



(12) **PATENTSKRIFT**

Patentdirektoratet
TAASTRUP

- (51) Int.Cl⁸: **A 61 K 31/02**
- (21) Patentansøgning nr: **PA 1990 02585**
- (22) Indleveringsdag: **1990-10-26**
- (24) Løbedag: **1989-04-10**
- (41) Alm. tilgængelig: **1990-10-29**
- (45) Patentets meddelelse bkg. den: **1999-10-25**
- (86) International ansøgning nr: **PCT/US89/01388**
- (86) International indleveringsdag: **1989-04-10**
- (85) Videreførelsesdag: **1989-04-10**
- (30) Prioritet: **1988-04-29 US 187854**
- (73) Patenthaver: **HemaGen/PFC, Four Embarcadero Center, Suite 3320, San Francisco, CA 94111, USA**
- (72) Opfinder: **Robert J. Kaufman, 8129 Stanford Avenue, University City, MO 63130, USA**
Thomas J. Richard, 8607 Rowland, University City, MO 63132, USA
- (74) Fuldmægtig: **Budde, Schou & Ostenfeld A/S, Bredgade 41, 1011 København K, Danmark**
-

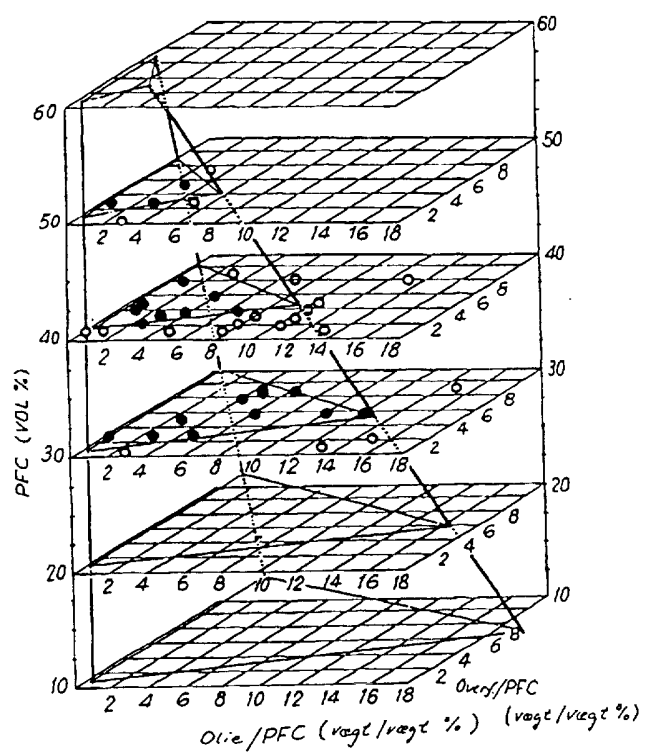
(54) Benævnelse: **Forbedrede emulsioner af stærkt fluorerede organiske forbindelser**

(56) Fremdragne publikationer:
EP A 231091

(57) Sammendrag:

Forbedrede emulsioner af stærkt fluorerede organiske forbindelser beskrives. Emulsionerne omfatter en stærkt fluoreret organisk forbindelse, en olie, der ikke er væsentligt overfladeaktiv og ikke er væsentligt vandopløselig, samt et overfladeaktivt middel. Emulsionerne er karakteriseret ved et veldefineret forhold mellem de relative mængder af de tre komponenter.

FIG. 1



Den foreliggende opfindelse angår forbedrede emulsioner af stærkt fluorerede organiske forbindelser samt fremgangsmåder til fremstilling og anvendelse deraf. Mere specielt angår opfindelsen fluorcarbonholdige emulsioner med en acceptabel partikelstørrelsesfordeling både efter sterilisation og i nærvær af serum, hvilke emulsioner er sikre ved høje doseringer og totaludskiftninger og udviser god lagerstabilitet ved stuetemperatur. Disse emulsioner omfatter en stærkt fluoreret organisk forbindelse, en olie, der ikke er væsentligt overfladeaktiv og ikke væsentligt opløselig i vand, samt et overfladeaktivt middel. Emulsionerne er karakteriseret ved et veldefineret forhold mellem de relative mængder af disse tre komponenter. Sådanne emulsioner er specielt anvendelige i præparater til anvendelse som oxygentransportmidler, "kunstigt blod" eller erstatning for røde blodlegemer, ved behandling af hjerteanfald, slagtilfælde og andre vaskulære obstruktioner, som adjuvanter ved koronar ballonangioplasti og ved stråle- og kemoterapeutisk behandling af cancer samt som kontrastmidler ved biologisk afbildning.

Det er velkendt, at stærkt fluorerede organiske forbindelser såsom perfluorcarbonforbindelser ("PFC") er kemisk og farmaceutisk inerte. De er også i stand til at opløse, transportere og levere oxygen i biologisk og kemisk betydningsfulde mængder. Disse egenskaber gør dem potentielt anvendelige som oxygentransportmidler, som "kunstigt blod" eller som erstatning for røde blodlegemer, ved behandling af hjerteanfald, slagtilfælde og andre vaskulære obstruktioner, som adjuvanter ved koronar angioplasti, ved stråle- og kemoterapeutisk behandling af cancer og som kontrastmidler ved forskellige biologiske afbildningsmodaliteter såsom kernemagnetisk resonans, ultralyd, røntgen og positronemissionstomografi.

Rene fluorcarbonvæsker kan imidlertid ikke injiceres i blodstrømmen, da deres hydrofobe beskaffenhed gør dem ublandbare med blodet. Som resultat heraf kan de forårsage vaskulær obstruktion og føre til døden, når de transporteres til små blodkar. Til medicinske anvendelser, der kræver intravaskulær injektion, skal sådanne stærkt fluorerede organiske molekyler derfor dispergeres som fysiologisk acceptable, vandige emulsioner. Se fx. L.C. Clark, Jr. et al., "Emulsions of Perfluorinated Solvents for Intravascular Gas Transport", Fed. Proc., 34(6), pp. 1468-77 (1975), K. Yokoyama et al., "A Perfluorochemical Emulsion as an Oxygen Carrier", Artif. Organs (Cleve), 8(1), pp. 34-40 (1984), og US patentskrifterne 4.110.474 og 4.187.252.

Den medicinske anvendelighed af sådanne emulsioner af stærkt fluorerede organiske forbindelser som "kunstigt blod", som erstatning for røde blodlegemer, som oxygentransportmidler eller som kontrastmidler ved biologisk afbildning har hidtil ikke været så fremgangsrig som håbet.

- 5 Dette skyldes, at ingen af de kendte fluorcarbonholdige emulsioner opfylder alle krav til et foretrukket "kunstigt blod" eller oxygentransportmiddel.

Disse krav omfatter:

- 10 (1) Partikelstørrelsesfordeling (PSD) efter sterilisation under 400 nm

- Et kritisk parameter for stabilitet og sikkerhed er emulsionens PSD. En omfattende litteratur på området viser, at en PSD >400 nm resulterer i for stor toxicitet, da det mikrocirkulatoriske system frafiltre-
15 rer store partikler, hvilket fører til en tilstopning af den mikrocirkulatoriske vaskulatur og i sidste ende til almen iskæmia. Partikelstørrelsen vil også påvirke den hastighed, hvormed emulsionen fjernes fra
20 kredsløbssystemet, og emulsioner, der ikke forbliver i kredsløbssystemet, vil ikke være effektive som bloderstatninger. Da en afsluttende varmesterilisation af disse emulsioner er nødvendig for at eliminere muligheden for sepsis før anvendelse, er emulsioner, der udviser en PSD >400 nm (efter sterilisation), således ikke acceptable.

25

- (2) Serumstabilitet karakteriseret ved en PSD ≤ 400 nm efter fem dage i serum eller ionopløsninger

30

- Af stor betydning for en given emulsionsformulering er stabilitet over for serummiljøet. En mangel på serum- eller ionstabilitet resulterer i partikler, der vokser in vivo, hvilket resulterer i emboli, der kan tilstoppe mikrovaskulaturen og føre til paralyse og død. Udover
35 den katastrofale vækst, der fører til døden, resulterer moderat in vivo partikelvækst i en hurtigere fjernelse fra kredsløbssystemet og således i en reduceret effektivitet som erstatning for røde blodlegemer eller som oxygentransportmiddel. Emulsioner, der udviser en PSD >400 nm (efter

5 dage i serum eller ionopløsninger), er derfor ikke acceptable.

(3) Overlevelse ved høje doser

5

En væsentlig begrænsning for en emulsions anvendelighed er LD_{50} -værdien eller den maksimale sikre dosis. Forskellige myndigheder begrænser anvendelsesniveauet for en emulsion på grundlag af en eller anden brøkdel af LD_{50} -værdien. Emulsioner, der har en højere maksimalt tilladelig dosis og således kan anvendes i højere, mere effektive doseringer og inden for et større klinisk anvendelsesområde, vil i højere grad blive accepteret af lægevidenskaben. En acceptabel emulsion bør have en LD_{50} -værdi i rotter på mindst 16 ml/kg perfluorcarbonkomponent - emulsionens aktive ingrediens.

15

(4) Overlevelse ved totaludskiftninger

Totaludskiftningstransfusioner udgør den strengeste test af emulsionens sikkerhed og effektivitet. Ved en totaludskiftning reduceres dyrets hæmatokrit til 3% eller mindre, et niveau, der uden indgriben ville være fatalt. Samtidig infuseres den pågældende emulsion isovoluminøst. Derefter kontrolleres dyrets fysiologiske funktioner, overlevelse, almen tilstand og sundhed samt den intravaskulære persistens. Emulsioner, der fører til et højt overlevelsensniveau, antages at udvise stor sikkerhed og effektivitet. En acceptabel emulsion bør have en overlevelseshastighed på mindst 70% ved totaludskiftninger i rotter.

25

(5) Lagerstabilitet

30

Et væsentligt kriterium for den kommercielle anvendelighed af en emulsion er dens lagerstabilitet. Emulsioner, der ikke kan opbevares i flere måneder enten ved 4°C eller mere foretrukket ved 25°C, vil ikke være anvendelige inden for området. Deres lagerstabilitet vil være for kort med hensyn til tidsforskellen mellem fremstillingen og karantæne, forsendelse og anvendelse.

35

Udover disse krav skal fluorcarbonholdige emulsioner, der skal an-

vendes som "kunstigt blod" eller som "erstatning for røde blodlegemer", tilføre tilstrækkeligt oxygen til kroppens væv.

- Som det er velkendt, transporteres blodets oxygen normalt af hæmoglobin, et stærkt specialiseret protein, der optager oxygen i lungerne og afgiver oxygen i kroppens væv. Når atmosfærisk oxygen, der har et oxygenpartialtryk (pO_2) på ca. 150 mm Hg, indåndes og er til stede i lungernes alveoler, er det arterielle blod- pO_2 ca. 100 mm Hg (p.g.a. vanddampen, der mætter luften i de pulmonære alveoler, det bronkiale kredsløb og andre kilder for arteriel-venøs shuntning gennem lungerne).
- 10 Ved dette relativt lave pO_2 er alle oxygenbærersteder på hæmoglobinet næsten fuldstændigt mættede (97%). Når oxygenet, der er opløst i det arterielle blodplasma, er i ligevægt med hæmoglobinet i fuldblodet, vil 100 ml af dette blod således bære ca. 20 ml oxygen (20 volumenprocent).

- Når dette oxygenbærende blod bevæger sig ind i kapillærerne, hvor 15 det afgiver sit oxygen til vævene, kommer det i dynamisk oxygenligevægt med det oxygen, der er til stede i det perivaskulære interstitielle fluidum, der i gennemsnit har et pO_2 på 40 mm Hg. Denne forskel i pO_2 -niveau mellem den arterielle og den venøse side af kredsløbet tillader en forsyning af vævene med deres normale behov på ca. 5 ml oxygen pr. 100 20 ml fuldblod (5 volumenprocent).

- I modsætning til hæmoglobin, der faktisk binder og derefter frigiver oxygen, opløser emulsioner af stærkt fluorerede organiske forbindelser blot oxygen. Mængden af oxygen, der tilføres af en fluorforbindelseholdig emulsion, afhænger således af forskellen mellem det arterielle 25 pO_2 og det venøse pO_2 , opløseligheden af oxygen i fluorcarbonet og procentdelen (volumen) af fluorcarbon i emulsionen.

$$\begin{aligned} \text{Tilførsel af } O_2 &= ((\text{arterielt } pO_2 - \text{venøst } pO_2)/760) \\ \text{(volumenprocent)} &\quad \times (\text{opløselighed af } O_2 \text{ i fluorforbindelsen}) \\ 30 &\quad \times \text{procentdelen (volumen) af fluorforbindelsen} \\ &\quad \text{i emulsionen).} \end{aligned}$$

- Til anvendelse som "kunstigt blod" eller erstatning for røde blodlegemer bør en fluorforbindelseholdig emulsion tilføre mindst lige så 35 meget oxygen som fuldblod - 5 volumenprocent. I den 100% O_2 indåndingsblanding, der anvendes i op til 12 timer i situationer, der kræver intensiv pleje, bør en sådan emulsion således indeholde mindst ca. 20 volumenprocent fluorforbindelse. For eksempel (under anvendelse af den

ovenfor anførte ligning):

ønsket O_2 -tilførsel = 5 volumenprocent

5 arterielt $pO_2 = 600 \text{ mm Hg (100\% } O_2)$ *

venøst $pO_2 = 40 \text{ mm Hg}$

10 opløselighed af O_2 i fluorforbindelse = 33
volumenprocent**

krævet volumenprocent af fluorcarbon = x

15 * Det omtrentlige, konventionelt anslåede arterielle pO_2 af en rask
20-årig ved 100% O_2 .

** Ved 37°C har de fleste perfluorcarbonholdige forbindelser lignende
Bunsen-oxygenopløselighedskoefficienter. De er i området mellem ca.
0,32 og 0,35, dvs. at opløseligheden af O_2 deri er mellem ca. 32 og
35 (volumen)procent.

20

$$x = \frac{0,05}{\frac{(600-40)}{760} (0,33)} = 20,5\%$$

25

I indåndingsblandingen med 40 til 80% O_2 , der tolereres i mere end
12 timer under hospitalsbetingelser, bør sådanne emulsioner indeholde
fra ca. 25 til ca. 60 volumenprocent fluorcarbon, og mest foretrukket
fra 30 til 55 volumenprocent.

30 Det fremgår klart af det foregående, at uden relativt højt PFC-ind-
hold vil perfluorcarbonemulsioner ikke være i stand til at tilføre de
oxygenmængder, der er tilgængelige fra fuldblod. Udover oxygenforsy-
ningsmanglerne ved PFC-emulsioner med lav volumenprocent er to yderlige-
re faktorer kritiske for den medicinske anvendelse af perfluorcarbon-
35 emulsioner. Den første er behovet for en høj oxygentilførsel pr. volu-
menenhed administreret fluidum. Der er en grænse for hvilket fluidumvo-
lumen, der kan administreres til en patient, især hvis hjertet eller ny-
rerne formodes at være angrebet. Den anden yderligere mangel ved PFC-

emulsioner med lav volumenprocent er, at det ved højvolumen-transfusioner sædvanligvis er nødvendigt at blande den ved infusion administrerede emulsion med andre opløsninger, der er nødvendige til imødekomme af patientens ioniske og oncotiske behov. En fortynding af lav-% PFC-emulsioner med "støtte"-opløsninger indeholdende salte og egnede plasmaexpansionsmidler fører til en "fortynding" af den allerede lave oxygentilførselsevne af disse formuleringer.

En illustration af manglerne ved kendte fluorcarbonholdige emulsioner er "Fluosol DA 20%", den eneste fluorcarbonemulsion, der er nået til klinisk testning som "kunstigt blod". Den er en ca. 10 volumenprocent emulsion af to fluorcarboner - perfluordecalin og perfluortripropylamin - i en blanding af to overfladeaktive midler - æggeblommephospholipid og "Pluronic F-68". Den er ikke stabil i flydende tilstand og skal opbevares nedfrosset (Yokoyama et al., ovenfor). Desuden eliminerer den påkrævede tilstedeværelse af perfluortripropylaminen i denne emulsion, der skal hjælpe med at "stabilisere" den, faktisk emulsionens medicinske anvendelighed (som kunstigt blod eller oxygentransportmiddel), da perfluortripropylaminens halveringstid i leveren og de andre kropsvæv er længere end ønskelig (se fx. K. Yokoyama et al., ovenfor). Endelig er denne emulsion, da den kun indeholder ca. 10 volumenprocent fluorcarbon, meget mindre terapeutisk effektiv som "kunstigt blod" end ønsket p.g.a sin lave oxygentilførselskapacitet - ca. 2,4% O₂ ved 100% indåndet oxygen (se fx. "Fluosol-DA As A Red Cell Substitute In Acute Anemia", N.E. Jour. Med. 314, pp. 1653-66 (1986)). Dette er væsentligt mindre end de 5 volumenprocent oxygen, der skal tilføres for at opretholde sunde fysiologiske funktioner.

En yderligere illustration af disse mangler er de tre fluorcarbonemulsioner, der omtales i Jeppsson et al., "Particle Size Distribution Of A Fluorochemical Emulsion", i HS Symposium Research on Perfluorochemicals in Medicine and Biology, Huddinge, Sverige, 28. til 29. april 1977, Karolinske Institute Research Center, Proceedings, Novakova et al., ed., pp. 108-113 (1978). Disse emulsioner indeholder ca. 15 volumenprocent fluorcarbon - for lidt til at kunne anvendes som "kunstigt blod" eller "erstatning for røde blodlegemer" - en anvendelse, der i øvrigt ikke engang er blevet foreslået af Jeppsson på noget tidspunkt.

Et forsøg på at løse problemerne ved disse kendte fluorcarbonholdige emulsioner er beskrevet i Shaw-Clark's europæiske patentansøgning nr. 231.091. Emulsionerne ifølge denne ansøgning er kendetegnet ved et højt

fluorcarbonindhold og god stabilitet ved stuetemperatur og efter sterilisation. De omfatter en olie, der ikke er væsentligt overfladeaktiv og ikke er væsentligt opløselig i vand, et overfladeaktivt middel og en stærkt fluoreret organisk forbindelse. Selv om de udgør en betydelig forbedring i forhold til tidligere emulsioner, omfatter emulsioner af Shaw-Clark typen nogle emulsioner, som ikke opfylder alle de ovenfor beskrevne yderligere krav til emulsioner, der foretrækkes til anvendelse som "kunstigt blod", oxygentransportmidler eller kontrastmidler ved biologisk afbildning.

10 Jeppsson (ovenfor) omtaler også olie, overfladeaktivt middel og fluorcarbonholdige emulsioner. Se fx. Jeppsson, ovenfor, og de europæiske patentansøgninger nr. 220.152 og nr. 220.153. Jeppsson antyder ikke, at disse emulsioner muliggør den foretrukne højere koncentration af perfluorcarboner, der kræves til "kunstigt blod", oxygentransportmidler eller kontrastmidler til biologisk afbildning. Jeppsson antyder heller ikke, at hans emulsioner opfylder de andre krav, der stilles til foretrukne emulsioner til anvendelse i disse ansøgninger. I realiteten omfatter Jeppsson's emulsioner mange emulsioner, der ikke opfylder alle de andre krav, der stilles til de ovenfor beskrevne foretrukne emulsioner.

20 Den foreliggende opfindelsen løser de ovenfor anførte problemer. Den tilvejebringer for første gang emulsioner af stærkt fluorerede organiske forbindelser, som opfylder alle krav, der stilles til de ovenfor beskrevne foretrukne emulsioner.

Emulsionerne ifølge opfindelsen er ejendommelige ved (1) en partikelstørrelsesfordeling efter sterilisation på mindre end 400 nm og fortrinsvis på mindre end 300 nm, (2) en serumstabilitet karakteriseret ved en partikelstørrelsesfordeling på mindre end 400 nm og fortrinsvis på mindre end 300 nm efter fem dage i serum eller ionopløsninger, (3) en LD₅₀-værdi i rotter på mindst 16 ml/kg fluorcarbonkomponent i emulsionen, (4) en overlevelsesrate på mindst 70% ved totaludskiftning i rotter, og (5) en lagerstabilitet på mindst flere måneder ved 4°C og fortrinsvis ved 25°C.

De forbedrede emulsioner ifølge opfindelsen omfatter mindst én stærkt fluoreret organisk forbindelse, en olie, der ikke er væsentligt overfladeaktiv og ikke er væsentligt opløselig i vand, samt et overfladeaktivt middel. Af større betydning er, at emulsionerne ifølge opfindelsen er karakteriserede ved specifikke og definerede forhold mellem de tre komponenters relative mængder. Fluorcarbonkomponenten er til stede i

emulsionen i en mængde fra 20 til 60 volumenprocent. Mængderne af overfladeaktivt middel og olie afhænger af fluorcarbonvolumenprocenten og er defineret ved det i fig. 1 viste volumen og ved overfladerne, der definerer dette volumen.

- 5 Opfindelsen omfatter også fremgangsmåder og præparater, hvori disse forbedrede emulsioner anvendes som oxygentransportmidler, "kunstigt blod" eller erstatning for røde blodlegemer og som kontrastmidler ved biologisk afbildning, samt i andre kendte medicinske præparater og anvendelser.

- 10 I det følgende belyses opfindelsen nærmere under henvisning til tegningen.

Fig. 1 er et tredimensionalt diagram - vægt/vægt-% olie/fluorcarbon, vægt/vægt-% overfladeaktivt middel/fluorcarbon og volumenprocent fluorcarbonholdig forbindelse - over de forbedrede emulsioner ifølge opfindelsen. Det i fig. 1 viste volumen og fladerne, der definerer volumenet, beskriver de forbedrede emulsioner ifølge opfindelsen. De udfyldte cirkler i fig. 1 repræsenterer emulsioner ifølge opfindelsen, som opfylder alle de ovenfor beskrevne krav, der stilles til emulsionerne. De ikke udfyldte cirkler repræsenterer emulsioner, som ikke opfylder et eller flere af disse krav.

Emulsionerne ifølge opfindelsen omfatter mindst én stærkt fluoreret organisk forbindelse, en olie, der ikke er væsentligt overfladeaktiv og ikke er væsentligt opløselig i vand, samt et overfladeaktivt middel.

- Emulsionerne ifølge opfindelsen er stabile ved stuetemperatur i lange tidsrum - mindst flere måneder. De er stabile over for omrøring og over for blanding med forskellige fysiologiske additiver, herunder, men ikke udelukkende, saltvand, Tyrode-opløsning, Ringers laktatopløsning, serum og serumprodukter. De udviser i det væsentlige ingen faseadskillelse og i det væsentlige ingen ændring af partikelstørrelses- eller dråbefordelingen under lagring. Desuden tillader de anvendelse af stærkt fluorerede organiske forbindelser, der udviser acceptabelt hurtige udskillelsetider fra leveren og andre kropsvæv. Desuden tillader de anvendelse af høje fluorcarbonkoncentrationer, hvilket resulterer i emulsioner med den høje oxygentilførselskapacitet, der kræves for anvendelse som terapeutisk effektive bloderstatninger, oxygentransportmidler og kontrastmidler ved biologisk afbildning. På grund af deres stabilitet bevarer de de ovenfor anførte egenskaber selv efter sterilisation i en konventionel laboratorieautoklav ved 121°C i 15 minutter.

Blandt de stærkt fluorerede organiske forbindelser, der kan anvendes i emulsionerne og ved fremgangsmåderne ifølge opfindelsen, er forbindelser, der tidligere er blevet betegnet som anvendelige som oxygen-transportmidler, "kunstigt blod" eller erstatning for røde blodlegemer og som kontrastmidler ved biologisk afbildning. De omfatter perfluorcarboner, fx. perfluordecalin, perfluorindan, perfluortrimethylbicyclo[3.3.1]nonan, perfluormethyladamantan, perfluordimethyladamantan og perfluor-2,2,4,4-tetramethylpentan, perfluoraminer med 9 til 12 carbonatomer, fx. perfluortripropylamin, perfluortributylamin, perfluor-1-azatricycliske aminer, brom- eller iodsustituerede fluorcarboner samt F-4-methyloctahydroquinolidizin og perfluorethere. Sådanne forbindelser er fx. beskrevet i US patentskrifterne nr. 3.962.439, 3.493.581, 4.110.474, 4.186.253, 4.187.252, 4.252.827, 4.423.077, 4.443.480, 4.534.978 og 4.542.147, EP patentansøgningerne nr. 80.716 og 158.996, GB patentskriftet nr. 1.549.038 og DE offentliggørelsesskrift nr. 2.650.586. Det må naturligvis forstås, at blandinger af vilkårlige af disse stærkt fluorerede organiske forbindelser også kan anvendes i emulsionerne og ved fremgangsmåderne ifølge opfindelsen.

Emulsionerne ifølge opfindelsen indeholder et eller flere perfluorcarboner og mere foretrukket et perfluorcarbon udvalgt blandt perfluordecalin, perfluormethyladamantan, perfluordimethyladamantan, perfluorocetyl bromid, perfluor-4-methyloctahydroquinolidizin, perfluor-N-methyldecahydroquinolin, F-methyl-1-oxa-decalin, perfluor-bicyclo[5.3.0]decan, perfluoroctahydroquinolidizin, perfluor-5,6-dihydro-5-decen og perfluor-4,5-dihydro-4-octen. Mest foretrukket er perfluorcarbonet perfluordecalin eller perfluorocetyl bromid. Til anvendelse som kontrastmiddel ved biologisk afbildning er perfluorocetyl bromid den foretrukne stærkt fluorerede organiske forbindelse ifølge opfindelsen.

Mens de stærkt fluorerede organiske forbindelser eller en blanding af sådanne forbindelser kan omfatte fra 20 til 60 volumenprocent af den stærkt fluorerede organiske forbindelse, omfatter foretrukne emulsioner ifølge opfindelsen fra 30 til 55 volumenprocent fluorcarbon. Mest foretrukket indeholder emulsionerne 40 volumenprocent.

Blandt de ikke væsentligt overfladeaktive og ikke væsentligt vandopløselige olier, der kan anvendes i emulsionerne og ved fremgangsmåderne ifølge opfindelsen, er flydende fede olier, carbonhydrider, voksarter såsom monoestere af en fedtsyre og en monohydroxyalkohol, langkædede ethere, diglycerider, siliconeolier og nitriler. Disse omfatter fx. pal-

mitoyloleat, octylnitril, dodecylnitril, sojabønneolie, farvetidseolie, hexadecan, diglycerider med en C_{12-18} carbonkæde og mineralolie. Som det er tilfældet med den fluorholdige komponent, kan disse olier anvendes enkeltvis eller i forskellige kombinationer i emulsionerne og ved fremgangsmåderne ifølge opfindelsen.

Når emulsionerne ifølge opfindelsen skal anvendes medicinsk, skal olien eller kombinationen af olier naturligvis være fysiologisk acceptabel. Når emulsionerne ifølge opfindelsen fx. skal anvendes som "kunstigt blod" eller terapeutisk som oxygentransportmidler eller kontrastmidler, anvendes fortrinsvis fysiologisk acceptable flydende fede olier såsom sojabønne- og farvetidseolie.

Blandt de overfladeaktive midler, der kan anvendes i emulsionerne ifølge opfindelsen, er et hvilket som helst af de kendte anioniske, kationiske, ikke-ioniske og zwitter-ioniske overfladeaktive midler. Disse omfatter fx. anioniske overfladeaktive midler såsom alkyl- eller aryl-sulfater, -sulfonater, -carboxylater eller -phosphater, kationiske overfladeaktive midler såsom mono-, di-, tri- og tetraalkyl eller -arylammoniumsalte, ikke-ioniske overfladeaktive midler såsom alkyl- eller arylforbindelser, hvis hydrofile del består af polyoxyethylenkæder, sukker-20 molekyler, polyalkoholderivater eller andre hydrofile grupper, der kan være kombinationer af de ovenfor anførte anioniske eller kationiske grupper, og hvis hydrofobe del består af en hvilken som helst anden polymer såsom polyisobutylene eller polypropylenoxider. Igen kan kombinationer af disse overfladeaktive midler naturligvis anvendes i emulsionerne ifølge opfindelsen. Derudover kan blandinger af forbindelser, 25 hvoraf én eller flere ikke er overfladeaktive midler, men virker som overfladeaktive midler, når de kombineres, også være nyttige og anvendelige som overfladeaktiv komponent i emulsionerne ifølge opfindelsen.

Igen skal de overfladeaktive midler eller en kombination deraf, når 30 emulsionerne ifølge opfindelsen skal anvendes i "kunstigt blod" eller terapeutisk som oxygentransportmidler eller kontrastmidler, være fysiologisk acceptable. For eksempel foretrækkes til sådanne anvendelser ikke-ioniske eller zwitter-ioniske overfladeaktive midler. De i emulsionerne ifølge opfindelsen anvendte overfladeaktive midler er fortrinsvis 35 ét eller flere blandt følgende: ægge- og sojabønnephosphatider, lecitin og en hvilken som helst af rækken af BASF Wyandotte formuleringer af polyoxyethylenoxider, der forhandles under handelsbetegnelsen "Pluronic", navnlig "Pluronic F-68". Naturligvis kan der anvendes mange andre poly-

ethylenoxid-baserede overfladeaktive midler, men de er typisk ikke så tilgængelige gennem almindelige handelskanaler.

Udover de stærkt fluorerede organiske forbindelser, olier og overfladeaktive midler indeholder emulsionerne ifølge opfindelsen vand og
5 kan også indeholde eller blandes med andre komponenter, der konventionelt anvendes i "kunstigt blod" eller i erstatninger for røde blodlegemer, i oxygentransportmidler eller kontrastmidler til biologisk afbildning. De omfatter isotoniske midler, osmotisk trykregulerende midler, serumstrækkemidler og antioxidanter. For eksempel er det lykkedes at in-
10 korporere glycerol som et tonicitets-justerende middel ved fremstilling af disse emulsioner til opnåelse af opløsninger af fysiologisk acceptable osmolariteter. Den passende mængde til opnåelse af isotonicitet med hensyn til fuldblod vil være åbenlys for fagmanden. Desuden er det blevet vist, at disse emulsioner efter fremstilling og varmesterilisation
15 kan blandes med 0,9% saltvand, Ringers opløsning tilsat laktat, serum og serumprodukter uden skadelig virkning på emulsionens partikelstørrelse og stabilitet. Andre adjuvanter kan også anvendes i emulsionerne ifølge opfindelsen. Blandt disse er oncotiske midler såsom dextran, HES og antioxidanter.

20 Emulsionerne ifølge opfindelsen er karakteriseret ved et veldefineret forhold mellem de relative mængder af fluorcarbon, olie og overfladeaktivt middel komponenterne. Dette specifikke forhold eller denne gensidige afhængighed vises og beskrives bedst ved henvisning til fig. 1.

I fig. 1 er emulsionerne ifølge opfindelsen defineret som et volumen i et tredimensionalt diagram over vægt/vægt-procent olie/fluorcarbon, vægt/vægt-procent overfladeaktivt middel/fluorcarbon og volumenprocent fluorcarbon. Emulsioner, der falder inden for dette volumen, eller på de flader, der definerer det, falder inden for opfindelsens rammer.
25 Modsat er emulsioner, der falder uden for det beskrevne volumen og disse
30 flader, ikke omfattet af opfindelsen.

Ved at anvende fig. 1 kan fagmanden således let udvælge det interval af olier og det interval af overfladeaktive midler, der kan anvendes ved en given volumenprocent fluorcarbon til fremstilling af emulsionerne ifølge opfindelsen. Mere foretrukket vil fagmanden kunne udvælge en bestemt mængde olie og overfladeaktivt middel inden for det definerede område til anvendelse ved fremstilling af en emulsion ifølge opfindelsen.
35

Selvom fig. 1 er baseret på emulsioner fremstillet med perfluordecalin, æggeblommelecitin og farvetidselolie antages det, at andre kombi-

- nationer af fluorcarboner, olier og overfladeaktive midler som beskrevet ovenfor vil udvise en lignende gensidig afhængighed mellem komponenterne. Det bør imidlertid forstås, at let forskellige volumener og flader kan definere det faktiske forhold mellem komponenterne i disse andre
- 5 emulsioner. Det hører klart til fagmæssig kunnen ud fra anvisningerne i nærværende ansøgning at bestemme disse eksakte volumener og flader uden for omfattende eksperimenteren og uden at afvige fra opfindelsens ånd og rammer.

I de mere foretrukne emulsioner ifølge opfindelsen er fluorcarbonet

10 perfluordecalin, det overfladeaktive middel er æggeblommelecitin og olien er farvetidselolie. I de mest foretrukne emulsioner ifølge opfindelsen er perfluordecalin til stede med ca. 40 volumenprocent, lecitinen er til stede med ca. 2,3 vægt/vægt-% lecitin/PFD og farvetidselolien er til stede med ca. 2,6 vægt/vægt-% olie/PFD.

- 15 Emulsionerne ifølge opfindelsen kan fremstilles under anvendelse af en hvilken som helst rækkefølge for blanding af de tre komponenter og vand. Det er imidlertid foretrukket at blande olien først med en vandig dispersion af det overfladeaktive middel. Dernæst fremstilles den endelige emulsion ved tilsætning af fluorcarbonet.

- 20 Blanding og emulgering af komponenterne i emulsionen ifølge opfindelsen kan udføres med en hvilken som helst af de kommercielt anvendte mekaniske homogenisatorer og kræver ikke anvendelse af avanceret udstyr såsom ultrasoniske homogenisatorer, selvom sådanne indretninger kan anvendes til fremstilling i laboratoriemålestok. Det er foretrukket at an-
- 25 vende en inert atmosfære for at forebygge nedbrydning af det overfladeaktive middel og fede olier, og at anvende temperaturer fortrinsvis mellem ca. 45 og 55°C til formindskelse af viskositeten af det materiale, der emulgeres.

- De følgende eksempler skal kun tjene til belysning og ikke til begrænsning af opfindelsen.
- 30

Eksempler

Fremgangsmåder

35

Fremstilling af vandig lecitindispersion

Pulveriseret, raffineret æggeblommelecitin opnåedes fra Kabi Vitrum og dispergeredes i sterilt H₂O under en inert atmosfære (N₂) under an-

vendelse af en Waring™ Blender ved høj hastighed i 2 minutter. Det blandede materiale overførtes til et reservoir, igen under inert atmosfære, der forsynede en Microfluidizer™ Model 110 homogenisator. Materialet cirkuleredes gennem homogenisatoren i ialt 5 minutter med en strømningshastighed på 350 ml/minut under anvendelse af et lufttryk på 4,22 kg/cm² til at drive pumpens stempel, hvilket svarer til 562-633 kg/cm² ved homogenisatorventilen. Temperaturen holdtes hele tiden under 25°C. På denne måde fremstilledes portioner på ca. 750 g med koncentrationer i området fra 10 til 27%. Den således dispergerede lecitin opsamledes under en inert atmosfære og opbevarede ved 4°C. Alle således fremstillede lecitindispersioner anvendtes inden for en uge efter deres fremstilling.

Fremstilling af emulsion

Emulgatorreservoiret fyldtes først med den passende mængde sterilt vand, glycerol og den ovenfor beskrevne lecitindispersion. Dernæst startedes emulgatoren, og olien tilsattes gennem en sprøjtepumpe med en strømningshastighed fra 10 til 30 ml/minut direkte ind i homogenisatorens indgangsåbning. Dernæst tilsattes perfluorcarbonet med samme strømningshastighed gennem en sprøjtepumpe gennem samme åbning. Temperaturen holdtes hele tiden ved 45-48°C, og pH-værdien holdtes ved 7,5-8,5 ved kontrolleret tilsætning af 0,29 M NaHCO₃ eller en anden base. For en 250 ml portion cirkuleredes materialet gennem homogenisatoren med en strømningshastighed på 300-350 ml/minut i 10 minutter. Proportionalt længere middeleopholdstider anvendtes for større portioner (fx. anvendtes en opholdstid på 20 minutter for en portion på 500 ml).

Analyse

Analyse af partikelstørrelsesfordeling (PSD)

Prøver analyseredes iht. publicerede fremgangsmådebeskrivelser på en Brockhaven BI-90 Particle Sizer. Alle prøver fremstilledes i isotonisk glycerolopløsning umiddelbart før analyse.

Serumstabilitet (PSD)

Prøver fortyndedes 1:1 med en 4:1 blanding af Ringers opløsning tilsat laktat og 25% humant serumalbumin (HSA), forpufret til pH 7,2 med en fosfatpuffer. Prøver inkuberedes ved 37°C i 120 timer før analyse af partikelstørrelsesfordelingen.

Totaludskiftning

Rotter, der var blevet forsynet med dobbelte kanyler (halsvene/-halsarterie), underkastedes isovolumetrisk udskiftning iht. Goodin et al., "A Method For Evaluation Of Blood Substitutes In The Conscious Animal", Am. Jour. Physiol., 245, H519-523 (1983), indtil hæmatokriten var ca. 3%. Den oprindelige FiO_2 på 0,8 reduceredes daglig med 0,1 over et tidsrum på 4 dage, hvorefter dyrene returneredes til stuetemperatur. Overlevelse bestemtes efter 14 dage.

10

LD₅₀-analyse

Testemulsionen (50 ml/kg af en 4:1 blanding af stamemulsion (40 volumenprocent PFC) og støtteemulsion (ækvivalent med 16 ml/kg fluorcarbonkomponent)) infuseredes med en hastighed på 1 ml/kg gennem halevenen af 10 Sprague-Dawley rotter på 140-200 g under let etheranæstesi. Efter infusionen returneredes dyrene til deres bure og forsynedes med foder og vand ad libitum. Overlevelsesraten bestemtes efter 14 dage. Testemulsioner med andre PFC-volumenprocenter ville blive fremstillet på lignende måde til fremføring af 16 ml/kg fluorcarbonkomponent.

20

Lagerstabilitet

Testemulsionerne opbevaredes i tilproppede 100 ml serumflasker under en nitrogenatmosfære ved 4°C eller 25°C i mindst 3 måneder. Efter lagringen testedes prøverne for fordelingen af partikelstørrelsen (laserlysspredning), pH og visuel kvalitet (farve, cremedannelse, osv.)

25

Specifikke emulsioner

47 forskellige emulsioner fremstilledes i duplikat ved de i fremgangsmådeafsnittet skitserede metoder. Hver emulsion indeholdt perfluor-decalin, farvetidselolie og æggeblommelecitin. De faktiske koncentrationer af komponenterne i disse emulsioner er anført i tabel I. Derefter analyseredes emulsionerne som ovenfor anført. Resultaterne er anført i tabel II og indtegnet i fig. 1 - ikke udfyldte cirkler for dem, der ikke opfyldte et eller flere krav, og udfyldte cirkler for dem, der opfyldte alle krav.

35

Tabel I

Eksempel nr.	Lecitin/PFD (vægt/vægt-%)	Farvetidse/PFD (vægt/vægt-%)	PFD-% (vægt/vægt)
5			
1	0,66	2,6	30,0
2	1,15	13,0	30,0
3	2,08	17,4	30,0
4	2,60	0,7	30,0
10	5	2,6	30,0
6	2,60	5,2	30,0
7	3,99	10,1	30,0
8	6,08	6,1	30,0
9	6,08	13,9	30,0
15	10	7,99	4,0
11	8,68	5,2	30,0
12	8,68	17,4	30,0
13	9,03	4,0	30,0
14	9,03	8,0	30,0
20	15	1,30	0,0
16	1,30	1,3	40,0
17	1,30	4,6	40,0
18	1,30	7,2	40,0
19	1,30	13,0	40,0
25	20	1,95	2,6
21	1,95	5,2	40,0
22	1,95	7,8	40,0
23	1,95	10,4	40,0
24	2,60	2,6	40,0
30	25	2,93	2,6
26	2,93	5,2	40,0
27	2,93	7,8	40,0
28	2,93	10,4	40,0
29	2,91	1,3	40,0
35	30	3,91	3,9
31	3,91	6,5	40,0
32	3,91	10,4	40,0
33	4,60	1,3	40,0

Tabel I (fortsat)

5	Eksempel nr.	Lecitin/PFD (vægt/vægt-%)	Farvetidse/PFD (vægt/vægt-%)	PFD-% (vægt/vægt)
	34	4,60	13,0	40,0
	35	5,20	0,0	40,0
	36	5,99	3,9	40,0
10	37	7,81	0,0	40,0
	38	7,81	1,3	40,0
	39	7,81	7,2	40,0
	40	7,81	13,0	40,0
	41	9,11	2,6	40,0
15	42	7,81	2,6	50,0
	43	2,60	2,6	50,0
	44	0,66	2,6	50,0
	45	2,60	0,7	50,0
	46	2,60	5,2	50,0
20	47	5,21	2,6	50,0

Tabel II

5	Eksempel* nr.	PSD (nM)	PSD (nM) Serum (120 h)	LD ₅₀ (ml/kg) (støttet)	Overlevelse Totaludskiftning
	1	487	554		
10	2	409	1262		
	3	285	564		
	4	269	267		
	5	221	230		
	6	235	242		
15	7	205	223		
	8	270	245		
	9	280	276		
	10	279	254		
	11	290	290		
20	12	474	429		
	13	388	377		
	14	388	320		
	15	363	460		
	16	290	436	90%	0%
25	17	269	427		
	18	314	1163		
	19	435	1592	70%	33%
	20	221	366		
	21	219	-		
30	22	245	400		
	23	269	916		
	24	207	327	95%	83%
	25	178	319		
	26	172			
35	27	213	410		
	28	202	511		
	29	277	274		
	30	220	247		

Tabel II (fortsat)

5	Eksempel* nr.	PSD (nM)	PSD (nM) Serum (120 h)	LD ₅₀ (ml/kg) (støttet)	Overlevelse Totaludskiftning
10	31	259	255		
	32	327	511		
	33	239	206		
	34	655	705		
	35	235			
15	36	320	287		
	37	219			
	38	379	306	-	100%
	39	513	466		
	40	595	838	0%	67%
20	41	318	307		
	42	373	342		
	43	324	325		
	44	503	612		
	45	290	286		
25	46	428	427		
	47	300	324		

* Alle emulsioner (1-47) havde ved stuetemperatur en lagerstabilitet på mere end 3 måneder som målt ved analyse af partikelstørrelsesfordelingen og visuel inspektion.

PATENTKRAV

1. Fysiologisk acceptabel emulsion, omfattende en stærkt fluoreret organisk forbindelse, en olie, der ikke er væsentligt overfladeaktiv og ikke er væsentligt vandopløselig, og et overfladeaktivt middel, kendetegnet ved, at

- (a) den stærkt fluorerede organiske forbindelse er til stede i emulsionen i en mængde mellem 20 og 60 volumenprocent, og at
- (b) mængderne af det overfladeaktive middel og olien afhænger af volumenprocenten af den stærkt fluorerede organiske forbindelse og er til stede i mængder, som defineres af det i fig. 1 viste volumen og de flader, der definerer dette volumen og effektivt frembringer emulsioner karakteriseret ved (1) en partikelstørrelsesfordeling (PSD) på mindre end 400 nm efter sterilisation, (2) en serumstabilitet karakteriseret ved en PSD på mindre end 400 nm efter fem dage i serum eller ionopløsninger, (3) en LD₅₀-værdi i rotter på mindst 16 ml/kg af den stærkt fluorerede organiske forbindelse i emulsionen, (4) en overlevelsesrate på mindst 70% ved totaludskiftning i rotter, og (5) en lagerstabilitet på mindst flere måneder ved 4)C.

2. Emulsion ifølge krav 1, kendetegnet ved, at den stærkt fluorerede organiske forbindelse er til stede i en mængde mellem 30 og 55 volumenprocent.

3. Emulsion ifølge krav 1, kendetegnet ved, at den stærkt fluorerede organiske forbindelse er til stede i en mængde på ca. 40 volumenprocent.

4. Emulsion ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 3, kendetegnet ved, at den stærkt fluorerede organiske forbindelse er udvalgt blandt perfluordecalin og perfluorocetyl bromid.

5. Emulsion ifølge krav 4, kendetegnet ved, at olien er udvalgt blandt farvetidselolie og sojabønneolie.

6. Emulsion ifølge krav 5, kendetegnet ved, at det overfladeaktive middel er æggeblommelecitin.

5 7. Emulsion ifølge krav 1, yderligere omfattende mindst én forbindelse udvalgt blandt isotoniske midler, osmotisk trykregulerende midler, serumstrækkemidler og antioxidanter.

8. Præparat omfattende en emulsion ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 7.

10

9. Erstatning for røde blodlegemer, omfattende en mængde af en emulsion ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 7, hvilken mængde er terapeutisk virksom til oxygentransport og -tilførsel i mennesker.

15 10. Kontrastmiddel til biologisk afbildning, omfattende en mængde af en emulsion ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 7, hvilken mængde er klinisk virksom til afbildning med modaliteter udvalgt blandt kernemagnetisk resonans, røntgen, ultralyd og positronemissionstomografi.

20

11. Præparat til forbedring af stråle- og kemoterapeutisk behandling af cancer, omfattende en terapeutisk virksom mængde af en emulsion ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 7 og en farmaceutisk acceptabel bærer.

25

12. Præparat til minimering af de ugunstige virkninger af coronar ballonangioplasti, omfattende en terapeutisk virksom mængde af en emulsion ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 7 og en farmaceutisk acceptabel bærer.

30

13. Præparat til præservering af organer, omfattende en til præservering virksom mængde af en emulsion ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 7 og en farmaceutisk acceptabel bærer.

35 14. Præparat til behandling af hjerteanfald, slagtilfælde og vaskulære okklusioner, omfattende en terapeutisk virksom mængde af en emulsion ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 7 og en farmaceutisk acceptabel bærer.

15. Anvendelse af en emulsion ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 7 til fremstilling af en erstatning for røde blodlegemer til understøtning af levende organismers oxygenbehov.

5

16. Anvendelse af en emulsion ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 7 til fremstilling af et præparat til forbedring af stråle- og kemoterapeutisk behandling af cancer.

10

17. Anvendelse af en emulsion ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 7 til fremstilling af et præparat til minimering af de ugunstige virkninger af coronar ballonangioplasti ved perfusion af emulsionen gennem det centrale lumen af et kateter.

15

18. Fremgangsmåde til præservering af organer ved perfusion af en emulsion ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 7.

20

19. Anvendelse af kontrastmiddel ifølge krav 10 til fremstilling af en sammensætning til ikke-invasiv afbildning af indre organer og blodstrømning i forbindelse med afbildning ved kernemagnetisk resonans, ultralyd, positronemissionstomografi eller røntgen.

25

20. Anvendelse af en emulsion ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 7 til fremstilling af et præparat til behandling af hjerteanfald, slagtilfælde og vaskulære okklusioner.

30

21. Fysiologisk acceptabel emulsion, omfattende en stærkt fluoreret organisk forbindelse, en olie, der ikke er væsentligt overfladeaktiv og ikke er væsentligt vandopløselig, og et overfladeaktivt middel,

kendetegnet ved, at

(a) den stærkt fluorerede organiske forbindelse er til stede i emulsionen i en mængde mellem 20 og 60 volumenprocent, og at

35

(b) mængderne af det overfladeaktive middel og olien afhænger af volumenprocenten af den stærkt fluorerede organiske forbindelse og er til stede i mængder, som defineres af det i fig. 1 viste volumen og de flader, der definerer dette volumen og effektivt frembringer

emulsioner karakteriseret ved (1) en partikelstørrelsesfordeling (PSD) på mindre end 300 nm efter sterilisation, (2) en serumstabilitet karakteriseret ved en PSD på mindre end 300 nm efter fem dage i serum eller ionopløsninger, (3) en LD₅₀-værdi i rotter på mindst 16 ml/kg af den stærkt fluorerede organiske forbindelse i emulsionen, (4) en overlevelsesrate på mindst 70% ved totaludskiftning i rotter, og (5) en lagerstabilitet på mindst flere måneder ved 4)C.

10

15

20

FIG. 1

