第一压力容器连接到均化器的输入端;将第二压力容器连接到均化器的输出端;在旁通阀关闭的情况下操作气动单元以形成纳米乳液,直到所有第二混合物转移到第二压力容器中;然后加压第二压力容器,使纳米乳液通过0.8/0.2微米过滤器转移并灭菌,并进入第三压力容器。

[0012] 在另一方面,本发明一般涉及形成纳米乳液的方法。该方法包括:制备含有一种或多种全氟-正已基-低聚乙烯氧基-醇和氟碳化合物的含水第一混合物,其中低聚乙烯氧基部分的长度为1-16个单元;通过包括旁通阀和气动单元的均化器将第一混合物在第一容器和第二容器之间转移并将第一混合物转移回第一容器,其中旁通阀是打开的;用关闭的旁通阀启动气动单元,形成均化的初级乳液;将均化的初级乳液置于蔗糖溶液中,所述蔗糖溶液任选地包含一种或多种药学上可接受的缓冲盐、粘精和杀微生物剂并且置于第一压力容器中,以形成第二混合物;将第一压力容器连接到均化器的输入端;将第二压力容器连接到均化器的输出端;在旁通阀关闭的情况下操作气动单元以形成乳液,直到所有第二混合物转移到第二压力容器中;加压第二压力容器,使乳液通过0.8/0.2微米过滤器转移并灭菌,并进入第三压力容器。

[0013] 在另一方面,本发明一般涉及形成纳米乳液的方法。该方法包括:制备含有全氟-正已基-低聚乙烯氧基-醇,蔗糖和任选地,一种或多种药学上可接受的缓冲盐、粘精和批准的杀生物灭菌剂的含水第一混合物;使用注射器和连接到注射器的针头将第一混合物置于小瓶中;将氟碳化合物添加到小瓶中,将小瓶塞住并压褶封盖,然后涡旋并对小瓶进行超声处理。

[0014] 在另一方面,本发明一般涉及形成纳米乳液的方法。该方法包括:形成包含一种或多种磷脂,水,甘油,磷酸二氢钠和磷酸氢二钠的混合物;将混合物通过0.2微米过滤器转移到无菌容器中;将混合物置于小瓶中;将氟碳化合物添加到小瓶中,立即将小瓶塞住并压褶封盖,然后涡旋并对小瓶进行超声处理。

[0015] 在另一方面,本发明一般涉及通过本文公开的方法形成的纳米乳液。

附图简要说明

[0017] 通过阅读以下结合附图的详细描述将更好地理解本发明,其中相同的参考标号用于表示相同的元素,并且其中:

[0018] 图1是概述根据本发明的方法的示例性实施方案的流程图,其通过高压均化产生PEG调聚物B稳定化的全氟碳化合物纳米乳液。

[0019] 图2是概述根据本发明图1的方法的示例性实施例中的附加步骤的流程图。

[0020] 图3图示了根据本发明的方法的示例性实施方案的、在4℃下储存的TDFH-PTB纳米颗粒乳液和在23℃下储存的相同乳液的稳定性数据。

[0021] 图4图示了根据本发明的方法的示例性实施方案的、在4℃下储存的TDFH-PTB纳米颗粒乳液和在4℃下储存的TDFH-化合物20a(DuPont Capstone FS-3100)纳米颗粒乳液的稳定性数据。

[0022] 图5是概述根据本发明的方法的示例性实施方案的流程图,其用于产生磷脂稳定化的全氟碳化合物纳米乳液。

[0023] 图6是概述根据本发明的方法的示例性实施方案的流程图,其通过涡旋和超声处理形成稳定化的、包含终产物中其浓度的混合组分的全氟碳化合物纳米乳液。

[0024] 图7是示例性装置的图,所述装置在添加全氟碳化合物纳米乳液和表面活性剂的测试溶液之前和之后测量从溶液摄取的溶解氧。

[0025] 图8是在加入实施例5的全氟碳化合物纳米乳液之前和之后水溶液的溶解氧含量的图。

[0026] 图9是显示实施例7的制剂加入后水溶液中溶解氧水平降低的图。

[0027] 图10是显示实施例8的制剂加入后水溶液中溶解氧水平降低的图。

[0028] 发明详述

[0029] 本发明提供了用选自全氟-正己基-低聚乙烯氧基-醇和磷脂的表面活性剂或稳定剂独特配制的氟碳化合物纳米乳液。这些氟碳化合物纳米乳液解决了传统的基于氟碳化合物的人造氧载体所面临的关键问题,包括代谢物和降解产物的生物累积。这些不希望的杂质由含有超过6个完全氟化碳的全氟烷基的含氟表面活性剂形成,并且由于严格的监管标准而导致持续的阻碍。本发明的氟碳化合物纳米乳液通过使用较短的全氟化碳链的表面活性剂而获得显著益处,因为排泄和代谢产物不生物累积,而采用较长全氟烷基部分时排泄和代谢产物生物累积。

[0030] 在一个方面,本发明一般涉及氟碳化合物纳米乳液的组合物,其包含范围为约4至约8个碳的氟碳化合物;和一种或多种选自全氟-正己基-低聚乙烯氧基-醇和磷脂的表面活性剂。

[0031] 在某些实施方案中,氟碳化合物包括全氟丁烷,全氟戊烷,全氟己烷,全氟庚烷,全氟辛烷,或其两种或更多种的混合物。

[0032] 在某些优选的实施方案中,氟碳化合物包括全氟戊烷。

[0033] 在某些实施方案中,一种或多种表面活性剂包括全氟-正己基-低聚乙烯氧基-醇和/或三种磷脂的混合物。

[0034] 例如,全氟-正己基-低聚乙烯氧基-醇包括以下中的一种或多种:

[0035] $CF_3-(CF_2)_n-(CH_2CH_2O)_q-H$

[0036] 其中n为5,q为1至约50的整数。

[0037] 在某些优选的实施方案中,全氟-正己基-低聚乙烯氧基-醇是

[0038] $CF_3-(CF_2)_n-(CH_2CH_2O)_q-H$

[0039] 其中n为5,q为1至约16的整数(例如,约3至约16,约6至约16,约10至约16,约3至约10)。

[0040] 氟碳化合物可以占纳米乳液中任何合适的重量百分比,例如,约1%至约50%(例如,约1%至约40%,约1%至约30%,约1%至约20%,约1%至约10%,约1%至约5%)。

[0041] 全氟-正己基-低聚乙烯氧基-醇可以占纳米乳液中任何合适的重量百分比,例如,约0.10%至约7.5%(例如,约0.10%至约5%,约0.10%至约4%,约0.10%至约3%,约0.10%至约1.5%)。

[0042] 磷脂具有任何合适的碳链长度,例如,长度范围为约12个碳至约18个碳(例如,12、

13、14、15、16、17、18)。

[0043] 磷脂可以占纳米乳液中任何合适的重量百分比,例如,约0.10%至约7.5%(例如,约0.10%至约5%,约0.10%至约4%,约0.10%至约3%,约0.10%至约1.5%)。

[0044] 2015年6月12日提交的名称为"Phospholipid Composition And Microbubbles and Emulsions Formed Using same"的PCT/US15/35681的公开内容出于所有目的通过引用明确并入本文。

[0045] 在其中组合物包含三种磷脂的混合物的某些实施方案中,示例性磷脂及其相对量可以是,例如,约75至约87摩尔%的磷脂酰胆碱,约5至约15摩尔%的磷脂酰乙醇胺和约3至约20摩尔%的磷脂酰乙醇胺-MPEG,其中"MPEG"是指具有末端甲氧基的PEG基团。本文的MPEG可具有约350至约5,000(例如,约350至约4,000,约350至约3,000,约350至约2,000,约500至约5,000,约1,000至约5,000,约1,500至约5,000,约2,000至约5,000,约3,000至约5,000,约4,000至约5,000)的分子量。磷脂酰乙醇胺-PEG,其中分子的低聚乙烯氧基部分以羟基封端,与MPEG磷脂中存在的甲氧基末端相反,可以取代制剂中的磷脂酰乙醇胺-MPEG。磷脂酰乙醇胺-MPEG和磷脂酰乙醇胺-PEG的组合也可以任何相对比例使用,作为这些制剂的含有低聚乙烯氧基的磷脂组分。

[0046] 在其中组合物包含三种磷脂的混合物的实施方案中,示例性磷脂及其相对量可以是,例如,约80至约85摩尔%的磷脂酰胆碱,约8至约13摩尔%的磷脂酰乙醇胺和约6至约11摩尔%的磷脂酰乙醇胺-MPEG(或磷脂酰乙醇胺-PEG)。

[0047] 在某些实施方案中,磷脂酰乙醇胺包括PEG基团,所述PEG基团的分子量为约350至约5,000(例如,约350至约4,000,约350至约3,000,约350至约2,000,约500至约5,000,约1,000至约5,000,约1,500至约5,000,约2,000至约5,000,约3,000至约5,000,约4,000至约5,000)。

[0048] 在某些实施方案中,本发明的组合物包括PEG调聚物B(PTB),常规纯化的医用级的DuPont Zonyl FS-100或DuPont FSO。在某些实施方案中,本发明的组合物包括全氟-正己基-低聚乙烯氧基-醇。特定形式的全氟-正己基乙烯氧基-醇是称为DuPont Capstone FS-3100的含氟表面活性剂产品,并且在某些实施方案中,本发明的组合物包括该材料或该材料的常规精制形式。在某些实施方案中,本发明的组合物包括十四氟-正己烷(TDFH)。在某些实施方案中,本发明的组合物包括十四氟己烷,其可以由其可能的结构异构体的两种或更多种以任何比例存在的混合物组成。在某些实施方案中,本发明的组合物包括十二氟-正戊烷(DDFP)。在某些实施方案中,本发明的组合物包括十二氟戊烷,其可以由其可能的结构异构体的两种或更多种以任何比例存在的混合物组成。

[0049] 在某些实施方案中,本发明的组合物包括以下中的一种或多种:十二氟-正戊烷,1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷脂酰胆碱,1,2-棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-5000]盐如钠盐和1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺。

[0050] 在某些实施方案中,本发明的组合物包括以下中的一种或多种:1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷脂酰胆碱,1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]盐如钠盐和1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺。在某些实施方案中,本发明的组合物包括以下中的一种或多种:1,2-双十二烷酰基-sn-甘油基-3-磷脂酰胆碱,1,2-双十二烷酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]钠盐

和1,2-双十二烷酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺。

[0051] 本发明的一个方面涉及一种制备全氟碳化合物纳米乳液的方法。使用一种或多种具有仅包含单链长度的氟碳化合物部分的氟碳化合物表面活性剂的含水混合物,以制备全氟碳化合物的纳米乳液。现在参考图1,在步骤(110)中,该方法通过以下制备约6%wt/体积的含氟表面活性剂在注射用水(WFI)中的混合物:在容器中使用磁力搅拌器,置于2-5℃浴中15至60分钟的一段时间,同时监测溶液温度并将其保持在2-5℃的温度。

[0052] 在某些实施方案中,步骤(110)的氟碳化合物包含十四氟-正己烷。在某些实施方案中,步骤(110)的氟碳化合物包含十四氟己烷,其可以是2种或更多种结构异构体的混合物。在某些实施方案中,步骤(110)的氟碳化合物包含十二氟-正戊烷。在某些实施方案中,步骤(110)的氟碳化合物包括十二氟戊烷,其可以是2种或更多种结构异构体的混合物。

[0053] 在某些实施方案中,步骤(110)的氟碳化合物由十四氟-正己烷组成。在某些实施方案中,步骤(110)的氟碳化合物由十四氟己烷组成。在某些实施方案中,步骤(110)的氟碳化合物由十二氟-正戊烷组成。在某些实施方案中,步骤(110)的氟碳化合物由十二氟戊烷组成。

[0054] 进一步在步骤(110)中,本发明的方法然后将等分试样的冷(0-4℃)全氟碳化合物快速加入容器中,关闭容器盖,然后搅拌所得第一混合物约1小时。

[0055] 在某些实施方案中,步骤(110)的氟碳化合物表面活性剂包含Peg调聚物B(PTB),化合物21,

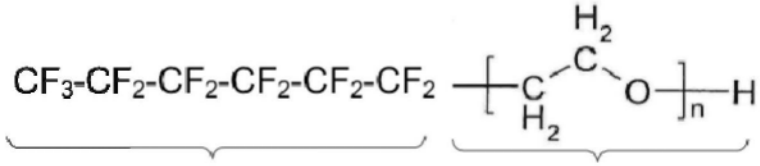
[0056] $CF_3(CF_2)_mCH_2CH_2O(CH_2CH_2O)_n$-H;m=5、7、9、11、13;对于

[0057] 每个m,n=4多至13

[0058] 21

[0059] 在某些实施方案中,步骤(110)的氟碳化合物表面活性剂包含全氟-正己基-低聚乙烯氧基-醇。在某些实施方案中,步骤(110)的氟碳化合物表面活性剂由PEG调聚物B组成,PEG调聚物B为上文表示为21的化合物的混合物。在某些实施方案中,步骤(110)的氟碳化合物表面活性剂由全氟-正己基-低聚乙烯氧基-醇组成。

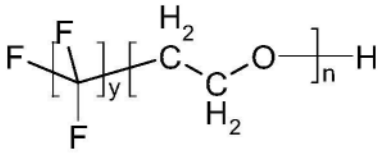
[0060] 在某些实施方案中,步骤(110)的含氟表面活性剂是全氟-正己基-低聚乙烯氧基-醇表面活性剂17,其具有不变的全氟-正己基部分18,与可变的环氧乙烷部分19组合。

[0061] 

18 19

17

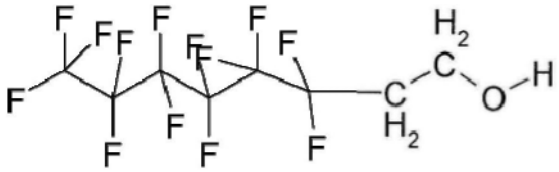
[0062] 在某些实施方案中,步骤(110)的含氟表面活性剂包含全氟-正烷基-低聚乙烯氧基-醇20,其中y大于6。在某些实施方案中,步骤(110)的含氟表面活性剂包含化合物20,其中y为7,并且其中n大于或等于1且小于或等于16。

[0063] 

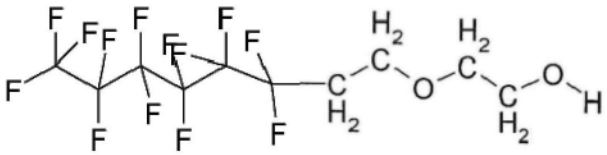
20 a,b

[0064] 在某些实施方案中,步骤(110)的含氟表面活性剂包含全氟-正-烷基-低聚乙烯氧基-醇20a,其中y为6,并且其中n大于或等于1且小于或等于16(例如,DuPont Capstone FS-3100含氟表面活性剂)。在某些实施方案中,化合物20a可以从制造商处所得的原样使用。在某些实施方案中,化合物20a可在使用前经历常规精制程序或纯化程序。在某些实施方案中,步骤(110)的含氟表面活性剂包含化合物20b,其中y为5,并且其中n大于或等于1且小于或等于16。

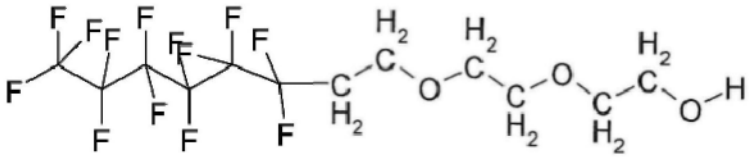
[0065] 在某些实施方案中,步骤(110)的含氟表面活性剂包含化合物1。在某些实施方案中,步骤(110)的含氟表面活性剂包含化合物2。在某些实施方案中,步骤(110)的含氟表面活性剂包含化合物3。在一些实施方案中,步骤(110)的含氟表面活性剂包含化合物4。在一些实施方案中,步骤(110)的含氟表面活性剂包含化合物5。在某些实施方案中,步骤(110)的含氟表面活性剂包含化合物6。在某些实施方案中,步骤(110)的含氟表面活性剂包含化合物7。在某些实施方案中,步骤110的含氟表面活性剂包含化合物8。在某些实施方案中,步骤(110)的含氟表面活性剂包含化合物9。在某些实施方案中,步骤(110)的含氟表面活性剂包含化合物10。在某些实施方案中,步骤(110)的含氟表面活性剂包含化合物11。在某些实施方案中,步骤(110)的含氟表面活性剂包含化合物12。在某些实施方案中,步骤(110)的含氟表面活性剂包含化合物13。在某些实施方案中,步骤(110)的含氟表面活性剂包含化合物14。在某些实施方案中,步骤(110)的含氟表面活性剂包含化合物15。在某些实施方案中,步骤(110)的含氟表面活性剂包含化合物16。

[0066] 

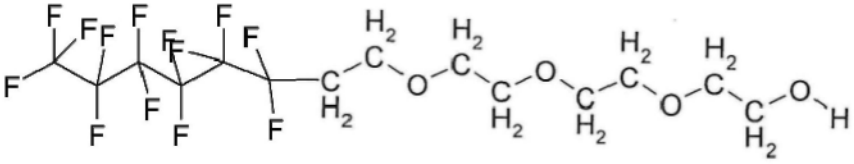
1



2

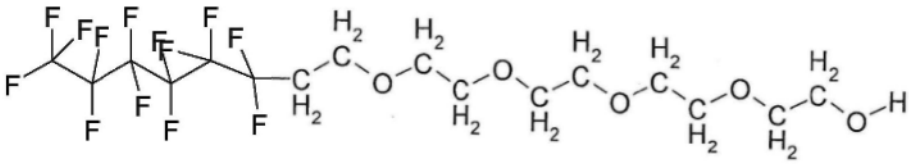


3

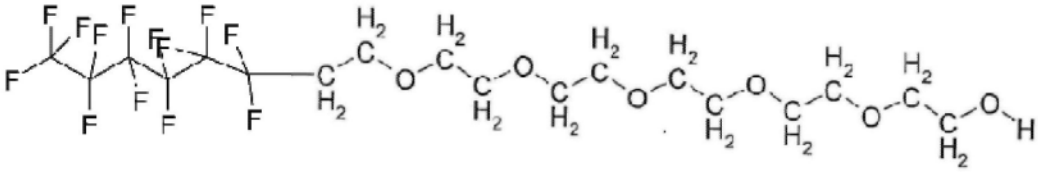


4

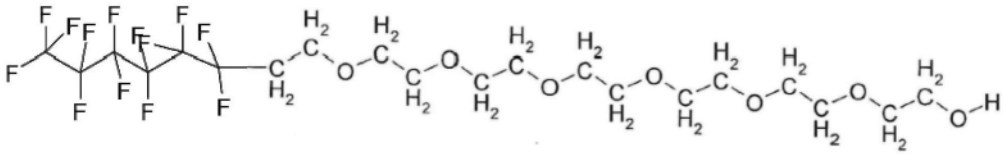
[0067]



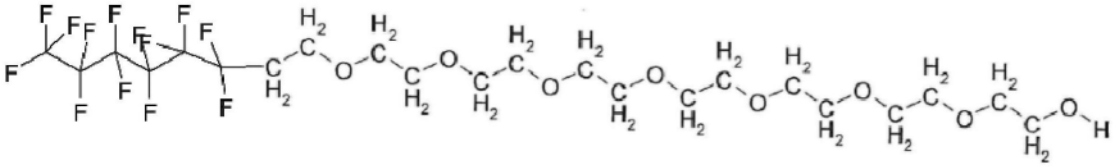
5



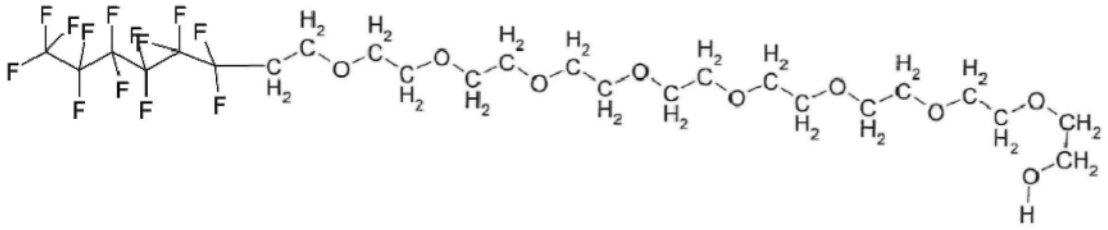
6



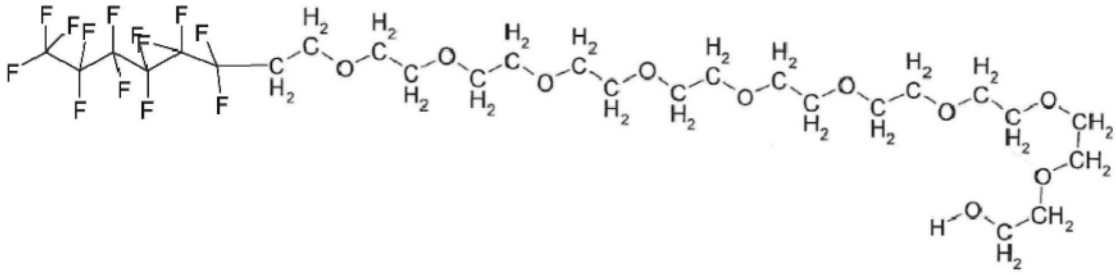
7



8

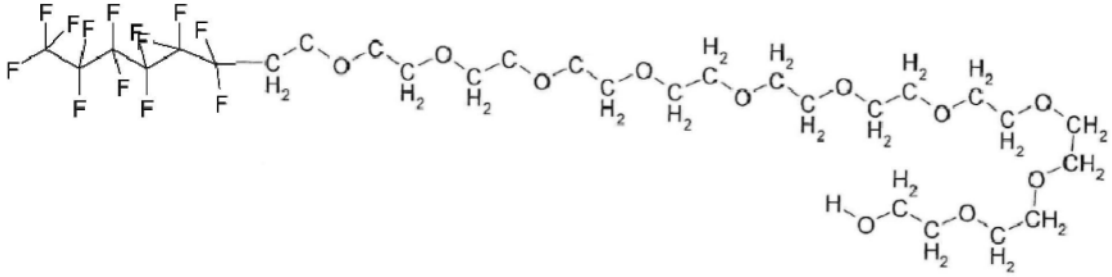


9

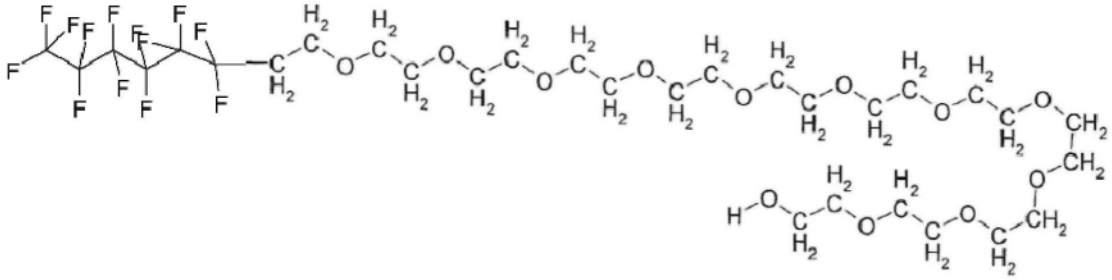


10

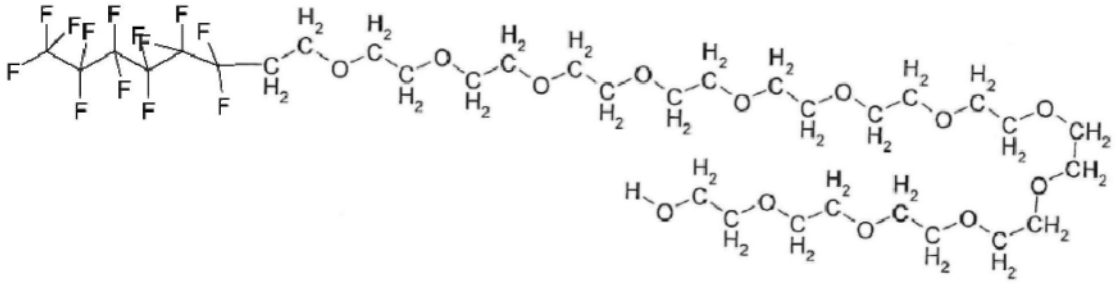
[0068]



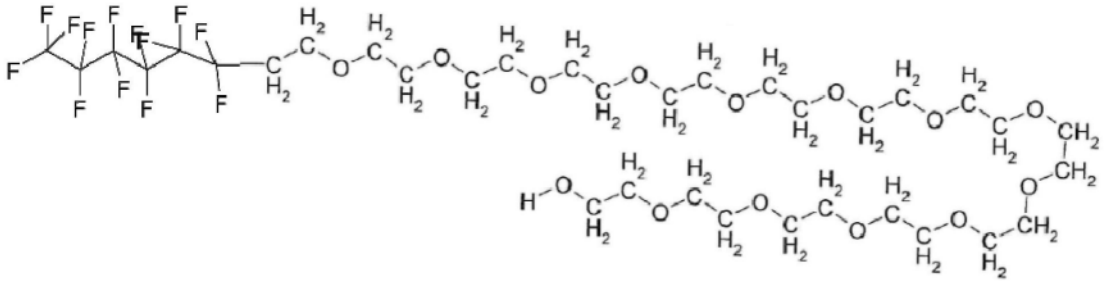
11



12

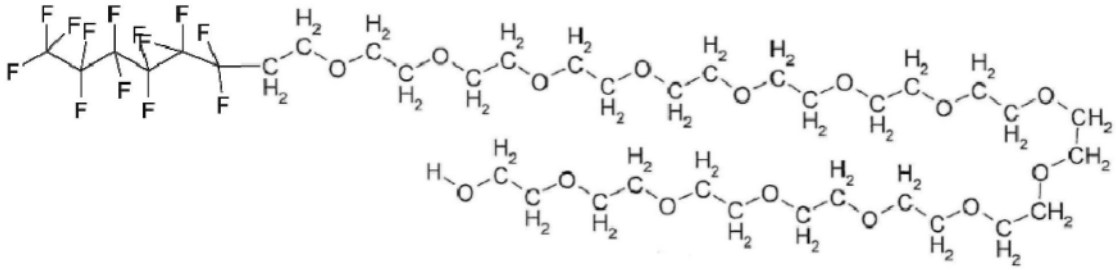


13

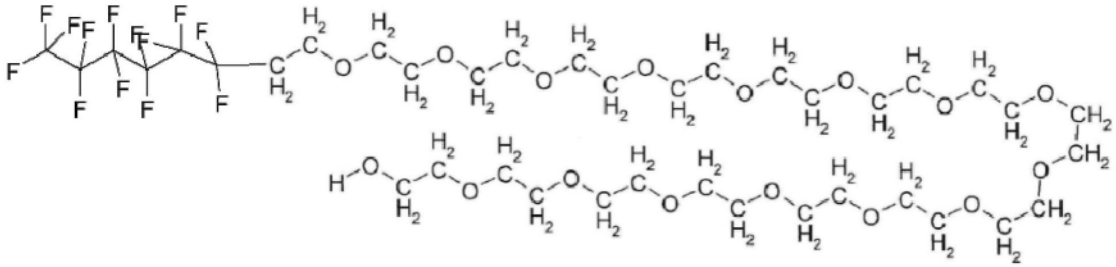


[0069]

14



15



16

[0070] 在某些实施方案中,含氟表面活性剂由化合物1至16的混合物组成,其可以含有那些化合物的任何组合,并且可以单个地省略这些化合物中的任何一种或者选自1至16的化合物组中的成员。

[0071] 在某些实施方案中,包含全氟部分18结合不同的发泡和润湿性质的其他氟碳化合物表面活性剂用于形成本发明的全氟碳化合物纳米乳液。例如,基于磺酸(DuPont FS-10)或磷酸酯(DuPont FS-61,FS63,FS-64)的其他阴离子表面活性剂;两性离子和两性表面活性剂(分别为DuPont FS-50和DuPont FS-51);非离子表面活性剂,基于全氟烷基化的聚乙

烯氧基醇,如DuPont FS-30,DuPont FS-31,DuPont FS-3100,DuPont FS34和DuPont FS-35;等可以被使用。

[0072] 在某些实施方案中,包含部分18与不同长度的环氧乙烷部分19的组合的氟碳化合物用于形成本发明的全氟碳化合物纳米乳液。在某些实施方案中,n在约3和约6之间。在其他实施方案中,n大于或等于1且小于或等于约16,以形成具有低分子量全氟碳化合物的稳定纳米乳液,例如十二氟戊烷(DDFP),十四氟己烷(TDFH),十六氟庚烷(HDFH)和十八氟辛烷(ODFO)。

[0073] 在一些实施方案中,形式为化合物22的聚乙二醇化全氟烷基低聚乙烯氧基醇表面活性剂

[0074] $H-(OCH_2CH_2)_m-(CF_2)_n-(CH_2CH_2O)_q-H$,

[0075] 22

[0076] 其中m独立地为1至约50的整数(例如,1至约25、1至约12、1至约6、6至约50、12至约50、25至约50),n是1至约50的整数(例如,1至约25、1至约12、1至约6、6至约50、12至约50、25至约50),q为1至约50的整数(例如,1至约25、1至约12、1至约6、6至约50、12至约50、25至约50)被用于形成本文公开的全氟碳化合物纳米乳液。

[0077] 在某些更优选的实施方案中,可以使用的一类化合物选自如下所示的化合物22的子集:

[0078] $H-(OCH_2CH_2)_m-(CF_2)_n-(CH_2CH_2O)_q-H$,

[0079] 其中m=1至约50,n=1至12,q=1至约50。

[0080] 在某些最优选的实施方案中,可以使用的一类化合物选自如下所示的化合物22的子集:

[0081] $H-(OCH_2CH_2)_m-(CF_2)_n-(CH_2CH_2O)_q-H$,

[0082] 其中m=1至约50,n=1至约6,和q=1至约50。

[0083] 在某些实施方案中,该组化合物的各个成员或表示为化合物22的该组化合物的各个成员的任何组合被用作用于形成本文公开的全氟碳化合物纳米乳液的氟碳化合物表面活性剂。

[0084] 在某些实施方案中,表示为结构22的化合物的混合物可以在用于形成本文公开的全氟碳化合物纳米乳液之前经历常规精制或纯化方案。

[0085] 在某些实施方案中,在用于形成本文公开的全氟碳化合物纳米乳液之前,可以对由结构22表示的化合物组的任何单个分子种类或单个成员的组合进行常规精制或纯化方案。

[0086] 在某些实施方案中,Ultra Turrax或类似的分散设备可代替磁力搅拌系统以产生初始粗乳液。Ultra Turrax具有高速搅拌马达(1,000-25,000rpm),分散元件通过轴连接到该马达上。因此,与使用磁力搅拌系统相比,使用Ultra Turrax生成粗乳液所需的时间更短(0.5-5分钟)。在整个操作过程中,溶液的温度保持在2-6℃,以使低沸点全氟碳化合物液体的任何损失最小化。

[0087] 此外,可以使用通过使用探针超声波发生器(sonicator)或由高速马达和分散附件组成的均化器产生的剧烈搅拌来制备粗乳液。

[0088] 随后,参考图1的步骤(140c)-(160c)或(140d)-(175d),将粗乳液均化成细乳液,

其包含小于或等于400nm的平均颗粒直径和99%的累积分布小于或等于900nm。

[0089] 在一个实施方案中,使用均化器(Avestin型号C5)(Avestin model C5)。在另一个实施方案中,使用均化器(Avestin型号C50)(Avestin model C50)。在另一个实施方案中,使用具有或不具有气动辅助装置的Kirkland Products手持式均化器。在某些实施方案中,均化压力范围为1,000psi至14,000psi。此外,在其他实施方案中,均化器以连续均化模式或以离散均化模式使用。可以调节离散通过的次数或连续均化的时间以确保获得细乳液。

[0090] 参考图1,步骤(180),在粗乳液均化形成细乳液完成后,将得到的细乳液转移到另一个容器中,该容器含有由WFI组成的冷却的(0-10℃)搅拌连续相。此外,连续相任选地含有缓冲剂,粘精,赋形剂和防腐剂(杀微生物剂)以抑制任何偶然引入的微生物物种的生长。

[0091] 在某些实施方案中,可以通过使乳液从第一容器通过均化器进入第二容器并且均化器任选加压来进行转移。分散相的体积是转移的乳液的1-100倍。在某些实施方案中,在氮气压力(2-10psi)下将细乳液搅拌10-30分钟,以确保细乳液在整个连续相中均匀分布。本领域普通技术人员将理解,装置的配置和制备规模可能需要改变在不同规模的先前运行中使用的时间或使用不同的设备。

[0092] 在步骤(180)中,该方法将细乳液注入设置在第一压力容器(PV1)中的蔗糖溶液中以形成第二混合物。参考图2,在步骤(210)中,该方法在搅拌步骤(210)的第二混合物的同时对第一压力容器(PV1)加压。

[0093] 在步骤(220)和(230)中,该方法使用均化器将第二混合物转移到第二压力容器(PV2)中。

[0094] 在步骤(240)和(250)中,该方法通过0.8/0/2微米过滤器将第二压力容器(PV2)连接到第三压力容器(PV3),然后对第二压力容器加压以过滤和灭菌第二混合物,并将第二混合物转移到第三压力容器中。在某些实施方案中,过滤步骤利用注射器膜过滤器,筒式膜过滤器或胶囊膜过滤器,或由与媒介物相容的材料制成并且能够去除颗粒物质的任何其他膜,所述颗粒物质包括微生物实体,例如细菌,霉菌,霉菌孢子和真菌污染物,小至0.2微米或甚至0.1微米。例如,膜材料可以是来自Pall Sciences的**Supor®**(聚醚砜)膜,Pall **EKV®**过滤器系列膜,或Pall Sciences GHP **Polypro®**膜。

[0095] 在步骤(250)完成之后,该方法在氮气的轻压下搅拌所得的灭菌的第二混合物,以确保过滤的溶液均匀分散。在某些实施方案中,该方法还使用蠕动泵,计量泵,齿轮泵或其他合适的流体转移装置将过滤的第二混合物转移到加盖和压褶的小瓶中。采取在所有这些操作期间避免微生物污染的预防措施,并且对于无菌填充操作的这种预防措施是本领域普通技术人员已知的。

[0096] 现在参考图6,在某些实施方案中,包含例如氟碳化合物表面活性剂20a或21的纳米乳液可通过超声处理组合的组分来制备。例如,DDFP(作为纯液体),磷酸盐缓冲的含水蔗糖(作为溶液)和化合物20a表面活性剂(作为纯液体或与磷酸盐缓冲的蔗糖水溶液预混合)用于制备DDFP的纳米颗粒乳液。

[0097] 在步骤(610)中,该方法制备磷酸盐缓冲的蔗糖和含氟表面活性剂化合物21(Peg调聚物B)的水溶液。在步骤(620)中,该方法用步骤(610)的溶液填充多个小瓶,并将塞子放在每个小瓶的口上。在步骤(630)中,该方法将小瓶置于冷却环境中,其使小瓶达到一定温度,使得当将全氟碳化合物加入小瓶溶液中时,预计全氟碳化合物没有显著量的蒸发。在步

骤(640)中,将氟碳化合物加入每个小瓶中,然后立即对每个小瓶进行压褶封盖。在步骤(650)中,该方法使每个小瓶进行涡旋,然后超声处理以产生本发明的全氟碳化合物纳米乳液。在步骤(650)中,通过摇动或涡旋将组分在带塞的压褶封盖的小瓶中初始混合以产生粗乳液,其粒度分布可以为约200纳米至高达15微米。颗粒尺寸大小是说明性的,并且本领域普通技术人员知道实际实践中的尺寸可以低于或高于给定范围。

[0098] 然后,本发明的方法对小瓶进行超声处理,例如,在超声波清洗浴中,例如VWR Aquasonic 75HT单元,其提供约40KHz的超声频率和约75-80瓦的总功率输出,持续1秒至1小时的时间段,以形成纳米颗粒乳液的所需粒度分布。

[0099] 现在参考图5,在某些实施方案中,使用一种或多种磷脂作为乳化表面活性剂系统。参考图5,在步骤(510)中,该方法制备含有一碱式和二碱式磷酸盐缓冲剂的水和甘油的第一混合物,其在环境温度和100℃之间的温度下被搅拌。在步骤(520)中,在环境温度和100℃之间的温度下磷脂作为固体材料或作为在合适溶剂中的溶液加入第一混合物中,其与该过程相容以形成第二混合物。在步骤(530)中,将第二混合物通过0.2微米过滤器过滤到第二容器中。在步骤(540)中,如果过滤的溶液制备的温度超过环境温度,则将过滤的溶液冷却至环境温度。在步骤(550)中,该方法将步骤(540)的溶液转移到多个小瓶中并将塞子固定到小瓶上。在步骤(560)中,将所选择的待乳化的氟碳化合物加入到小瓶中,并立即将小瓶压褶封盖。在步骤(570)中,该方法将步骤(560)的所述小瓶涡旋,然后超声处理1秒至1小时的时间,以提供氟碳化合物乳液。可以调节超声处理时间以提供所需尺寸的粒度分布,这对于特定应用可能是最佳的。在某些实施方案中,一种或多种磷脂是饱和的,部分饱和的或完全不饱和的。例如,使用以下形成第一纳米乳液:DPPC(16:0),DPPE-MPEG-2000或DPPE-MPEG5000和任选的DPPE(16:0)。使用蛋黄磷脂(Egg yolk phospholipids)形成第二纳米乳液,所述蛋黄磷脂是单独的或与其他添加的磷脂或衍生的磷脂组合的。使用16:0-18:1PC,16:0-18:1PE和16:0-18:1PE-MPEG2000或16:0-18:1PE-MPEG5000形成第三纳米乳液。使用DPPC(16:1),DPPE-MPEG-2000或DPPE-MPEG-5000和任选的DPPE(16:1)形成第四纳米乳液。使用DMPC,DMPE和DMPE-MPEG2000或DMPE-MPEG5000形成第五纳米乳液。使用14:1(Δ9-顺式)PC,14:1(Δ9-顺式)PE,14:1(Δ9-顺式)MPEG2000或14:1(Δ9-顺式)MPEG5000形成第六纳米乳液。使用以下形成第六纳米乳液;14:1(Δ9-反式)PC,14:1(Δ9-反式)PE,14:1(Δ9-反式)MPEG2000,或14:1(Δ9-反式)MPEG5000。使用DLPC(12:0),DLPE-MPEG-2000或DLPE-MPEG-5000,DLPE(12:0)形成第七纳米乳液。

[0100] 此外,在某些实施方案中,可以改变本文所述的磷脂组分的相对比例,以在溶解度,乳液稳定性和氧摄取和释放动力学方面优化制剂。例如,第一种纳米乳液可以在溶液中以82DPPC(16:0),8DPPE(16:0)-MPEG-2000和10DPPE(16:0)的摩尔比来配制,所述溶液具有水-丙二醇-甘油85/10/5v/v/v和为0.75mg/mL至高达50mg/ml的总脂质浓度。在给定稀释剂中脂溶性差的情况下,丙二醇和甘油的相对量可相对于水增加。可以使用的磷脂组分不限于上面引用的实例中描述的那些。某些制剂可能需要磷脂混合物,其由给定分数的完全饱和的磷脂与给定分数其不饱和同源物组合而成。本领域普通技术人员很好地理解性质的调整和调节,例如凝胶到液晶的相变温度。

[0101] 在一些实施方案中,可能需要添加具有与实例组中提到的那些同源的头基的磷脂。例如,当采用MPEG350而不是MPEG2000时,采用MPEG2000的系统中的组分的相对比例可

能因需要比具有胆碱头基的MPEG磷脂更大比例的MPEG磷脂而不同。这也适用在以下情况，其中PEG化的磷脂或MPEG-磷脂和PEG-磷脂的组合用作表面活性剂系统。

[0102] 在一些实施方案中,胆碱型头基可包含更大或更小的烷基,或少于三个烷基。

[0103] 在一些实施方案中,在其头基中具有阳离子部分的磷脂如二酰基磷脂酰乙醇胺磷脂可以全部或部分地被带有中性头基的磷脂(例如二酰基磷脂酰甘油磷脂)或阴离子头基的磷脂(如二酰基磷脂酸)取代。

[0104] 在某些实施方案中,小分子物质可以用作粘精赋形剂,其可以抑制纳米微粒氟碳化合物乳液的沉降(反乳化)并且将溶液的总密度、粘度和张力调节至接近注入所述产品溶液的血液的总密度、粘度和张力。例如,可以使用以下的物质作为粘精:诸如丙二醇,甘油和糖醇,例如山梨糖醇,木糖醇,甘露糖醇和赤藓糖醇。类似地,其他多羟基化合物如在媒介物中具有适当溶解度的单糖,二糖或三糖也可用作粘精。实例是果糖,葡萄糖,木糖,蔗糖,海藻糖,棉子糖,水苏糖,藻酸盐(海藻酸盐),环糊精,取代的环糊精和葡聚糖。此外,直链或多支化聚乙二醇如PEG300,PEG400,PEG600和高达MW10,000的较高分子量PEG也可用作粘精。

[0105] 在某些实施方案中,医药领域的技术人员需要控制纳米乳液溶液的注射速率,以使纳米乳液与血液溶液之间的张力不匹配的影响最小化。然而,注射的纳米乳液不需要是等渗的。所述注射的纳米乳液可以是低渗的或高渗的,只要偏离等渗性的程度不会导致患者的不适或超过瞬时效应的组织损伤。

[0106] 在某些实施方案中,可以将所述纳米乳液注射到更大体积的稀释剂中,例如0.9％盐水,其任选地含有用于制备磷酸盐缓冲盐水的其他组分,例如磷酸盐缓冲剂。

[0107] 在某些实施方案中,可以使用除磷酸钠缓冲系统之外的缓冲剂来维持所述纳米乳液的pH。所述缓冲剂可以是以下游离酸形式和盐形式的盐或组合:例如乙酸,精氨酸,天冬氨酸,苯甲酸,碳酸,柠檬酸,葡糖酸,葡糖酸内酯,甘氨酸,组氨酸,赖氨酸,葡甲胺,磷酸或氨丁三醇;其中酸盐是缓冲系统的一部分。此外,抗衡离子通常是钠,葡甲胺或其他生物化学相容并允许用于肠胃外给药的阳离子。

[0108] 在某些实施方案中,螯合剂如EDTA二钠可用于螯合一定量的氧化金属离子如Fe^{3+},以保护含有不饱和磷脂的纳米乳液。此外,其他抗氧化剂赋形剂,如丙酮硫酸氢钠,顶空100％氩,棕榈酸抗坏血酸酯,抗坏血酸盐(钠/酸),亚硫酸氢钠,丁基羟基苯甲醚(BHA),丁基化羟基甲苯(BHT),半胱氨酸/半胱氨酸酯HCl,连二亚硫酸钠(Nahydrosulfite,Nasulfoxylate),龙胆酸,龙胆酸乙醇胺,谷胱甘肽,甲醛次硫酸盐(formaldehyde sulfoxylate),偏亚硫酸氢钠,偏亚硫酸氢钾,甲硫氨酸,氮100％(在顶空中),没食子酸丙酯,亚硫酸钠,生育酚α,α-生育酚琥珀酸氢盐,或巯基乙酸钠可被加入,以达到所述保护作用。

[0109] 此外,在某些实施方案中,抗微生物剂,例如苯扎氯铵,苯甲醇,苯甲酸,氯丁醇(三氯叔丁醇),间甲酚,肉豆蔻基γ甲吡啶鎓氯化物,对羟基苯甲酸甲酯,对羟基苯甲酸丙酯或硫柳汞(其量可以为0.005％至5％％w/v,取决于使用这些中的哪一种)可以被添加到制剂中。

[0110] 实施例1

[0111] 进行实验以研究纳米乳液的粒度分布。将十二氟戊烷[(DDFP)FluoroMed,Round Rock,TX]在缓冲在生理pH(~7)的30％(w/v)蔗糖溶液中以2％(w/v)乳化。纯化的医用级形

式的含氟表面活性剂,化合物21(PEG-调聚物B),以0.3％(w/v)浓度与Emulsiflex C-5均化器(Avestin,Ontario,加拿大)组合使用,以减少和稳定粒度为～250nm。由于DDFP(BP 29℃)的挥发性,设计和制造了带有冷却夹套的不锈钢(316L)压力容器(PV),用于在混合过程的3个阶段期间控制产品的温度和加压。PV之间的所有过程流动路径以1/4英寸I.D.柔软的尼龙管分段装置。管线的末端装有迷你1/2英寸卫生卡箍连接(triclamp fittings),选择这些装置以平稳无菌地连接均化器和PV之间的流动路径。因此,在整个制造过程中,产品完全与室内环境隔离。将过程温度控制在4-6℃,并使用压缩氮气将容器顶部空间中的压力控制在5-7psi。将乳液再循环(连续均化)通过均化阀,在14,000psi下进行6次通过(有效),然后立即通过0.2μm无菌过滤胶囊过滤。使用**Unispence®** (Wheaton,Millville,NJ)填充机,将所得产物装入5mL小瓶中,所述小瓶手动迅速塞住并用气动Power Crimper(Kebby Industries)压褶。

[0112] 在0、1、2、3周和1、2、4、6和11个月时一式三份评估乳液的粒度分布。在每个时间点,随机选择3个小瓶,并使用PSS Nicomp 380DLS亚微米粒度分级仪(颗粒分级系统(Particle Sizing Systems),Port Richie,FL)通过动态光散射进行分析。为了最小化尺寸确定期间逐渐升温的影响,将样品温度控制在19℃。

[0113] 以强度加权平均直径(IWMD)给出的平均粒度不超过260nm。此外,在整个研究中,测量到99％的颗粒具有小于或等于400nm的直径。总体积小于0.8％的颗粒由0.5μ和50μ之间的颗粒组成。

[0114] 实施例2

[0115] 使用TDFH/化合物21(PTB)进行实验以研究亚微米颗粒的尺寸,0.5至50微米区域中的颗粒的尺寸,纳米颗粒乳液在不同温度下的稳定性。

[0116] 通过以下制备常规纯化医用级化合物21(J.Tech Sales,Boca Raton,FL)的6％溶液:组合1.2g等分试样的化合物21,其中y为5且其中n为1至16,在玻璃闪烁小瓶中用注射用水(**HyPure®,**来自Hyclone)稀释至预先测量的20mL体积的标记,并使用小的十字形磁力搅拌器在5℃下搅拌0.5小时。将溶液储存在4℃的冰箱中。将先前制备的化合物21在水中的溶液从冰箱中取出,并将12.12mL部分加入装有小桶形磁力搅拌棒的15mL RB烧瓶(总容量21mL)中。然后加入冷的(4℃)TDFH(Sigma Aldrich Co.St.Louis,MO),3.17mL,(5.29g),将烧瓶用14/20橡胶隔膜盖住,并浸入2℃冰-水浴中。将混合物搅拌1小时。

[0117] 在搅拌期间,向注射器冷却罐和PV1-PV3冷却罐中加入冰水。含有浮动磁力搅拌器的压力容器装有盖子,每个盖子带有一个Swagelok™底部入口双位仪器球阀(bottom-entry two-position instrument ball valve),其连接到0.25”OD 316SS汲取管(dip tube)(用于从容器中引入和取出产品)和一个三通三位旋塞阀,其用作氮气入口和通风系统。将带有盖子的PV1和大型十字形搅拌器填充磷酸盐缓冲的蔗糖溶液(216.8mL)并放入PV1-PV3冷却罐并开始搅拌。将PV2放入罐中,并通过适当放置在PV1附近,使两个搅拌器都运转。在接收来自PV2产品之前,将PV3置于冰浴中冷却。准备好0.8/0.2微米Pall AcrodiscTM(聚醚砜过滤膜(Supor membrane)以连接到PV3的仪器阀入口。

[0118] 将Kirkland产品手持式均化器(“均化器”)用常规WFI清洗,然后用冷WFI(25mL)冲洗。将带有玻璃柱塞的带有冷夹套的25mL玻璃Perfektum MicroMate™注射器连接到均化器

的输入和输出鲁尔锁配件(Luer lock fitting)上。接收注射器配有带鲁尔锁配件的双向停止旋塞。输入气体管线(80psi)连接到均化器的气动活塞单元。在初级乳液的搅拌期结束时,将输出注射器从均化器中移走并装上17号针头。将初级乳液取出到注射器中,然后移走针头,将注射器快速固定在均化器的输入侧。使用BioRad Econopump蠕动泵将冰水从注射器浴冷却罐中泵送通过串联的注射器。蠕动泵配有两段1/8”直径的**Pharmed®**管,其使用Y型连接器在输入侧和输出侧连接,以获得38mL/min的总流速。蠕动泵的冷却剂管线与输出注射器和输入注射器串联连接并开始冷却剂的循环。打开均化器的旁通阀,通过交替压下注射器柱塞,将初级乳液在输出注射器和输入注射器之间转移几次;初级乳液的最终位置在输入注射器中。关闭旁通阀,气动单元操作以~30mL/min的泵送速率启动。当输入注射器的内容物完全转移到输出注射器时,旁通阀快速打开,输出注射器的柱塞被压下以快速将均化的初级乳液转移回输入注射器,关闭旁通阀,并开始第二次通过。以这种方式,将初级乳液进行通过均化器的20次不连续的通过。在该程序结束时,初级乳液位于输出注射器。

[0119] 将输出注射器与均化器出口断开,并将针放在PV1中搅拌溶液表面下方约2英寸处。将初级乳液从注射器注入PV1。用氮气(~8-10psi)加压PV1并搅拌混合物约5分钟,在此期间将1/16”管(编织的有机硅-铂固化)从PV1的汲取管旋塞阀连接到均化器输入侧,并从PV2汲取管旋塞阀连接到均化器的输出侧。氮气压力在PV1中保持,使PV2排气到大气中。PV2的汲取管球阀打开,接着打开PV1的汲取球阀,同时启动均化器。这导致初级乳液在32%蔗糖溶液中的搅拌溶液通过化器的一次通过从PV1转移到PV2。将溶液转移到PV2后,PV1从PV1-PV3冷却罐中移出,配置PV2-PV3对,以便在两者中均得到搅拌。Pall Sciences Acrodisc 20™0.8/0.2微米过滤器通过汲取管球阀入口/出口连接在PV2和PV3之间。然后将PV2用氮气加压,最初在~12psi下,以启动PV2中的溶液到PV3的转移过滤。过滤需要约30-40分钟完成,转移几乎是定量的。

[0120] 将PV3中过滤的溶液转移到含有冰水的结晶皿中,用夹子稳定,用氮气加压至约8psi,并将内部溶液搅拌~15分钟。此后,将具有50个带着灰色丁基橡胶塞的标称2mL血清小瓶(总容量3mL)的两个Wheaton小瓶托盘从冰箱中取出。在输出侧装有12号SS管的1/16” i.d.编织有机硅管连接到PV3上仪器阀的输出端。PV3中的压力调节到约5psi,汲取管旋塞阀被打开通至管。通过以下填充小瓶(以10个为一组):从小瓶中取出带凹口的塞子,打开和关闭连接到PV3的管的远端处的停止旋塞,并更换带凹口的塞子。

[0121] 填充10个小瓶后,将它们塞住并压褶封盖。重复该过程直至PV3中的溶液被耗尽。得到65个小瓶,填充体积为2.6-2.7mL。将托盘中的小瓶储存在4℃下以进行稳定性研究。以相同的方式制备第二批材料并在23℃下储存以探测储存温度对颗粒稳定性的影响。

[0122] 表1.使用Nicomp 380DLS通过动态光散射对在4℃下储存的TDFH-化合物21纳米乳液的亚微米颗粒分级

[0123]

小瓶号	IWMD (nm)	标准偏差(nm)	99%累积分布(nm)
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
平均值	186.4	53.9 (28.9%)	<351.5
标准偏差	2.29	9.13	34.39
RSD (%)	1.23	16.93	9.79

[0124] 使用PSS Nicomp 380DLS亚微米粒度分级仪(颗粒分级系统(Particle Sizing Systems),Port Richie,F1)的在制备后立即获得的亚微米颗粒分级数据显示在表1中。以IWMD测量的TDFH-化合物21纳米乳液的平均粒度不会发生变化,并且良好保持在释放规格内。此外,在整个研究中,测量到99%的颗粒具有小于或等于400nm的直径。

[0125] 表2.使用PSS Accusizer 780SIS 0.5-500微米通过单颗粒光学传感对在4℃下储存的TDFH-化合物21纳米乳液的颗粒分级

[0126]

小瓶号	分级>0.5微米的阈值的颗粒总数	分级为5.02-50.45微米的颗粒数	由分级为5.02-50.45微米的颗粒所占整个乳液的体积%
2	62145	690	0.899
16	58232	779	0.746
31	55441	544	0.714
平均值	58606	671	0.786
标准偏差	3368	118.65	0.10
%RSD	5.75	17.68	12.57

[0127] 使用PSS 780SIS光遮蔽仪(light obscuration instrument)(颗粒分级系统(Particle Sizing Systems),Port Richie,FL)获得0.5至50微米区域的粒度数据,并将其显示在表2中。总体积小于0.8%的颗粒由0.5μ和50μ之间的颗粒组成,并且大部分体积的颗粒由小于0.5微米的阈值的颗粒组成。

[0128] 表3和表4分别提供了在4℃和23℃下粒度和99%累积分布的数据。

[0129] 表3.存储在4℃的TDFH-化合物21纳米乳液的颗粒稳定性随时间的变化

[0130]

制备后时间(周)	IWMD (nm)	标准偏差(nm)	SD%	99%的累积分布<(nm)
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

[0131] 当TDFH-化合物21纳米乳液在4℃下储存时,以IWMD测量的颗粒的平均粒度变化非常缓慢并且良好地保持在释放规格内。此外,在整个研究中,测量到99%的颗粒具有≤400nm的直径。

[0132] 表4.在23℃下储存的TDFH-化合物21纳米乳液的粒度稳定性数据

[0133]

制备后时间（周）	IWMD (nm)	标准偏差 (nm)	99%累积分布 (nm)
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

[0134] 当TDFH-化合物21纳米乳液在23℃下储存时,以IWMD测量的颗粒的平均粒度变化缓慢但仍然良好地保持在释放规格内。此外,在整个研究中,测量到99%的颗粒具有≤530nm的直径。

[0135] 表5.在4℃和23℃下储存的TDFH-化合物21粒度和99%累积分布<随时间的变化

[0136]

制备后时间（周）	IWMD (nm) 在4 ℃	IWMD (nm) 在23 ℃	99% 累积分布< (nm) 在23℃	99% 累积分布< (nm) 在4 ℃
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	

[0137] 表3,表4和表5中显示的上述数据清楚地表明,TDFH-化合物21纳米乳液在4℃和23℃的储存温度下良好地保持在释放和货架期的规格内。此外,数据的趋势表明在26周时不会超过货架期规格。

[0138] 实施例3

[0139] 通过高压均化制备的十四氟-正己烷(TDFH)和化合物20a的纳米颗粒乳液。

[0140] 进行实验以分析TDFH和化合物20a的纳米颗粒乳液的粒度,TDFH和化合物20a的纳米颗粒乳液在4℃的粒度,TDFH和化合物20a的纳米颗粒乳液在23℃的粒度稳定性,在4℃储存的TDFH-化合物20a和TDFH-化合物20a的粒度和99%累积分布随时间的变化。

[0141] 通过以下制备化合物20a的6%溶液(J.Tech Sales,Boca Raton,FL)(20mL):添加

1.2g等分试样的表面活性剂,在玻璃闪烁小瓶中用注射用水(来自Hyclone的HyPure)稀释至预先测量的20mL体积的标记,并使用小的十字形磁力搅拌器在5℃下搅拌0.5小时。溶液在5℃下澄清并储存在冰箱中(3℃)。该溶液可以存储并用于不同的实验。

[0142] 将6.25mL部分的化合物20a溶液加入到配有小桶形磁力搅拌棒的15mL血清小瓶中。然后加入冷的(4℃)TDFH(Sigma Aldrich Co.St.Louis,MO)1.52mL(2.53g),将小瓶用橡胶隔膜盖住,浸入冰水浴(2℃)中,在该温度下搅拌混合物1小时。

[0143] 将包含用于通过注射器冷夹套循环的冷却浴罐的矩形不锈钢盘和用于压力容器的单独冷却浴从冰箱中取出并且两者都装有冰水。PV1,PV2和PV3(每个都是装有附件的125mL容器,如实施例2中所述的装有大型十字形磁力搅拌器的较大容器)安装盖子,具有适当的用于产品和氮气的阀门入口和出口。向PV1中加入10mM磷酸盐缓冲(pH 7)蔗糖(32%wt/vol蔗糖,104mL)并将其置于PV1-PV3冷却罐中并开始搅拌。将PV2和PV3也放入罐中并开始搅拌。

[0144] 将装配到气动泵送单元的均化器用常规WFI清洗,然后用冷WFI(25mL)冲洗。将带有玻璃柱塞的冷夹套10mL玻璃Popper和Sons注射器(Popper and Sons syringe)连接到均化器的输入和输出鲁尔锁配件。打开均化器的旁通阀,通过注射器柱塞的交替按压将初级乳液在输出注射器和输入注射器之间转移若干次,其中初级乳液的最终位置在输入注射器中。关闭旁通阀并以约30mL/min的泵送速率启动气动单元操作。当输入注射器的内容物完全转移到输出注射器时,旁通阀快速打开,然后压下输出注射器的柱塞,将均化的初级乳液快速转移回输入注射器,然后旁通阀关闭,并且开始第二次通过。以这种方式,使初级乳液进行通过均化器的20次不连续的通过。在该操作结束时,初级乳液在输出注射器中。

[0145] 将输出注射器与均化器出口不相连,连接至PV1,并将初级乳液从注射器注入PV1。用氮气(~8-10psi)加压PV1并将混合物搅拌约5分钟。氮气压力保持在PV1中,将PV2排气到大气中。将PV1中的初级乳液与32%蔗糖溶液混合的搅拌溶液转移至PV2是在通过均化器的一次通过中完成的。然后在PV2和PV3之间连接Pall Sciences 32mm0.8/0.2微米Acrodisc注射器过滤器。用~12psi的氮气对PV2加压,并将PV3排气到大气中,以引发溶液从PV2过滤/转移到PV3。~5分钟后,压力增加至15psi,约10分钟后增加至25psi。过滤需要约30-40分钟才能完成,转移几乎是定量的。

[0146] 用氮气将在约4℃冷却的PV3加压至约8psi,并将其中的溶液搅拌~15分钟。此后,从冰箱中取出装有40个2mL(标称体积)血清小瓶的Wheaton小瓶托盘,该小瓶装有灰色丁基橡胶带凹口的塞子。1/16”i.d.编织有机硅管在其输入侧安装有公鲁尔锁连接器并且在其输出侧安装有连接到双公鲁尔锁连接器的母鲁尔配件,所述有机硅管、单向旋塞阀(处于关闭位置)和最后16号针头固定在PV3的汲取管旋塞阀上。将PV3中的压力调节至5psi,并将前2mL溶液排出。然后通过以下填充小瓶(以10个为一组):从小瓶取下带凹口的塞子,打开和关闭连接到PV3的管远端的旋塞阀,并更换带凹口的塞子。填充10个小瓶后,将它们手动压褶。重复此过程直至PV3中的溶液被耗尽,这得到34个小瓶,其填充量约为2.6-2.7mL(产品收率为~88-91%)。检查小瓶的压褶密封性,如有需要,重新压褶以确保紧密压褶。将小瓶保存在4℃冰箱以用于稳定性研究。

[0147] 表6.使用PSS Nicomp 380DLS通过动态光散射对在4℃下储存的TDFH-化合物20a纳米乳液的亚微米颗粒分级

[0148]

小瓶号	IWMD (nm)	标准偏差 (nm)	99% 累积分布 (nm)
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
平均值	216.0	36.3 (16.8%)	<318.1
标准偏差	2.79	18.5	58.2
RSD (%)	1.29	51.0	18.3

[0149] 使用Nicomp 380DLS亚微米粒度分级仪(颗粒分级系统(Particle Sizing Systems),Port Richie,FL)针对选自填充小瓶整个范围的5个小瓶的物质制备后立即进行产物的粒度分析。

[0150] 以IWMD测量的TDFH-化合物20a纳米乳液的平均粒度为约216nm并且在不同样品之间变化不大。此外,TDFH-化合物20a纳米乳液的平均99%累积分布小于318nm。

[0151] 表7.使用PSS Accusizer 780SIS 0.5-500微米通过单颗粒光学传感对在4℃下储存的TDFH-化合物20a纳米乳液的颗粒分级

[0152]

小瓶号	分级> 0.5 微米的阈值的颗粒总数	分级为 5.0-50 微米的颗粒的数	由分级为 5.02-50.45 微米的颗粒所占整个乳液的体积%
2	134919	422	1.12
16	182911	405	0.53
33	180519	296	1.12
平均值	166116	374	0.923
标准偏差	27044	68.37	0.340
%RSD	16.28	18.26	36.69

[0153] 使用PSS Accusizer 780SIS(颗粒分级系统(Particle Sizing Systems),Port Richie,FL)通过光遮蔽进行0.5至50微米范围的颗粒分级。平均而言,整个TDFH-化合物20纳米乳液的总体积的约0.9%含有分级为5.02-50.45微米之间的颗粒。

[0154] 表8.在4℃下储存的化合物TDFH-化合物20a纳米乳液的粒度稳定性数据*

[0155]

制备后时间	IWMD (nm)			标准偏差 (nm)			99% 累积分布< (nm)		
周	平均值 (nm)	平均值标准偏差	RSD	平均值 (nm)	平均值标准偏差	RSD	平均值 (nm)	平均值标准偏差	RSD
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

[0156] *对于每个时间点N＝3

[0157] 表9.在4℃储存的TDFH-化合物21和TDFH-化合物20a的粒度和99％累积分布<随时间的变化*

[0158]

制备后时间（周）	TDFH-化合物 21 IWMD（nm）在 4℃	TDFH-化合物 20a IWMD（nm）在 4℃	TDFH-化合物 21 99% 累积分布< (nm)在 4℃	TDFH-化合物 20a 99% 累积分布< (nm)在 4℃
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	

[0159] *对于每个时间点N＝3

[0160] 实施例4

[0161] 通过高压均化制备的DDFP和化合物20a的纳米颗粒乳液

[0162] 进行实验以研究通过高压均化制备的DDFP-化合物20a纳米乳液的亚微米粒度。通过实施例3的方法制备纳米乳液,不同之处在于用DDFP(Fluoromed,Round Rock,TX)代替TDFH。使用PSS Nicomp 380DLS亚微米颗粒分级仪(颗粒分级系统(Particle Sizing Systems),Port Richie,FL)进行亚微米粒度分级。

[0163] 表10.通过高压均化制备的DDFP-DuPont化合物20a纳米乳液的亚微米颗粒分级,使用Nicomp 380DLS亚微米粒度分级仪

[0164]

小瓶号	IWMD (nm)	标准偏差 nm, %	99% 累积分布 (nm)
19	238	68.8, 28.9%	446.8
7	234.8	52.4, 22.3%	384.6
平均值	236.4	60.6, 25.6%	415.7

[0165] DDFP-化合物20纳米乳液的亚微米粒度的强度加权平均直径为236.4nm和99％累积分布小于415.7nm,这基本上等于DDFP-化合物21,TDFH-化合物21和TDFH-化合物20a的纳米乳液的获得的初始值。

[0166] 实施例5

[0167] 通过涡旋然后超声处理制备DDFP和化合物20a的纳米颗粒乳液

[0168] 进行实验以研究通过涡旋然后超声处理制备的DDFP-化合物20a纳米乳液的亚微米粒度。总容量为262mL的圆柱形玻璃瓶装有浮动磁力搅拌棒和带有两个进气口的螺纹盖和两位置底部进入球阀-汲取管组合,并用干燥的超纯氮气吹扫。然后将含水(WFI,来自Hyclone的Hypure)磷酸盐缓冲(10mM NaH_2PO_4/Na_2HPO_4,pH 6.9)蔗糖(30％w/v)210mL和化合物20(J.Tech Sales,Boca Raton,FL)溶液(0.672g在10.68mL的0.2微米过滤器过滤的蒸馏去离子水中)在262mL容器中合并,并在4℃冷却下搅拌。搅拌5分钟后,用氮气将容器加压至3psi。球阀的一个出口配有Dow Corning **Silastic®**管(1/8”o.d.),其通过鲁尔锁至1/8”倒钩衔接头(barb adaptor)连接到3通无菌一次性旋塞阀。剩下的两个端口装有10mL Becton和Dickinson(Franklin Lakes,NJ)无菌一次性注射器和18号1.5”无菌一次性针头。

[0169] 将三通旋塞定位成允许溶液从容器抽吸到注射器中,直到将7.8mL的体积加载到注射器中。然后设置旋塞阀的位置以允许从注射器通过18号针头输送溶液。向一托盘的25个标称5mL容量(9mL总容量)血清小瓶(用干燥氮气吹扫,装有卤化丁基塞子,并保持在4℃冰箱中1小时)中通过以下加入7.8mL等分试样的溶液:稍微抬起塞子,将针尖定位在小瓶的口中,然后按下注射器柱塞,然后快速更换塞子。在所有小瓶中加入溶液后,使用Becton和Dickinson 0.5mL Lo Dose U-100胰岛素注射器向每个小瓶中快速加入冷(~0℃)DDFP(0.156g,0.089mL)并立即塞住并且压褶封盖。

[0170] 为了制备纳米颗粒,将小瓶以4500rpm直立1分钟,倒置1分钟,和直立1分钟涡旋。然后将小瓶放置在VWR Aquasonic 75HT超声波清洗浴中心直到颈部并超声处理5分钟。以相同方式处理第二个小瓶,并使用PSS Nicomp 380DLS亚微米粒度分级仪(颗粒分级系统(Particle Sizing Systems),Port Richie,FL)分析粒度和分布。表11.通过涡旋和超声处理制备的DDFP-化合物20a纳米颗粒纳米乳液的亚微米颗粒分级,使用Nicomp 380 DLS亚微米粒度分析仪

[0171]

小瓶号	IWMD (nm)	标准偏差 nm, %	99% 累积分布 (nm)
2	274	95.1, 34.7%	578
22	275	105.3, 38.3%	622
平均值	274.5	100.2, 36.5%	600

[0172] DDFP-化合物20a纳米乳液的亚微米粒度的平均直径为274.5nm和99％累积分布小于600nm,这超过DDFP-化合物21,TDFH-化合物21和TDFH-化合物20a的纳米乳液获得的初始值,但是仍然在本文所述的纳米乳液的讨论的释放和货架期(shelf life)规格内。

[0173] 设计该制剂以将氧气吸入富氧区域的全氟碳化合物中并在输送到组织时释放氧气,所述组织中缺氧导致低氧张力(缺氧组织)。因此,当将制剂注入富氧环境或其中氧浓度高于乳化全氟碳化合物中的氧浓度的环境时,它首先从存在它的溶液中吸取溶解的氧。当

纳米乳液颗粒被输送到缺氧组织或其中溶解氧浓度低于纳米颗粒中溶解氧浓度的组织时，氧气从纳米颗粒中释放出来，如基于氧浓度的物理梯度所预期的。为了评估该实施例的制剂是否可以从水溶液中吸收氧，使用图7所示的设置进行体外测试。将含有约200mL 0.9％盐水和搅拌棒的夹套烧杯连接到循环水浴(温度＝37℃±0.3℃)并置于搅拌板(速度＝550RPM)上。使用橡胶塞覆盖烧杯的顶部，所述橡胶塞包含用于Oakton DO 110溶解氧探针(Vernon Hills,IL)的进入孔和用于引入制剂的较小孔。在温度和溶解氧读数平衡后，通过小进入孔将5mL制剂注入0.9％盐水溶液中。然后使用鲁尔锁塞配件密封进入孔，并将容器的顶部包裹在石蜡膜中以防止氧气进入容器。以30秒的间隔持续90分钟获得溶解氧读数，并使用溶解氧测定仪上的串行端口连接和供应商提供的CyberComm便携式数据采集软件将所述读数自动转移到便携式电脑上。在图8中以图形形式示出了氧水平随测量期间的明显降低。使用盐水对照的相应图显示在相同期间内溶解氧水平没有降低。

[0174] 实施例6

[0175] 使用基于C16的磷脂表面活性剂系统制备DDFP的纳米乳液

[0176] 进行实验以研究在基于棕榈酰的磷脂表面活性剂系统中制备的DDFP纳米乳液的亚微米粒度。在50mL烧杯中将22mL等分试样的丙二醇在搅拌下加热至55℃。1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷脂酰胆碱(399mg)，1,2-棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-5000]钠盐(305mg)和1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(45.88mg)在搅拌下依次加入，搅拌混合物直至磷脂溶解(5-15min)。然后在约2min内在55℃将磷脂的丙二醇溶液滴加到含有磷酸二氢钠·H_2O(173.9mg)和无水磷酸氢二钠(137.87mg)的水/甘油95/5v/v(200.7mL)的搅拌混合物中。加入磷脂的甘油溶液后，将溶液搅拌5分钟。立即推动溶液通过32mm Pall Sciences GH **Polypro**®0.2微米过滤器过滤到250mL瓶中，然后立即用干燥的超纯氮气吹扫。使溶液冷却至环境温度。然后向标称的5mL血清小瓶(实际容量9mL)中加入7.56mL等分试样的磷脂悬浮液，接着用干燥的超纯氮气吹扫顶部空间并用卤化丁基橡胶塞塞住。将带塞的小瓶(在托盘中)置于4℃的冰箱中直至小瓶内容物平衡至该温度。然后取出托盘并向小瓶中装入DDFP(Fluoromed,Round Rock,TX)并如实施例5所述进行压褶封盖。如实施例5所述，通过涡旋小瓶和超声处理(持续不同时间段)制备纳米乳液。超声时间分别为2分钟，8分钟和16分钟。

[0177] 表12.通过涡旋和超声处理混合组分制备的DDFP-DPPC-DPPE-DPPE-MPEG5000纳米乳液的亚微米颗粒分级

[0178]

样品处理	IWMD (nm)	标准偏差 (nm)	%标准偏差	99%的分布<(nm)	Chi^2	VWMD* (nm)	NWMD* (nm)
涡旋1分钟 超声处理2分钟	396	163.8	41.41	950.7	0.11	451.8	201.3
涡旋1分钟 超声处理8分钟	372	139.7	37.51	830.1	0.12	414.2	222.3
涡旋1分钟 超声处理16分钟	360	103.7	28.81	674.6	0.58	386.9	286

[0180] *VWMD＝体积加权平均直径，NWMD＝数量加权平均直径

[0181] 根据表12中的数据，超声处理16分钟后获得的纳米乳液在强度加权平均颗粒直径

的最佳值内,并且99%累积分布<值与使用全氟碳化合物基表面活性剂体系的DDFP纳米乳液的期望值相当。

[0182] 实施例7

[0183] 使用基于C14的磷脂体系作为表面活性剂和超声处理混合组分的小瓶的而制备DDFP纳米乳液

[0184] 在搅拌下将22mL等分试样的丙二醇在50mL烧杯中加热至55℃。1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷脂酰胆碱(677.9mg),1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]钠盐(174mg)和1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(50.95mg)在搅拌下依次加入,搅拌混合物直至磷脂溶解(约15分钟)。然后在约2分钟内在55℃将磷脂的丙二醇溶液滴加到含有磷酸二氢钠·H_2O(173.9mg)和无水磷酸氢二钠(137.87mg)的水/甘油95/5v/v(200.7mL)的搅拌混合物中。加入磷脂的甘油溶液后,将溶液搅拌5分钟。立即通过32mm Pall Sciences GH **Polypro®**0.2微米过滤器将溶液推动过滤到250mL瓶中,然后立即用氮气吹扫所述瓶。使溶液冷却至环境温度。然后向标称的5mL血清小瓶(实际容量9mL)中加入7.56mL等分试样的磷脂悬浮液,接着用干燥的超纯氮气吹扫顶部空间并用卤化丁基橡胶塞塞住。将带塞的小瓶(在托盘中)置于4℃的冰箱中直至小瓶内容物平衡至该温度。然后取出托盘,向小瓶中装入DDFP(Fluoromed,Round Rock,TX),并如实施例5所述进行压褶封盖。如实施例5所述,通过涡旋小瓶和超声处理制备纳米乳液。

[0185] 表13.实施例7的DDFP-磷脂-30%缓冲蔗糖制剂的亚微米颗粒分级数据

[0186]

IWMD (nm)	VWMD (nm)	NWMD (nm)	标准偏差 (%)	Xi^2	IW99% CUM< (nm)	VW99% CUM< nm
301.6	313.6	240.7	25.9	0.22	532.4	553.7

[0187] 如对实施例5的制剂的评价所述,评价制剂从富氧环境中吸收氧的能力。在图9中以图形形式示出了氧水平随测量期间的明显降低。使用盐水对照的相应图表显示在相同期间内溶解氧水平没有降低。

[0188] 实施例8

[0189] 使用基于C14的磷脂体系结合化合物20a(DuPont FS-3100)作为表面活性剂和超声处理混合组分的小瓶而制备DDFP纳米乳液。

[0190] 以下的制剂:1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷脂酰胆碱(677.9mg),1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]钠盐(174mg)和1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(50.95mg)和纯净的DuPont Capstone FS-3100化合物20a,(16μL,23mg,0.3%w/v),然后是DDFP(0.153g,89μL,2%w/v)。立即将小瓶涡旋,直立1分钟和倒置1分钟。然后将小瓶在VWR Aquasonic 75HT超声波清洗浴中超声处理8分钟,持续8分钟。然后,从小瓶中取出5.2mL等分试样的乳液,并使用PSS Nicomp 380DLS亚微米粒度分级仪对0.1mL等分试样进行颗粒分级和5mL等分试样用于上述氧摄取测定。超声处理后该制剂的颗粒分级数据显示在表14中。

[0191] 表14.实施例7的DDFP-Capstone FS-3100-磷脂-30%缓冲蔗糖制剂的亚微米颗粒

分级数据

[0192]

IWMD (nm)	VWMD (nm)	NWMD (nm)	标准偏差 (%)	Xi^2	IW99% CUM< (nm)	VW99% CUM< nm
204.1	171.1	105.1	34.9	0.25	432.3	363.7

[0193] 在图10中以图形形式示出了氧水平随测量期间的明显降低。使用盐水对照的相应图显示在相同期间内溶解氧水平没有降低。

[0194] 预示性实施例1

[0195] 使用基于C14的磷脂体系作为表面活性剂以及均化初级乳液、然后均化转移和亚微米过滤而制备DDFP纳米乳液

[0196] 在搅拌下将22mL等分试样的丙二醇在50mL烧杯中加热至55℃。1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷脂酰胆碱(677.9mg),1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]钠盐(174mg)和1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(50.95mg)在搅拌下依次加入,搅拌混合物直至磷脂溶解(~15分钟)。将溶液冷却至环境温度,然后加入注射用水(20mL),冷却至10℃并加入冷DDFP(4.51g,2.61mL)并在10℃下快速搅拌30分钟。使用Kirkland产品手持式均化器在5℃下对所得物质进行离散均化,总共经过20次。然后将该物质加入甘油在注射用水中的溶液。然后将纳米乳液加入到搅拌的205.4mL30%蔗糖溶液中,并在氮气氛(5psi)下搅拌10分钟。此后,将溶液通过均化器转移至保持在2-5℃的第二个容器中,然后将其搅拌15分钟,并通过Pall Sciences 0.8/0.2微米Acropak 200过滤器过滤到2-5℃的第三容器中,转移后在该温度下搅拌15分钟。然后将该物质装入标称的5mL Wheaton小瓶中,用灰色卤化丁基橡胶塞塞住,并压褶封盖,并储存。

[0197] 预示性实施例2

[0198] 使用基于C14的磷脂体系作为表面活性剂形成TDFH纳米乳液

[0199] 在搅拌下将22mL等分试样的丙二醇在50mL烧杯中加热至55℃。在搅拌下加入实施例1的磷脂,搅拌混合物直至磷脂溶解(~15分钟)。然后在约2分钟期间内在55℃将磷脂的丙二醇溶液滴加到含有磷酸二氢钠·H_2O(173.9mg)和无水磷酸氢二钠(137.87mg)的水/甘油95/5v/v(200.7mL)的搅拌混合物中。加入磷脂的甘油溶液后,将溶液搅拌5分钟。立即通过32毫米Pall Sciences GH **Polypro®**0.2微米过滤器将溶液推动过滤到250mL瓶中,然后立即用氮气吹扫所述瓶。使溶液冷却至环境温度。然后向标称的5mL血清小瓶(实际容量9mL)中加入7.56mL等分试样的磷脂悬浮液,接着用干燥的超纯氮气吹扫顶部空间并用卤化丁基橡胶塞塞住。将带塞的小瓶(在托盘中)置于4℃的冰箱中直至小瓶内容物平衡至该温度。然后取出托盘并向小瓶中装入TDFH(Sigma Aldrich Co.St.Louis,MO)并如实施例5所述进行压褶封盖。如实施例5所述,通过涡旋小瓶和超声处理制备纳米乳液。

[0200] 预示性实施例3

[0201] 使用具有化合物20a作为辅助表面活性剂的基于C14的磷脂体系和超声处理混合组分的小瓶而制备DDFP纳米乳液

[0202] 遵循实施例6的方法,除了表面活性剂体系除了基于C14-磷脂的体系外还包含30摩尔%的化合物20a。然后类似地制备纳米乳液。来自实施例1-6和预示实施例1和2的类似

程序和技术可用于制备基于月桂酰(C12)的磷脂表面活性剂体系的纳米乳液。

[0203] 虽然已经详细说明了本发明的优选实施方案,但是显而易见的是,在不脱离本发明的范围的情况下,本领域技术人员可以对这些实施方案进行修改和调整。

[0204] 预示性实施例4

[0205] 使用基于C12的磷脂体系作为表面活性剂以及初级乳液的均化、然后均化转移和亚微米过滤而制备DDFP纳米乳液

[0206] 在搅拌下将22mL等分试样的丙二醇在50mL烧杯中加热至55℃。1,2-双十二烷酰基-sn-甘油基-3-磷脂酰胆碱(677.9mg),1,2-双十二烷酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]钠盐(174mg)和1,2-双十二烷酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(50.95mg)在搅拌下依次加入,搅拌混合物直至磷脂溶解(~15分钟)。将溶液冷却至环境温度,然后加入注射用水(20mL),冷却至10℃并加入冷DDFP(4.51g,2.61mL)并在10℃下快速搅拌30分钟。使用Kirkland产品手持式均化器在5℃下对所得物质进行均化,总共经过20次。然后将该物质加入甘油在注射用水中的溶液中。然后将纳米乳液加入到搅拌的205.4mL 30%蔗糖溶液中,并在氮气氛(5psi)下搅拌10分钟。此后,将溶液通过均化器转移至保持在2-5℃的第二个容器中,然后将其搅拌15分钟,并通过Pall Sciences 0.8/0.2微米Acropak 200过滤器过滤到2-5℃的第三容器中,转移后在该温度下搅拌15分钟。然后将物质装入标称的5mL Wheaton小瓶中,用灰色卤化丁基橡胶塞塞住,并压褶封盖,并储存。

[0207] 在本文中参考附图在优选实施方案中描述了申请人的公开,其中相同的数字表示相同或相似的元素。在整个说明书中对“一个实施方案”,“实施方案”或类似语言的引用意味着结合该实施方案描述的特定特征,结构或特性包括在本发明的至少一个实施方案中。因此,在整个说明书中出现的短语“在一个实施方案中”,“在实施方案中”和类似语言可以但不是必须全部指代相同的实施方案。

[0208] 申请人的公开内容的所描述的特征,结构或特性可以在一个或多个实施方案中以任何合适的方式组合。在本文的描述中,叙述了许多具体细节以提供对本发明实施方案的透彻理解。然而,相关领域的技术人员将认识到,申请人的组合物和/或方法可以在没有一个或多个具体细节的情况下实施,或者与其他方法、组分、材料等一起实施。在其他情况下,未详细示出或描述公知的结构,材料或操作以避免模糊本公开的各方面。

[0209] 所包括的示意性流程图通常被阐述为逻辑流程图(例如,图1、2、3、4和5)。这样,所描绘的顺序和标记的步骤指示所呈现的方法的一个实施方案。可以设想其他步骤和方法,其在功能,逻辑或效果上等效于所示方法的一个或多个步骤或其部分。另外,提供所采用的格式和符号以解释该方法的逻辑步骤,并且不应理解为限制该方法的范围。尽管在流程图中可以采用各种箭头类型和线类型,但是应理解它们不限制相应方法的范围(例如,图1、2、3、4和5)。实际上,可以使用一些箭头或其他连接物来仅指示该方法的逻辑流程。例如,箭头可以指示所描绘方法的列举步骤之间的未指定持续时间的等待或监控期间。另外,特定方法发生的顺序可能严格遵守或不严格遵守所示相应步骤的顺序。

[0210] 在本说明书和所附权利要求中,单数形式“一”,“一个”和“该”包括复数指代,除非上下文另有明确说明。

[0211] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解的含义相同的含义。尽管与本文描述的那些类似或等同的任何方法和材料也可用

于本公开的实践或测试,但现在描述优选的方法和材料。除了所公开的特定顺序之外,本文所述的方法可以以逻辑上可能的任何顺序进行。

[0212] 以参考方式并入

[0213] 在本公开中已经对诸如专利,专利申请,专利出版物,期刊,书籍,论文,网络内容之类的其他文件进行了引用和引述。出于所有目的,所有这些文件都通过引用整体并入本文。据称通过引用并入本文但与本文明确阐述的现有定义、陈述或其他公开材料相冲突的任何材料或其部分仅并入至所并入的材料与本公开材料之间不发生冲突的程度。在发生冲突的情况下,支持本公开作为优选公开为准而解决冲突。

[0214] 等同物

[0215] 代表性实施例旨在帮助说明本发明,并且不旨在也不应被解释为限制本发明的范围。实际上,除了本文所示和所述的那些之外,本发明的各种修改及其许多其他实施方案对于本领域技术人员来说将从本文的全部内容(包括本文包括的实施例和对科学和专利文献的参考)而变得显而易见。这些实施例包含重要的附加信息,例证和指导,其可以在其各种实施方案及其等同物中适用于本发明的实践。

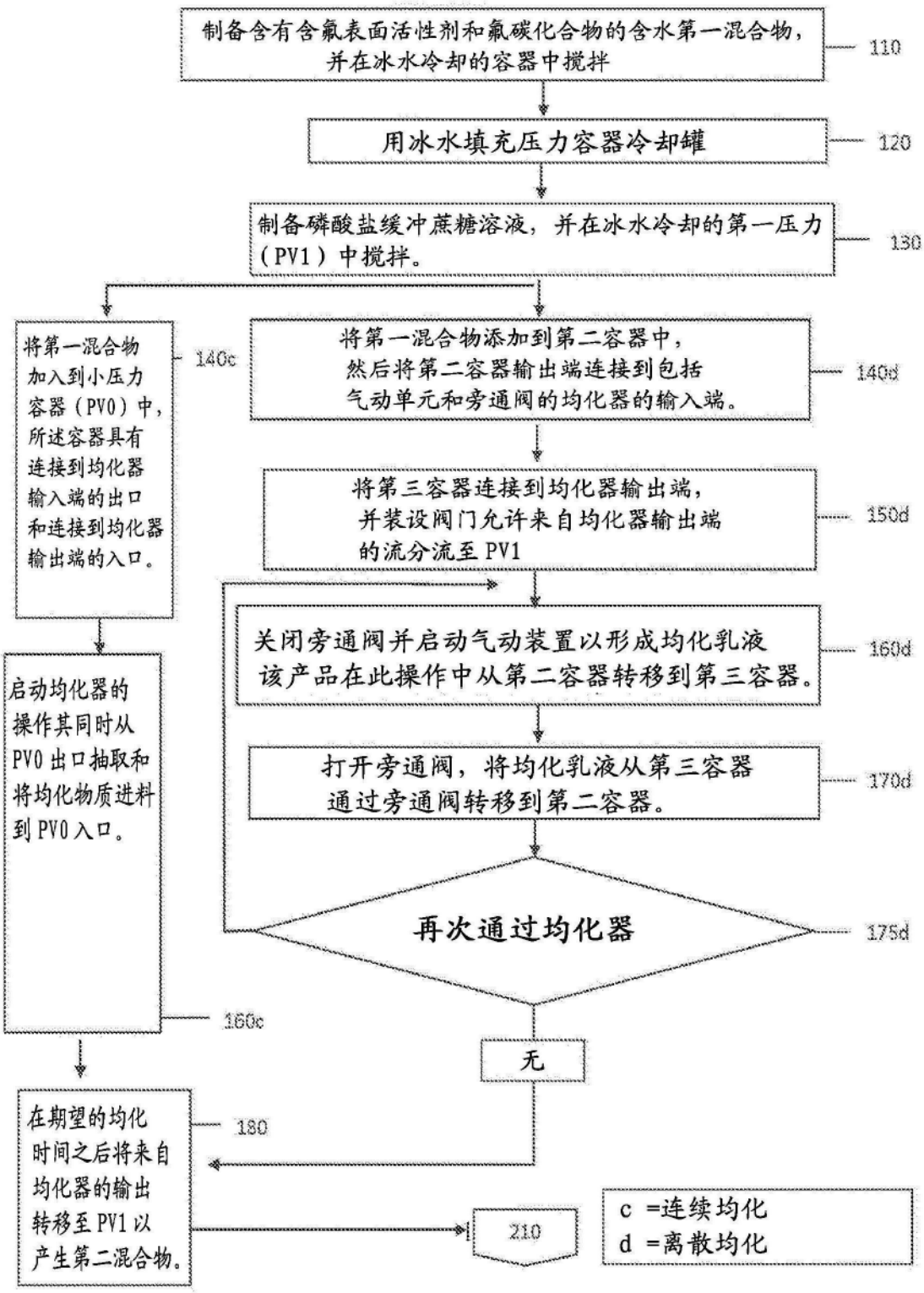

制备含有含氟表面活性剂和氟碳化合物的含水第一混合物，并在冰水冷却的容器中搅拌
110
用冰水填充压力容器冷却罐
120
制备磷酸盐缓冲蔗糖溶液，并在冰水冷却的第一压力（PV1）中搅拌。
130
将第一混合物加入到小压力容器（PV0）中，所述容器具有连接到均化器输入端的出口和连接到均化器输出端的入口。
140c
将第一混合物添加到第二容器中，然后将第二容器输出端连接到包括气动单元和旁通阀的均化器的输入端。
140d
将第三容器连接到均化器输出端，并装设阀门允许来自均化器输出端的流分流至 PV1
150d
关闭旁通阀并启动气动装置以形成均化乳液 该产品在此操作中从第二容器转移到第三容器。
160d
打开旁通阀，将均化乳液从第三容器通过旁通阀转移到第二容器。
170d
再次通过均化器
175d
启动均化器的操作其同时从 PV0 出口抽取和将均化物质进料到 PV0 入口。
160c
无
在期望的均化时间之后将来自均化器的输出转移至 PV1 以产生第二混合物。
180
210
c =连续均化
d =离散均化

图1

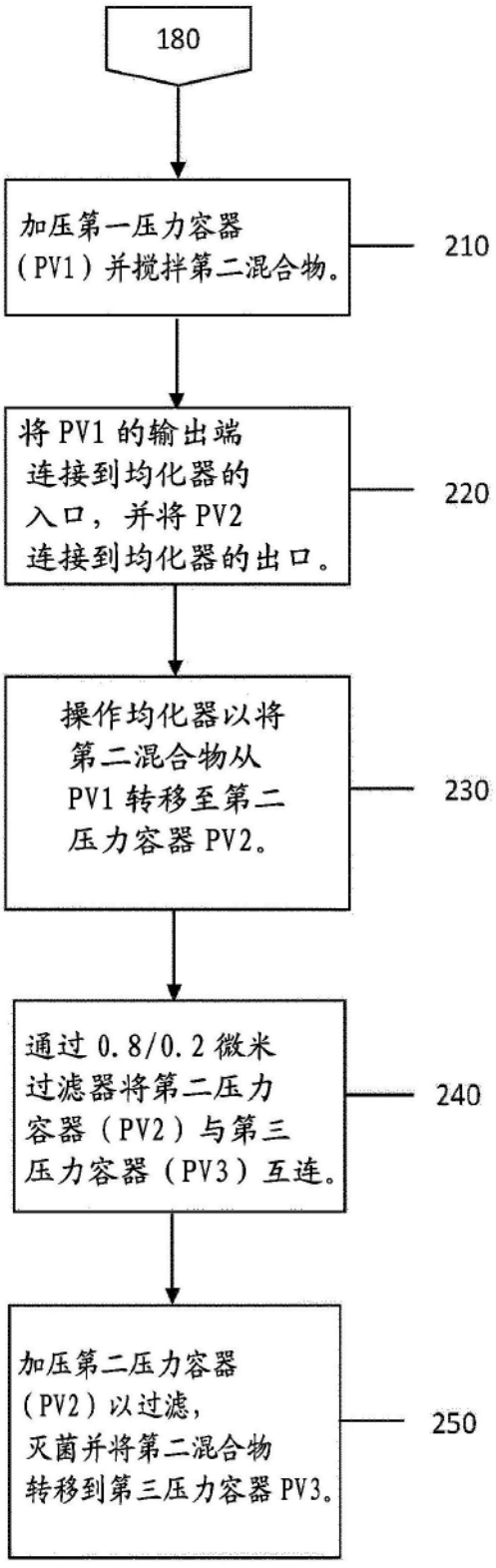

180
加压第一压力容器（PV1）并搅拌第二混合物。
210
将 PV1 的输出端连接到均化器的入口，并将 PV2 连接到均化器的出口。
220
操作均化器以将第二混合物从 PV1 转移至第二压力容器 PV2。
230
通过 0.8/0.2 微米过滤器将第二压力容器（PV2）与第三压力容器（PV3）互连。
240
加压第二压力容器（PV2）以过滤，灭菌并将第二混合物转移到第三压力容器 PV3。
250

图2

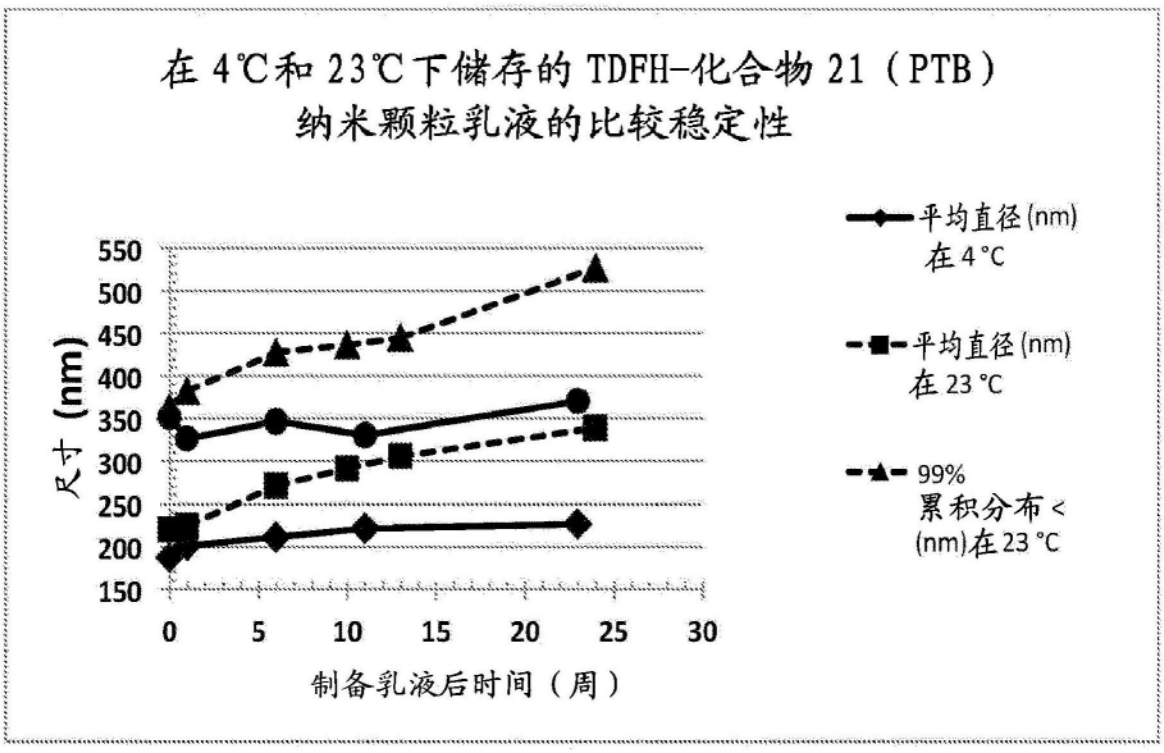

在4℃和23℃下储存的TDFH-化合物21（PTB）
纳米颗粒乳液的比较稳定性
尺寸（nm）
550
500
450
400
350
300
250
200
150
0
5
10
15
20
25
30
制备乳液后时间（周）
平均直径(nm)
在4℃
平均直径(nm)
在23℃
99%
累积分布<
(nm)在23℃

图3

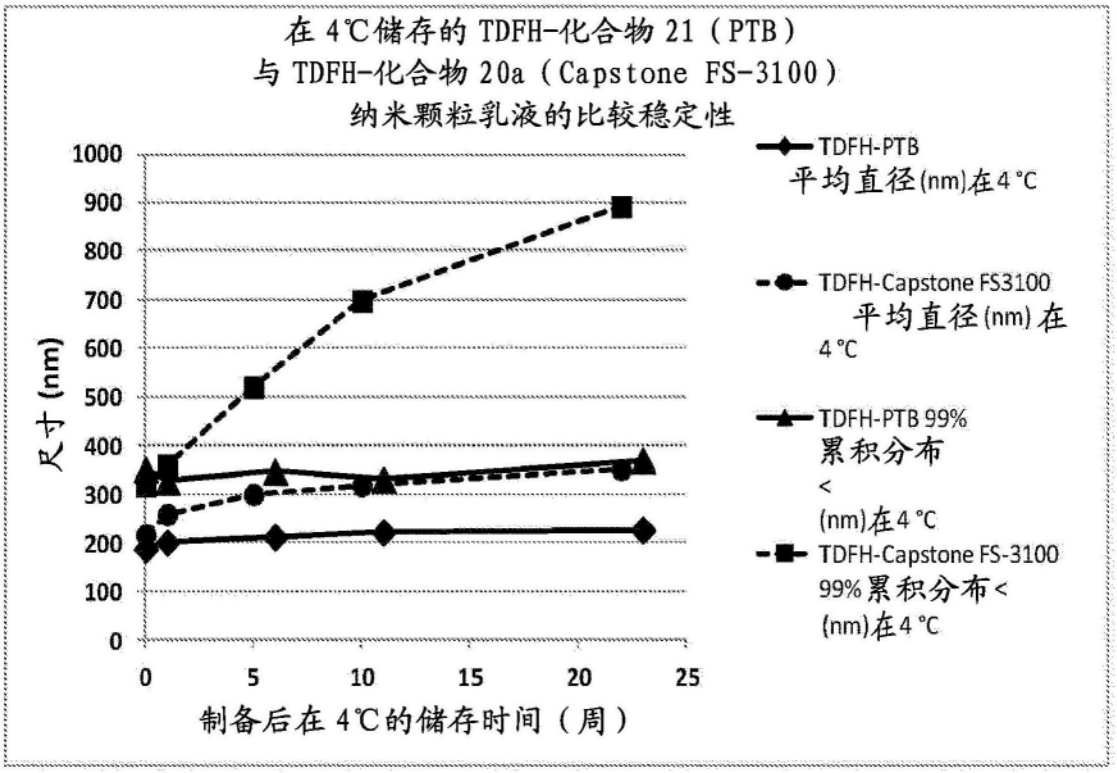

在4℃储存的TDFH-化合物21（PTB）
与TDFH-化合物20a（Capstone FS-3100）
纳米颗粒乳液的比较稳定性
尺寸（nm）
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
5
10
15
20
25
制备后在4℃的储存时间（周）
TDFH-PTB
平均直径(nm)在4℃
TDFH-Capstone FS3100
平均直径(nm)在
4℃
TDFH-PTB 99%
累积分布
<
(nm)在4℃
TDFH-Capstone FS-3100
99%累积分布<
(nm)在4℃

图4

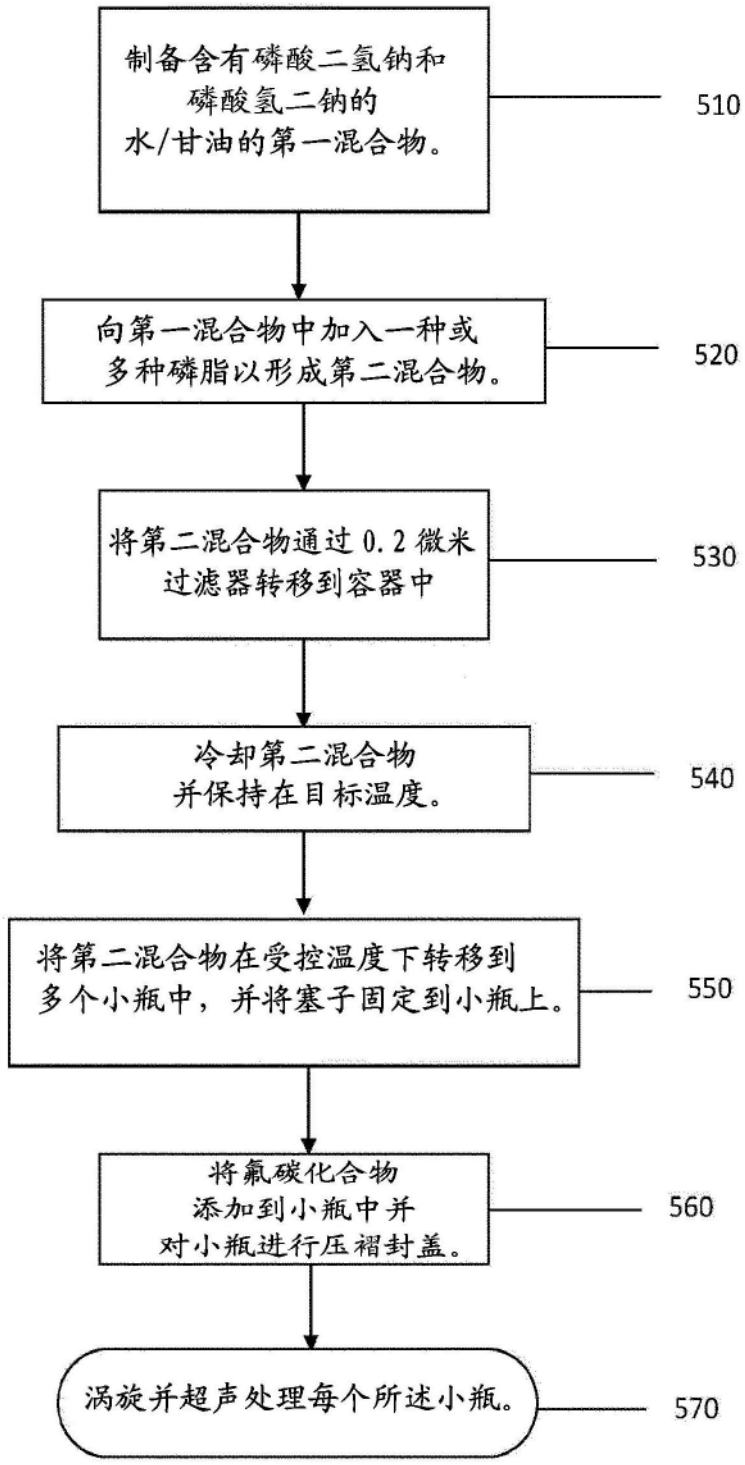

制备含有磷酸二氢钠和磷酸氢二钠的水/甘油的第一混合物。
510
向第一混合物中加入一种或多种磷脂以形成第二混合物。
520
将第二混合物通过0.2微米过滤器转移到容器中
530
冷却第二混合物并保持在目标温度。
540
将第二混合物在受控温度下转移到多个小瓶中，并将塞子固定到小瓶上。
550
将氟碳化合物添加到小瓶中并对小瓶进行压褶封盖。
560
涡旋并超声处理每个所述小瓶。
570

图5

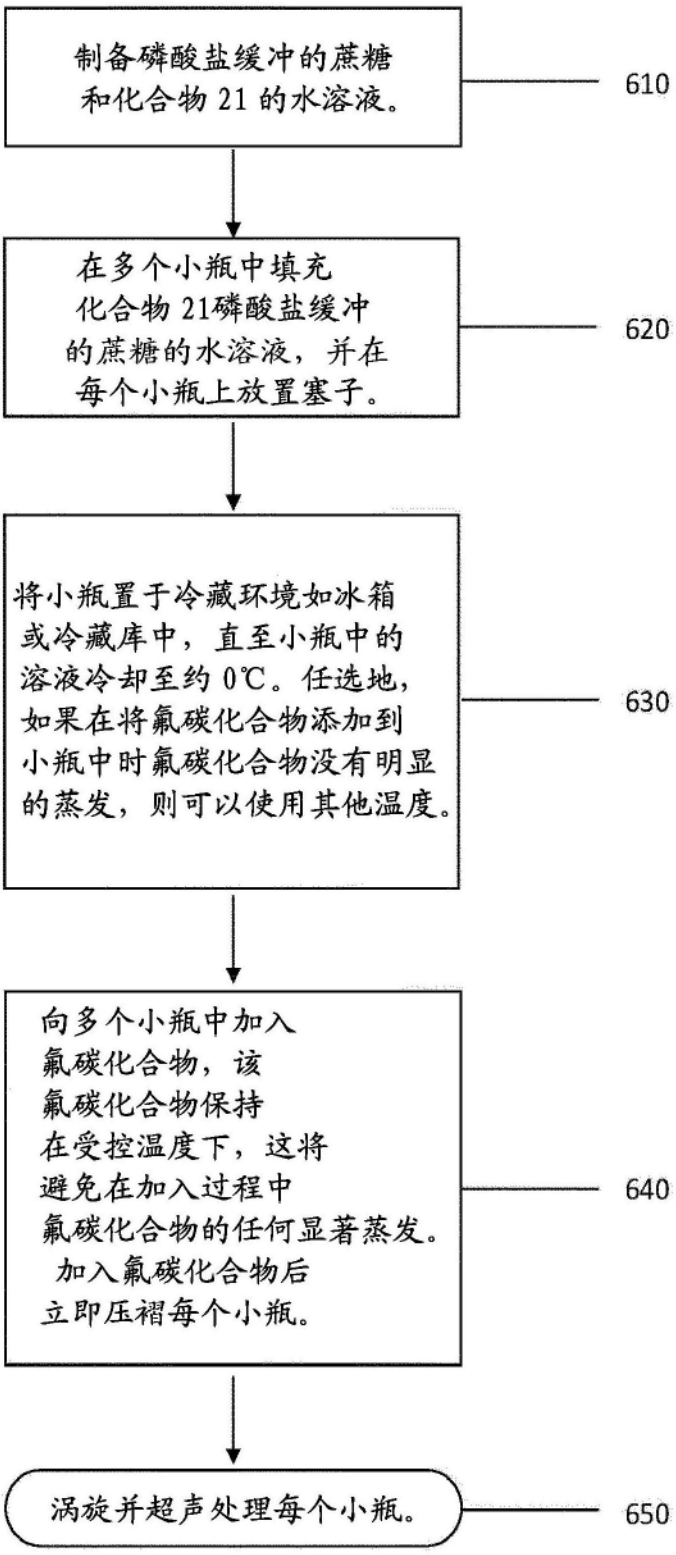

制备磷酸盐缓冲的蔗糖和化合物 21 的水溶液。
610
在多个小瓶中填充化合物 21磷酸盐缓冲的蔗糖的水溶液，并在每个小瓶上放置塞子。
620
将小瓶置于冷藏环境如冰箱或冷藏库中，直至小瓶中的溶液冷却至约 0℃。任选地，如果在将氟碳化合物添加到小瓶中时氟碳化合物没有明显的蒸发，则可以使用其他温度。
630
向多个小瓶中加入氟碳化合物，该氟碳化合物保持在受控温度下，这将避免在加入过程中氟碳化合物的任何显著蒸发。加入氟碳化合物后立即压褶每个小瓶。
640
涡旋并超声处理每个小瓶。
650

图6

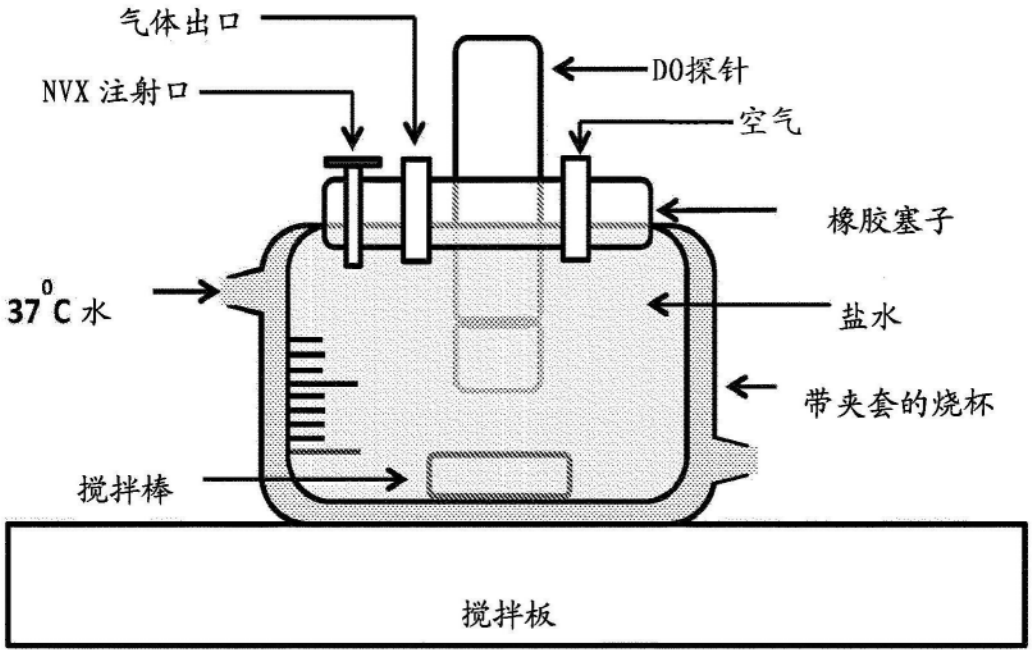


图7

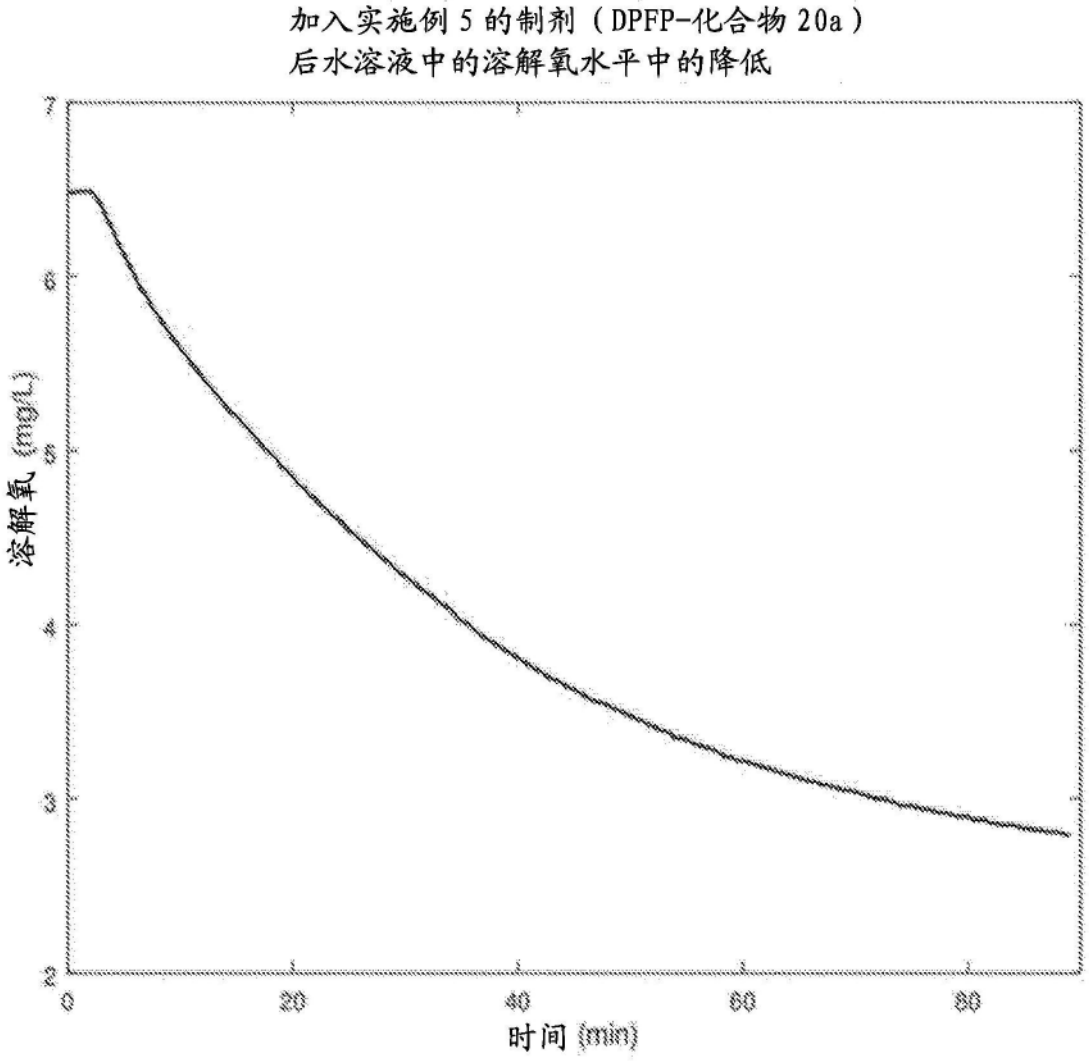

加入实施例 5 的制剂（DPFP-化合物 20a）
后水溶液中的溶解氧水平中的降低
溶解氧 (mg/L)
时间 (min)
0
20
40
60
80

图8

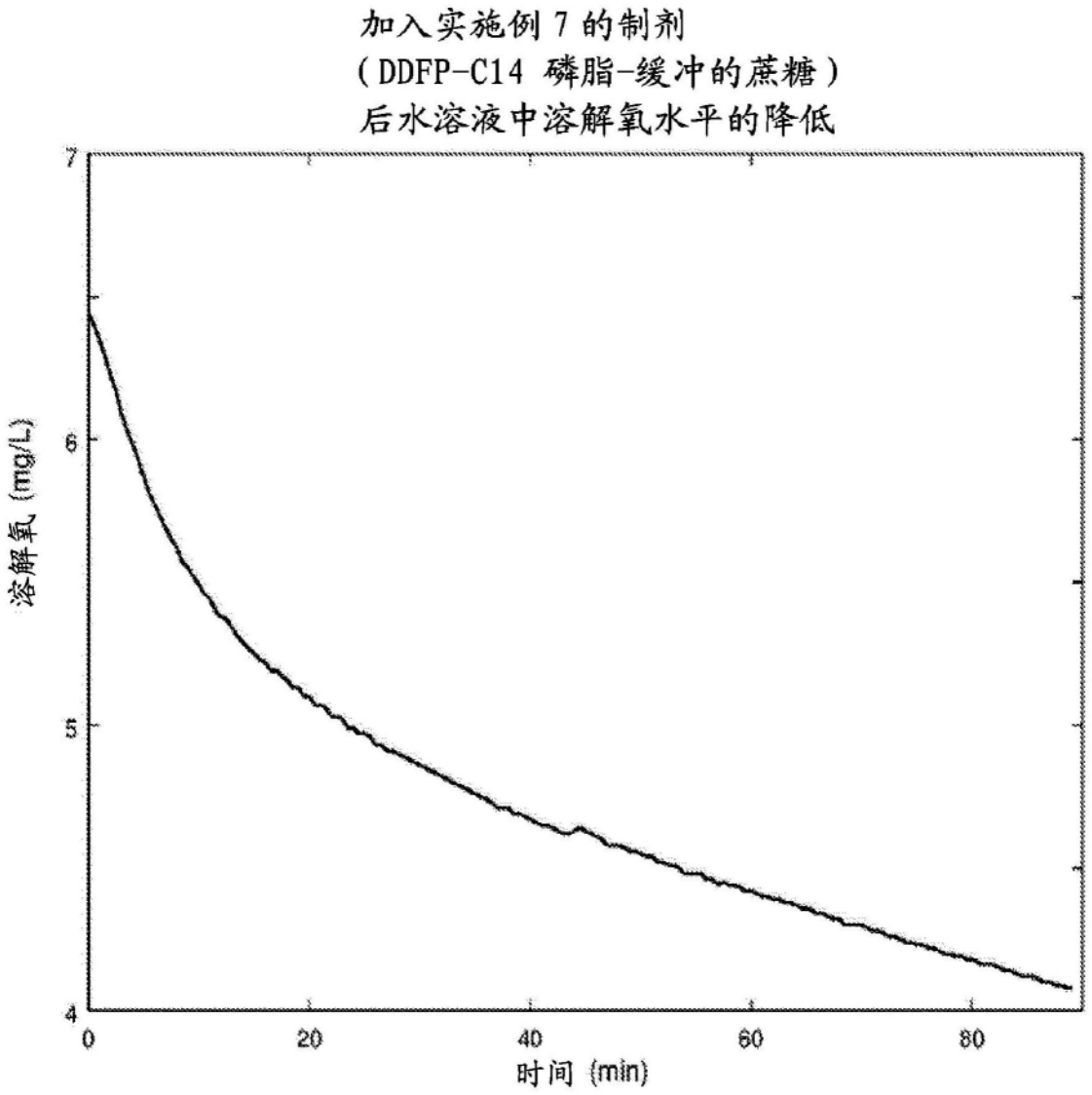

加入实施例 7 的制剂
(DDFP-C14 磷脂-缓冲的蔗糖)
后水溶液中溶解氧水平的降低
溶解氧 (mg/L)
时间 (min)
0
20
40
60
80

图9

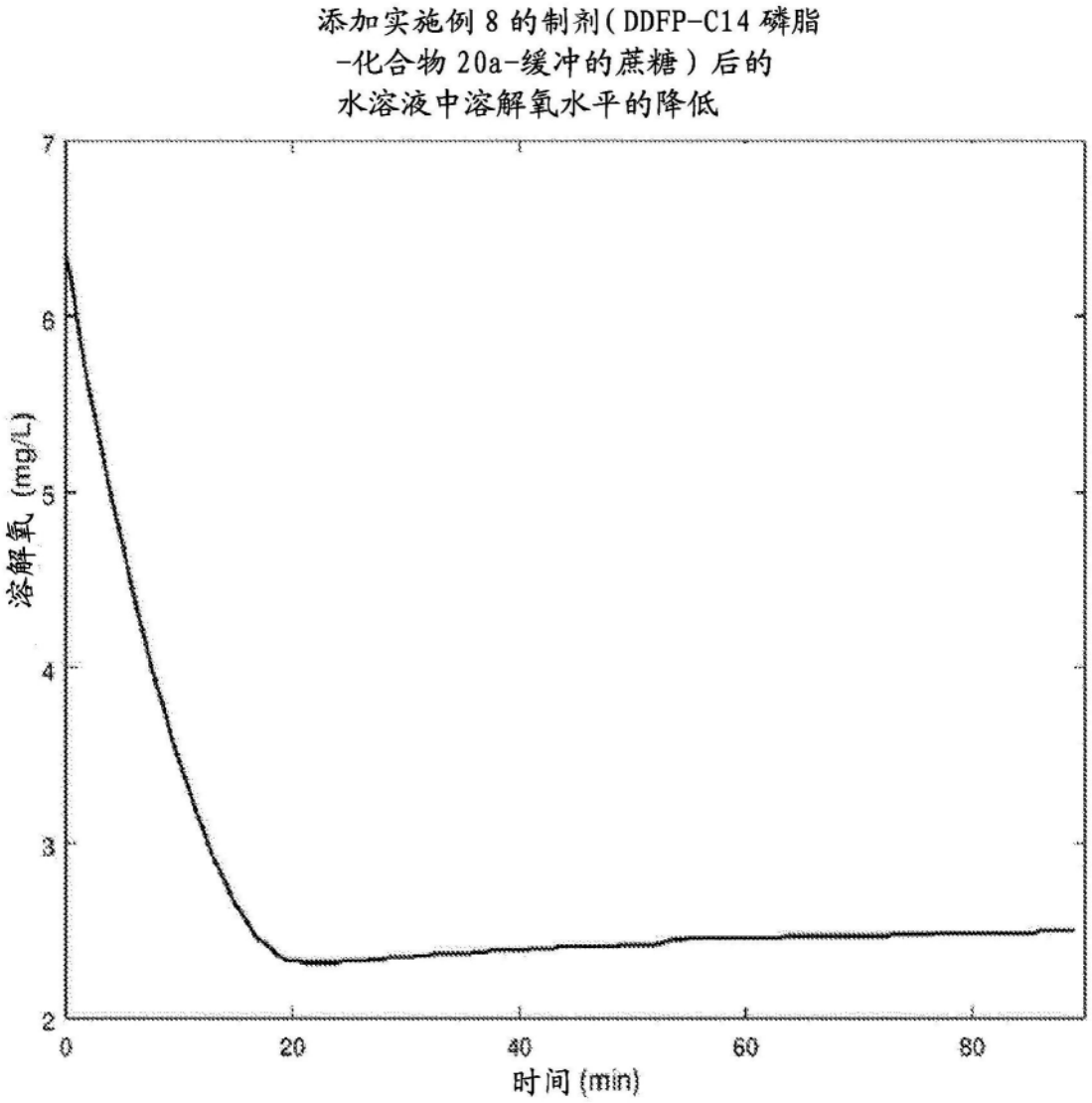

添加实施例 8 的制剂(DDFP-C14 磷脂
-化合物 20a-缓冲的蔗糖)后的
水溶液中溶解氧水平的降低
溶解氧 (mg/L)
时间 (min)
7
6
5
4
3
2
0
20
40
60
80

图10