



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 206 319** ⁽¹³⁾ **C2**

(51) МПК⁷ **A 61 K 31/02, 9/107, B 01 F 3/08, A 61 P 7/08, 9/10**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 2001126062/14, 20.07.2000
(24) Дата начала действия патента: 20.07.2000
(46) Дата публикации: 20.06.2003
(56) Ссылки: RU 2070033 C1, 10.12.1996. RU 2088217 C1, 27.08.1997. SU 797546 A, 15.01.1981. EP 0307087 A1, 15.03.1989. DE 4325100 A1, 02.02.1995.
(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 18.09.2001
(86) Заявка РСТ: RU 00/00309 (20.07.2000)
(87) Публикация РСТ: WO 00/00309 (21.11.2000)
(98) Адрес для переписки: 103735, Москва, ул.Ильинка, 5/2, ООО "Союзпатент", пат.пов. А.П.Агурееву, рег.№ 0590

(71) Заявитель:
Открытое акционерное общество
Научно-производственная фирма "Перфторан"
(72) Изобретатель: Маевский Е.И.,
Иваницкий Г.Р., Макаров К.Н., Кулакова Г.М.,
Архипов В.В., Мороз В.В., Старовойтова Л.Н.,
Сенина Р.Я., Пушкин С.Ю., Ивашина А.И.
(73) Патентообладатель:
Открытое акционерное общество
Научно-производственная фирма "Перфторан"

(54) ЭМУЛЬСИЯ ПЕРФТОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ДЛЯ МЕДИЦИНСКИХ ЦЕЛЕЙ, СПОСОБ ЕЕ ПРИГОТОВЛЕНИЯ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ

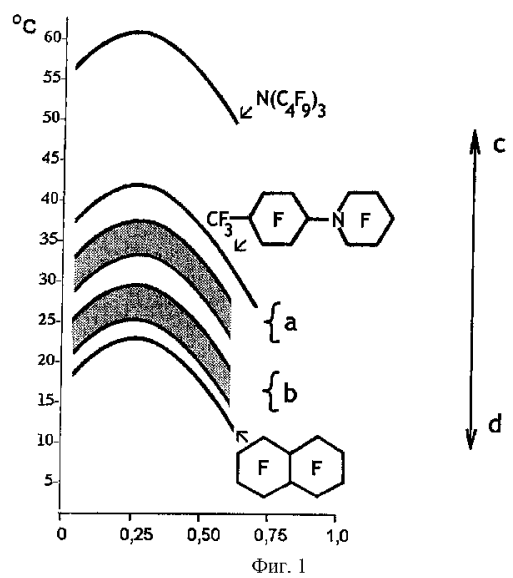
(57) Эмульсия перфторорганических соединений (ПФОС) для внутрисосудистого введения состоит из быстро выводящегося перфторуглерода и медленно выводящегося перфторированного третичного амина и дополнительно содержит не менее трех видов взятых в небольших количествах примесей ПФОС. Примеси ПФОС близки по структуре и физико-химическим свойствам к основным ПФОС. Эмульсия также содержит минорные примеси Н-перфторалканов. Эмульсия ПФОС стабилизируется сополимером полиоксипропилен-полиоксипропиленом. При получении эмульсии стабилизирующий агент прогревают при температуре до 75°C, все компоненты насыщают углекислым газом и

гомогенизацию выполняют при поддуве углекислого газа. Предложенный способ позволяет минимизировать появление перекисей и тем самым снизить реактогенность эмульсии. Состав композиции обуславливает стабильность эмульсии при хранении и при попадании в кровоток, а также низкую вязкость эмульсии ПФОС, что обеспечивает высокую динамическую кислородную емкость препарата и улучшает доставку кислорода к тканям. Предлагается использовать эмульсии ПФОС в качестве средства для лечения воздушно-жировой эмболии, облитерирующих поражений сосудов конечностей, а также для профилактики токсических поражений, вызываемых различными ксенобиотиками. 5 с. и 14 з.п.ф-лы, 6 табл., 2 ил.

RU 2 206 319 C2

RU 2 206 319 C2

RU 2206319 C2



RU 2206319 C2



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 206 319** ⁽¹³⁾ **C2**
 (51) Int. Cl.⁷ **A 61 K 31/02, 9/107, B 01 F 3/08, A 61 P 7/08, 9/10**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 2001126062/14, 20.07.2000

(24) Effective date for property rights: 20.07.2000

(46) Date of publication: 20.06.2003

(85) Commencement of national phase: 18.09.2001

(86) PCT application:
RU 00/00309 (20.07.2000)

(87) PCT publication:
WO 00/00309 (21.11.2000)

(98) Mail address:
103735, Moskva, ul. Il'inka, 5/2, OOO
"Sojuzpatent", pat.pov. A.P. Agureevu, reg. № 0590

(71) Applicant:
Otkrytoe aktsionernoe obshchestvo
Nauchno-proizvodstvennaja firma "Perforan"

(72) Inventor: Maevskij E.I.,
Ivanitskij G.R., Makarov K.N., Kulakova
G.M., Arkhipov V.V., Moroz V.V., Starovojtova
L.N., Senina R.Ja., Pushkin S.Ju., Ivashina A.I.

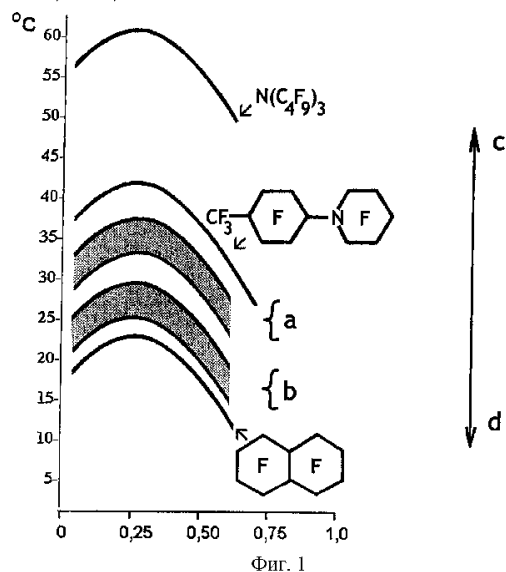
(73) Proprietor:
Otkrytoe aktsionernoe obshchestvo
Nauchno-proizvodstvennaja firma "Perforan"

(54) **EMULSION OF PERORGANOFLUORIC COMPOUND FOR MEDICINAL AIM, METHOD FOR ITS PREPARING AND METHODS OF TREATMENT AND PROPHYLAXIS OF DISEASES WITH ITS USING**

(57) Abstract:

FIELD: organofluoric compounds, medicine.
SUBSTANCE: emulsion of perorganofluoric compounds (PFOS) for intravascular administration consists of rapidly eliminating perfluorocarbon and slowly eliminating perfluorinated tertiary amine and involves additionally at least three species of PFOS admixtures taken in small amounts. PFOS admixtures are similar by structure and physical-chemical properties to basic PFOS. Emulsion comprises also minor admixtures of H-perfluoroalkanes. PFOS emulsion is stabilized with copolymer polyoxyethylene-polyoxypropylene. In preparing emulsion a stabilizing agent is heated at temperature below 75 C, all components are saturated with carbon dioxide and homogenization is carried out with carbon dioxide blowing. Proposed method ensures to minimize peroxides formation and therefore to reduce reactivity of emulsions. Components of composition causes stability of emulsion in storage and in blood circulation and low viscosity of PFOS emulsion that provides high dynamic oxygen capacity of the preparation and improves delivery of oxygen to tissues. Invention proposes to use PFOS emulsions as agent for

treatment air-fat embolism, obliterating damages of limb vessels and also for prophylaxis of toxic damages caused by different xenobiotics. EFFECT: improved preparing method of emulsion, treatment and prophylaxis, valuable medicinal properties. 19 cl, 6 tbl, 8 ex



RU 2 206 319 C2

RU 2 206 319 C2

Текст описания в факсимильном виде. Ту

Формула изобретения:

1. Эмульсия перфторорганических соединений (ПФОС) для медицинских целей, содержащая быстро выводющийся перфторуглерод и медленно выводющийся перфторированный третичный амин, стабилизирующий агент, физиологически приемлемый водно-солевой раствор с субстратом энергетического обмена, отличающаяся тем, что она дополнительно содержит примеси, по меньшей мере, трех быстро выводющихся перфторуглеродов C₇-C₁₀ и, по меньшей мере, трех медленно выводющихся перфтортретичных аминов C₁₁-C₁₃, близких по физико-химическим свойствам к основным перфторорганическим соединениям, в частности по критической температуре растворения в гексане, и минорные примеси N-перфторалканов, при этом содержание примесей быстро выводющихся перфторуглеродов составляет не более 15% от содержания основного перфторуглерода, содержание примесей медленно выводющихся перфтортретичных аминов не превышает 50% от содержания основного перфтортретичного амина, а содержание примесей N-перфторалканов не превышает 0,1 об. %.

2. Эмульсия ПФОС по п.1, отличающаяся тем, что в качестве основного быстро выводющегося перфторуглерода используется смесь изомеров перфтордекалина в виде цис- и трансформ.

3. Эмульсия ПФОС по п. 1, отличающаяся тем, что в качестве основного медленно выводющегося перфтортретичного амина используется смесь изомеров перфтор-N-4-(метилциклогексил)-пиперидина.

4. Эмульсия ПФОС по п.1, отличающаяся тем, что примеси быстро выводющихся перфторуглеродов C₇-C₁₀ представляют собой смесь перфторметилиндана, перфтор-1-метил-3-пропилциклогексана, перфтор-индана, перфтор-4-оксодекалина, перфторбутилциклогексана, перфторпропилциклогексана, перфторэтилциклогексана, перфторбутил-циклопентана, перфтор-1-метил-2-этилциклогексана.

5. Эмульсия ПФОС по п.1, отличающаяся тем, что примеси медленно выводющихся перфтортретичных аминов C₁₁-C₁₃ представляют собой смесь изомеров цис- и трансформ перфтор-N-(4-метилциклогексил)-2-метилпирролидина, перфторметилбутил-(4-метилциклогексил)-амина, перфторметилпропил-(4-метилциклогексил)-амина, перфторметилпропил-(метилциклопентил)-амина и перфтор-N-(4-метилциклогексил)-1-метилпиперидин.

6. Эмульсия ПФОС по любому из пп.1-5, отличающаяся тем, что соотношение быстро выводющихся и медленно выводющихся ПФОС составляет 2:1 или 3:1.

7. Эмульсия ПФОС по любому из пп.1-5, отличающаяся тем, что в качестве стабилизирующего агента используется сополимер полиоксипропилена-полиоксипропилена с мол.м.

6-10 тыс. Да.

8. Эмульсия ПФОС по п.1 или 7, отличающаяся тем, что содержание стабилизирующего агента составляет 2-4%.

9. Эмульсия ПФОС по любому из пп.1-8, отличающаяся тем, что физиологически приемлемый водно-солевой раствор включает NaCl, KCl, MgCl₂, NaHCO₃, NaH₂PO₄ и D-глюкозу.

10. Эмульсия ПФОС по любому из пп.1-9, отличающаяся тем, что в предпочтительном варианте она содержит: основной быстро выводющийся перфторуглерод в виде смеси цис- и транс-изомеров перфтордекалина в количестве 6 об.%; примеси быстро выводющихся перфторуглеродов, представляющих собой смесь перфторметилиндана, перфтор-1-метил-3-пропилциклогексана, транс-перфториндана, перфтор-4-оксодекалина, перфторбутилциклогексана, перфторпропилциклогексана, перфторэтилциклогексана, перфторбутилциклопентана, цис-перфтор-1-метил-2-этилциклогексана в количестве 0,7 об.%; основной медленно выводющийся перфтортретичный амин в виде смеси изомеров перфтор-N-4-(метилциклогексил)-пиперидина в количестве 2,3 об.%; примеси перфтортретичных аминов, представляющих собой смесь перфтор-N-(4-метилциклогексил)-2-метилпирролидина, перфторметил-(4-метилциклогексил)-амина, цис- и транс-изомеров перфторметилпропил-(4-метилциклогексил)-амина, смесь изомеров перфторметилпропил-(метилциклопентил)-амина и перфтор-N-(4-метилциклогексил)-1-метилпиперидин всего в количестве 1,0 об.%; N-перфторалканы в количестве 0,02 об. %; сополимер полиоксипропилена-полиоксипропилена с мол.м. 8 тыс. Да в количестве 4% и соотношением блоков полиоксипропилена и полиоксипропилена в сополимере 4:1.

11. Эмульсия ПФОС по любому из пп.1-7, отличающаяся тем, что в случае использования для кровезамещения и/или перфузии органов водно-солевой раствор содержит 102 мМ NaCl, 5,2 мМ KCl, 1,8 мМ MgCl₂, 7,7 мМ NaHCO₃, 1,65 мМ NaH₂PO₄ и 11 мМ D-глюкозы.

12. Эмульсия ПФОС по любому из пп.1-8, отличающаяся тем, что в случае использования для кардиоплегии водно-солевой раствор содержит 102 мМ NaCl, 5,2 мМ KCl, 1,8 мМ MgCl₂, 7,7 мМ NaHCO₃, 1,65 мМ NaH₂PO₄ и 11 мМ D-глюкозы, 5 мМ пирувата натрия, 5 мМ β-оксибутирата натрия, 5 мМ сукцината натрия, 5 мМ глутамата натрия и 5 мМ таурина.

13. Способ приготовления эмульсии перфторорганических соединений для медицинских целей, охарактеризованной в любом из пп.1-12, включающий смешивание апиrogenных стерильных компонентов путем пропускания смеси жидких перфторорганических соединений через водный раствор стабилизирующего агента и

последующую многократную гомогенизацию полученной предэмульсии в двухконтурном гомогенизаторе высокого давления, заключающийся в том, что перед смешиванием смесь жидких перфторорганических соединений и водный раствор стабилизирующего агента насыщают углекислым газом, после чего прогревают водный раствор стабилизирующего агента при температуре не выше 75°C; подают смесь жидких перфторорганических соединений в раствор охлажденного стабилизирующего агента, по меньшей мере, двумя струями в атмосфере углекислого газа; интенсивно перемешивают предэмульсию при одновременном пропускании ее через первый контур гомогенизатора при давлении 300-450 кг/см²; подвергают эмульсию многократной гомогенизации во втором контуре гомогенизатора при давлении 400-600 кг/см²; добавляют физиологически приемлемый водно-солевой раствор, при этом, процесс приготовления предэмульсии и последующей гомогенизации осуществляют в атмосфере углекислого газа.

14. Способ приготовления эмульсии по п.

13, отличающийся тем, что в предпочтительном варианте раствор стабилизирующего агента прогревают при 70 °С в течение 12 ч.

5 15. Способ приготовления эмульсии по п.13, отличающийся тем, что предэмульсию пропускают через первый контур гомогенизатора 3-4 раза, а затем пропускают эмульсию через второй контур 4-5 раз.

10 16. Средство, растворяющее воздушные и жировые эмболы в кровотоке, представляющее собой эмульсию перфторорганических соединений по п.1.

15 17. Средство для лечения облитерирующих поражений сосудов конечностей, представляющее собой эмульсию перфторорганических соединений по п.1.

20 18. Средство, модулирующее превращение токсических липофильных ксенобиотиков в зависимости от сроков введения ксенобиотиков и указанного средства, представляющее собой эмульсию перфторорганических соединений по п.1.

19. Средство по п.18, которое представляет собой сорбент токсических липофильных ксенобиотиков в кровотоке.

25

30

35

40

45

50

55

60

Область техники

Изобретение относится к области медицинской промышленности и касается состава и способа получения лекарственной формы эмульсий перфторорганических соединений (ПФОС) с газотранспортными свойствами, предназначенных, в частности, для внутрисосудистого введения при возмещении кровопотерь и лечения различных заболеваний, сопровождающихся гипоксическими или ишемическими поражениями, а также в качестве контрастных и перфузионных сред.

Предшествующий уровень техники

Спектр возможных применений газопереносящих эмульсий ПФОС продолжает расширяться. Несмотря на это, в целом применение этих препаратов пока ограничено в силу следующих факторов.

- Недостаточно эффективна доставка кислорода, обусловленная, в частности, недостаточной кислородной емкостью эмульсий ПФОС по сравнению с цельной кровью, что заставляет разработчиков эмульсий ПФОС увеличивать концентрацию газопереносящих компонентов, например до 65 об.% [Европатент № 0307087В1/ публикация от 08.06.1994]. Однако, увеличение концентрации ПФОС в эмульсии неизбежно сопровождается резким увеличением вязкости препаратов. В результате эмульсии с высокой концентрацией ПФОС, несмотря на высокую величину абсолютной кислородной емкости, не обеспечивают достаточно эффективную доставку кислорода к тканям из-за малой динамической кислородной емкости, определяемой отношением величин абсолютной кислородной емкости к вязкости. При высокой вязкости препарата компенсаторные реакции сердечно-сосудистой системы, направленные на увеличение минутного объема и повышение реологических свойств крови, не могут обеспечить ни

достаточной перфузии крупных сосудов, ни эффективной микроциркуляции, а следовательно, нарушается доставка кислорода к тканям.

- Относительно высока реактогенность эмульсий ПФОС.

Реактогенность связана, во-первых, с образованием перекисных радикалов в стабилизирующем агенте [L.E.McCoy, C.A.Berker, T.H.Goodin, M.J.Barnhart, Scann. Electron microscopy, 1984, v.1, p.311], формирующем адсорбционный слой частиц эмульсии ПФОС, а, во-вторых, с наличием в эмульсии крупных частиц, воспринимаемых иммунной системой организма как чужеродные агенты [С.И.Воробьев и др. Сравнительное изучение некоторых перфторуглеродных эмульсий. - в кн. Физиологическая активность фторсодержащих соединений (эксперимент и клиника), Пушино, 1995, с.33-41].

- Вероятность проявления токсичности эмульсий, обусловленная влиянием на биологические структуры быстро выводящихся из организма липофильных перфторуглеродов, традиционно используемых для создания газопереносящих кровезаменителей, и возможной агрегацией и укрупнением частиц эмульсии в кровотоке. Быстро выводящиеся перфторуглероды легко взаимодействуют с ферментными системами и биологическими мембранами, форменными элементами и белками крови, и, как показано рядом исследований, вызывают анафилактическую реакцию и отсроченную гибель (через 50-80 дней) крупных лабораторных животных, имеющих малую скорость кровотока, сравнимую с таковой у человека [А.Н.Склифас, В.В.Образцов, К.Н.Макаров, Д.Г.Шехтман, Н.И.Кукушкин, «Исследование механизма токсичности эмульсии перфтордекалина для кроликов», в сб.: «Перфторуглеродные активные среды для медицины и биологии. Новые аспекты исследования». Пушино, 1993, с.129-135].

- Высокая стоимость препаратов эмульсий ПФОС, связанная с необходимостью получения индивидуальных ПФОС и высокими требованиями к их очистке от примесей, что делает их малодоступными для пользователей.

Известны бинарные эмульсии ПФОС (см., например, патент СССР №. 797546, опубл. в Бюлл. «Открытия, изобретения,..», №2, 15.01.1981, или патент РФ № 2088217, опубл. в Бюлл. «Изобретения...(заявки...,)» №24, 27.08.1997), в которых для снижения токсичности помимо быстро выводящихся перфторуглеродов содержатся медленно выводящиеся перфторорганические соединения, например, перфторированные третичные амины, обладающие выраженными липофобными свойствами и не вступающие в какие-либо взаимодействия с биологическими структурами. Так, показано, что наличие в составе эмульсий и даже длительная аккумуляция в органах медленно выводящегося перфтортрибутиламина, задерживающегося в макрофагах различных органов на срок, соизмеримый с длительностью жизни животных (и поэтому не используемого для медицинских целей), не вызывает каких-либо патологических изменений. Это подтверждается более чем 30-ти летними исследованиями по поиску токсичности и возможной канцерогенности, а также 16-летним опытом применения в медицине эмульсий перфторорганических соединений, содержащих другие относительно медленно выводящиеся перфторированные третичные амины [Biomaterials, artificial cells, and artificial organs. 1988, vol. 16, No. 1-3, Special Issue from III International Symposium on «Blood Substitutes»; А.М.Голубев, Итоги и перспективы изучения влияния фторуглеродных кровезаменителей на биологические системы./Перфторуглеродные активные среды для медицины и биологии (новые аспекты исследований). Пушино: ОНТИ Пушинского Научного Центра РАН. 1993. С. 88-93].

Бинарная эмульсия ПФОС по патенту РФ № 2088217 является наиболее близкой к заявляемой по составу компонентов. Она содержит смесь быстро выводящегося липофильного перфторуглерода перфтордекалина (ПФД) или перфтороктилбромида и медленно выводящегося липофобного перфторированного третичного амина перфтор-N-(4-метилциклогексил)-пиперидина (ПФМЦП) в соотношении 40-50 об.% к 1-10 об.% и

стабилизируется фосфолипидами, содержание которых составляет от 2 до 6 %. При внутривенном введении такой эмульсии выживает 100% кроликов в течение 60 дней наблюдений. Однако, эта эмульсия имеет высокую вязкость (14-16 сП), что, как указывалось выше, несмотря на высокую величину абсолютной кислородной емкости препарата, приводит к резкому падению динамической кислородной емкости и не обеспечивает эффективной доставки кислорода.

Кроме того, использование резко отличающихся по физическим свойствам ПФОС, как липофильный ПФД и липофобный ПФМЦП приводит к кластеризации фторуглеродной фазы внутри частиц эмульсии, что затрудняет подбор стабилизирующего агента и ухудшает стабильность эмульсии. В результате изменяется дисперсность эмульсии как при хранении, так и при попадании в кровоток.

Наконец, в этом изобретении для получения эмульсии используются индивидуальные высокоочищенные перфтордекалин и перфтор-N-(4-метилциклогексил)-пиперидин, что, как уже указывалось, существенно удорожает стоимость эмульсии ПФОС.

Известна бинарная эмульсия ПФОС, наиболее близкая по составу и соотношению компонентов к заявляемой [см. патент РФ № 2070033, опубл. в Бюлл. «Изобретения...(заявки,...)», №34, 27.08.97г.]. Эта эмульсия содержит перфторуглерод в форме цис- и трансизомеров перфтордекалина и перфторированный третичный амин перфтор-N-(4-метилциклогексил)-пиперидин в более низких концентрациях обоих компонентов: 7 об.% и 3,5 об.% соответственно, и стабилизируется сополимером полиоксиэтилена-полиоксипропилена с молекулярной массой 6-8 тыс. дальтон (Да) при среднем размере частиц эмульсии 0,08-0,1 мкм. Этот состав при сравнительно малой величине абсолютной кислородной емкости (7 об. % кислорода при рО₂ 760 мм. рт ст.) обеспечивает благодаря малой вязкости (3,5 сП) более высокую динамическую кислородную емкость, чем другие известные эмульсии ПФОС (см табл. 1 в описании к патенту на это изобретение), то есть, лучшую доставку кислорода к

тканям. Благодаря высокой доле медленно выводящегося ПФМЦП (соотношение ПФМЦП/ПФД = 1:2) в составе ПФОС и высокой степени монодисперсности частиц при малом их размере эта эмульсия не токсична для крупных животных. Однако, эмульсии по Патенту РФ № 2070033, свойственен также ряд недостатков: относительно высокая реактогенность из-за образования перекисных соединений в стабилизирующем агенте в процессе изготовления и при хранении эмульсии, недостаточная стабильность при повторном замораживании-оттаивании, при попадании в кровоток и при контакте с высокомолекулярными декстранами, так как в ее составе используются два ПФОС, резко отличающиеся по физико-химическим свойствам, а также высокая стоимость препарата из-за использования высокоочищенных ПФД и ПФМЦП.

Известен способ получения эмульсий ПФОС для медицинских целей, в котором для уменьшения реактогенности предлагается уменьшить средний размер и повысить монодисперсность частиц эмульсии. (см. описание изобретения к патенту РФ № 2070033). Эти свойства достигаются за счет капельного введения смеси двух видов жидких ПФОС в водный раствор стабилизирующего агента, что предотвращает появление макроскопической границы раздела фаз, увеличивает время и поверхности контакта ПФОС и стабилизирующего агента на стадии получения предэмульсии. Субмикронная эмульсия получается в двухконтурной системе гомогенизации в процессе 12-кратной рециркуляции в контурах гомогенизатора. Согласно описанию изобретения первый и второй контуры гомогенизатора используются попеременно, что замедляет процесс гомогенизации, так как возврат из второго контура в первый приводит к попаданию в уже измельченную тонкодисперсную эмульсию крупных частиц предэмульсии и даже капель ПФОС, неизбежно образующихся и задерживающихся на стенках камеры и трубок в первом контуре. Кроме того, как уже отмечено при критике состава эмульсии, этот способ не предотвращает образование перекисных соединений.

Раскрытие изобретения

Задачей предлагаемого изобретения является создание такого состава эмульсии ПФОС, который обеспечивает снижение реактогенности препарата и его токсичности для крупных животных и человека, высокую динамическую кислородную емкость, высокую стабильность при многократном замораживании-оттаивании и при контакте с высокомолекулярными декстранами-плазмозаменителями.

Другой задачей предлагаемого изобретения является разработка такого способа получения предэмульсии и собственно субмикронной эмульсии, который при сохранении высокой монодисперсности системы и при заданном малом размере частиц препятствует образованию перекисных соединений в процессе приготовления эмульсии и при ее хранении.

Еще одной задачей изобретения является уменьшение затрат, упрощение и ускорение процесса получения эмульсии ПФОС, что необходимо для производства лекарственного средства в промышленных масштабах.

Первая задача решается тем, что известная эмульсия ПФОС для медицинских целей, содержащая быстро выводящийся перфторуглерод и медленно выводящийся перфтортретичный амин, стабилизирующий агент и физиологически приемлемый водно-солевой раствор с субстратом энергетического обмена, согласно изобретению, дополнительно содержит примеси, по меньшей мере, трех быстро выводящихся цис- и транс-изомеров перфторуглеродов C_7-C_{10} и, по меньшей мере, трех медленно выводящихся перфтортретичных аминов $C_{11}-C_{13}$, близких по физико-химическим свойствам к основным перфторорганическим соединениям, например, по критической температуре растворения в гексане, и минорные примеси Н-перфторалканов. При этом содержание примесей быстро выводящихся перфторуглеродов составляет не более 15% от содержания основного перфторуглерода, содержание примесей медленно выводящихся перфтортретичных аминов не превышает 50% от содержания

основного перфтортретичного амина, а содержание примесей Н-перфторалканов не превышает 0,1 об.%. В качестве быстро выводящегося перфторуглерода используется смесь цис- и транс-изомеров перфтордекалина или перфтороктилбромид, а в качестве медленно выводящегося ПФОС используется перфтор-N-4-(метилциклогексил)-пиперидин. В качестве стабилизирующего агента используется сополимер полиоксиэтилен-полиоксипропилена с молекулярной массой 6-10 тыс. Да.

Соотношение смеси перфторуглеродов и перфтортретичных аминов составляет 2:1 или 3:1.

В предпочтительном варианте эмульсия содержит основной быстро выводящийся перфторуглерод в виде смеси цис- и транс-изомеров перфтордекалина в количестве 6 об.% и примеси быстро выводящихся перфторуглеродов C₇-C₁₀, представляющих собой смесь перфтометилиндана, перфтор-1-метил-3-пропилциклогексана, транс-перфториндана, перфтор-4-оксодекалина, перфторбутиллциклогексана, перфторпропилциклогексана, перфторэтилциклогексана, перфторбутилциклопентана, цис-перфтор-1-метил-2-этилциклогексана всего в количестве 0,7 об%; основной медленно выводящийся перфтортретичный амин перфтор-N-4-(метилциклогексил)-пиперидин в виде смеси изомеров в количестве 2,3 об.% и примеси медленно выводящихся перфтортретичных аминов C₁₁-C₁₃, представляющих собой смесь перфтор-N-(4-метилциклогексил)-2-метилпирролидина, перфформетилбутил-(4-метилциклогексил)-амина, цис- и транс-изомеров перфформетилпропил-(4-метилциклогексил)-амина, изомеры перфформетилпропил-(метициклопентил)-амина и перфтор-N-(4-метилциклогексил)-1-метилпиперидин, всего в количестве 1,0 об%; а также примеси Н-перфторалканов в количестве 0,02 об%.

В предпочтительном варианте соотношение быстро и медленно выводящихся ПФОС составляет 2:1. Содержание сополимера полиоксиэтилен-полиоксипропилена с молекулярной массой 8 тыс. Да составляет 4%, при соотношении блоков

полиоксиэтилена и полиоксипропилена в сополимере 4:1.

Физиологически приемлемый водно-солевой раствор при использовании эмульсии ПФОС в качестве плазмозаменителя и для перфузии органов содержит 102 мМ NaCl, 5,2 мМ KCl, 1,8 мМ MgCl₂, 7,7 мМ NaHCO₃, 1,65 мМ NaH₂PO₄, и 11 мМ D-глюкозы.

При использовании эмульсии для противоишемической защиты отключенного от кровотока сердца в процессе фармако-холодовой кардиopleгии водно-солевой раствор содержит 102 мМ NaCl, 5,2 мМ KCl, 1,8 мМ MgCl₂, 7,7 мМ NaHCO₃, 1,65 мМ NaH₂PO₄, и 11 мМ D-глюкозы, 5 мМ пирувата натрия 5 мМ β-оксибутирата натрия, 5 мМ сукцината натрия, 5 мМ глутамата натрия, 5 мМ таурина.

Такое содержание и состав перфторуглеродов и перфтортретичных аминов соответствует составу недоочищенных ПФД и ПФМЦП, которые практически не проявляют каких-либо токсических свойств ни сами по себе (при испытаниях на изолированных культивируемых лимфоидных клетках), ни в составе эмульсии (при испытании на мелких грызунах и кроликах) также, как и индивидуальные высокоочищенные ПФД и ПФМЦП, не содержащие примесей других ПФОС (табл 1 и 2). Это обусловлено тем, что токсичность ПФОС обусловлена не их видом, а наличием недофторированных примесей. Если последние отсутствуют, то следующими факторами, ответственными за токсичность являются концентрация ионов фтора в водной фазе, детергентные свойства стабилизирующего агента, появление в эмульсии перекисей и наличие крупных или легко слипающихся частиц. Причиной гибели крупных животных, например, кроликов, может быть, как следует из данных, приведенных в табл. 3 описания изобретения по патенту РФ №2088217, использование в составе эмульсии исключительно быстро выводящихся высоколипофильных перфторорганических соединений, тогда как введение липофобного, то есть медленно выводящегося компонента ПФМЦП, приводит к уменьшению токсичности, в результате чего выживаемость кроликов достигает 100% в течение 60 дней после однократного введения 20 мл эмульсии ПФОС на кг массы тела. Сравнение эмульсий ПФОС по этому

параметру показывает (табл. 2), что патентуемый нами состав не вызывает гибель кроликов даже после 20-кратного введения указанной дозы. Более того, если патентуемый состав вводится до, одновременно или хотя бы через неделю после введения эмульсии, изготовленной только из ПФД (обеспечивающей 100% гибели кроликов), то все животные выживают (табл. 2).

Примесные ПФОС, присутствующие в рецептуре эмульсии, имеют структуру, близкую к структуре основных ПФОС, и создают ряд ПФОС с градуально меняющимися липофильно-липофобными свойствами (фиг.1, табл. 3), что способствует формированию более гомогенной не кластеризованной фторуглеродной фазы внутри частиц эмульсии, повышает стабильность частиц эмульсии, уменьшает явления внутримолекулярной перегонки, ответственное за укрупнение частиц, тормозит агрегацию частиц как при попадании в кровоток, так и при повторном замораживании и контакте с высокомолекулярными онкотическими агентами декстрановой природы. (табл. 4).

Наличие во фторуглеродной фазе эмульсии набора ПФОС с выраженными липофобным свойствами, в частности, перфтортретичных аминов, вытесняемых на поверхность фторуглеродной фазы, способствует лучшему взаимодействию со стабилизирующим агентом - блок-сополимером полиоксиэтилен-полиоксипропилена и удержанию его в адсорбционном слое. В результате поверхность частиц эмульсии становится менее рыхлой, приобретает улучшенные реологические характеристики: пониженную вязкость и, как следствие, более высокую динамическую кислородную емкость при той же величине абсолютной кислородной емкости, а также повышенную стабильность как *in vitro* (табл.4), так и в кровотоке, проявляющаяся в увеличении времени циркуляции эмульсии (табл. 5).

В известных литературных источниках не описаны эмульсии ПФОС, в которых содержится смесь из нескольких близких по структуре ПФОС, различающихся по физико-химическим параметрам так, чтобы они составляли ряд соединений с плавно

меняющимися свойствами от липофильных к липофобным.

В выложенной заявке на выдачу патента ФРГ № 4325100 А1, описана эмульсия ПФОС, содержащая примеси Н-перфторалканов в количестве от 1 до 5%. По мнению авторов заявки, это позволяет улучшить кислородтранспортные свойства эмульсии и снизить ее стоимость за счет уменьшения расходов на очистку ПФОС. Однако выполненный нами анализ показал, что содержание Н-перфторалканов выше 1 масс. % (0,5 об.%) может приводить к появлению токсичности у препаратов эмульсий как для изолированных культивируемых клеток, так и для целостного организма.

Состав ПФОС определяет выбор того или иного стабилизирующего агента.

В настоящее время для приготовления эмульсий быстро выводящихся ПФОС используются дорогостоящие фосфолипиды биологического происхождения, имеющие высокое сродство к липофильным ПФОС и требующие дополнительных добавок антиоксидантов для предотвращения перекисного окисления. В случае приготовления бинарных композиций из двух относительно близких по липофильно-липофобным свойствам ПФОС (перфтордекалин и перфтортрипропиламин) используется смесь фосфолипидов с сополимером полиоксиэтилен-полиоксипропилена [Патент СССР № 797546, принадлежит фирме Green Cross Corp.]. Синтетическим дешевым сополимером полиоксиэтилен-полиоксипропилена стабилизируют эмульсии, содержащие липофобные ПФОС, например, перфтортрибутиламин, который не выводится из организма животных и поэтому используется только в экспериментальной фармакологии и физиологии, либо ПФМЦП и, с меньшим успехом, - смеси ПФД с ПФМЦП. Композиция ПФОС, предлагаемая в настоящем изобретении, состоящая из смеси нескольких ПФОС с градуально меняющимися липофильно-липофобными свойствами, также хорошо стабилизируется в эмульгированном виде сополимером полиоксиэтилен-полиоксипропилена, что существенно удешевляет эмульсию и позволяет использовать простые меры для минимизации опасности

появления гидроперекисей в процессе изготовления и хранения эмульсии без дополнительного введения антиоксидантов в рецептуру.

Вторая задача решается тем, что в известном способе приготовления эмульсии ПФОС, включающем смешивание депирогенизированных компонентов путем пропускания жидких ПФОС через водный раствор стабилизирующего агента и многократную гомогенизацию полученной смеси в двухконтурном гомогенизаторе высокого давления, согласно изобретению, перед смешиванием компонентов смесь жидких ПФОС и водный раствор стабилизирующего агента насыщают углекислым газом, после чего прогревают водный раствор стабилизирующего агента при температуре не выше 75°C, затем смесь жидких ПФОС вводят несколькими струями в охлажденный водный раствор стабилизирующего агента при интенсивном перемешивании и поддуве углекислого газа, одновременно прогоняя получаемую крупнодисперсную предэмульсию несколько раз через первый контур гомогенизатора, после чего измельченную предэмульсию подвергают гомогенизации во втором контуре гомогенизатора до получения требуемой дисперсности при поддуве углекислого газа и добавляют водно-солевой состав. Полученную лекарственную форму разливают по емкостям.

Насыщение смешиваемых компонентов углекислым газом позволяет создать условия, при которых в процессе изготовления эмульсии минимизируется образование перекисных соединений, наличие которых также, как и наличие крупных частиц обуславливает появление реактогенности эмульсий (табл. 5). В экспериментальных условиях о наличии реактогенности судили по степени падения содержания нейтрофильных лейкоцитов в периферической крови кролика после введения эмульсии в дозе 10 мл на кг массы тела. Количественно степень реактогенность рассчитывали по величине нейтропенического индекса: увеличение нейтропенического индекса более 3 единиц свидетельствует о заметной

реактогенности эмульсий [М.В.Беркос, Эмульсии перфторуглеродных соединений при внутривенном введении в эксперименте. Автореферат дис.канд наук, - Л.,1991].

Прогрев водного раствора стабилизирующего агента (проксанола) позволяет депирогенизировать раствор без пропускания через сорбенты, ухудшающие качество стабилизирующего агента и изменяющие его молекулярно-массовое распределение, а также поверхностно-активные свойства. Отклонения от указанных значений температуры ухудшают поверхностно-активные свойства стабилизирующего агента или повышают содержание гидроперекисей в нем.

Струйное введение жидких ПФОС в водный раствор стабилизирующего агента при интенсивном перемешивании и одновременном пропускании получаемой смеси через гомогенизатор высокого давления способствует ускорению процесса получения предэмульсии. Регулирование скорости подачи ПФОС, перемешивания и потока смеси через гомогенизатор осуществляется так, чтобы предотвратить образование макроскопической границы раздела фаз ПФОС/вода, что является необходимым условием для получения монодисперсной эмульсии.

За счет последовательного использования двух контуров гомогенизатора число циклов рециркуляции сокращается по сравнению с прототипом с 12 до 9.

Таким образом, предлагаемый способ позволяет получать крупные партии эмульсий, уменьшить образование перекисных соединений до минимума при сохранении высокой монодисперсности частиц эмульсии на уровне 0,05-0,1 мкм, (табл. 6).

Использование смеси недоочищенных перфторуглеродов и перфтортретичных аминов вместо индивидуальных высокоочищенных ПФОС, а также более простой и ускоренной технологии дает возможность решить третью задачу изобретения - сократить расходы на производство эмульсии и уменьшить стоимость препарата как минимум в 2, 5 раза, при одновременном

увеличении стабильности и улучшении реологических свойств эмульсий. Благодаря этому открываются возможности для промышленного производства и более широкого использования эмульсий ПФОС в клинической практике.

Краткое описание чертежей

В дальнейшем изобретение поясняется описанием примеров его осуществления и прилагаемыми чертежами, на которых:

фиг. 1 изображает фазовые диаграммы температура-состав двухкомпонентных систем ПФОС-гексан, где по оси ординат отложена температура в градусах С и по оси абсцисс - доля ПФОС в двухкомпонентной системе в относительных единицах;

фиг. 2 - схему устройства для приготовления лекарственной формы эмульсии ПФОС, согласно изобретению.

Сущность изобретения поясняется фиг.1, на которой представлены фазовые диаграммы температура-состав двухкомпонентных систем ПФОС-гексан для различных видов ПФОС, в том числе, входящих в состав патентуемой рецептуры эмульсии ПФОС.

При этом позицией "а" обозначена зона для примесей ПФМЦП, позицией "b" обозначена зона для примесей ПФД, стрелка "с" показывает направление в область липофобных медленно выводящихся ПФОС и стрелка "d" - в область липофобных быстро выводящихся ПФОС.

Видно, что примеси ПФМЦП и примеси ПФД занимают промежуточное положение по фазовым диаграммам и критическим температурам растворения в гексане. Вследствие этого состав ПФОС в частицах эмульсии представляет смесь веществ с плавно меняющимися свойствами, что обеспечивает их полноценное взаиморастворение без образования отдельных кластеров, нарушающих однородность и стабильность частиц эмульсии.

Сущность патентуемого способа иллюстрируется фиг.2, где схематически показан гомогенизатор с первым контуром А и вторым контуром В. Первый контур А включает термостатируемый реактор 1 с высокоскоростной мешалкой 2, камеру 3 высокого

давления, переключающий клапан 4. Второй контур Б включает термостатируемый реактор 5 с высокоскоростной мешалкой 6, камеру 7 высокого давления, выходной переключающий клапан 8 и приемные емкости 9.

Процесс получения эмульсии ПФОС (PFOS) осуществляется следующим образом. В термостатируемый реактор 1 первого контура гомогенизатора заливают водный раствор стабилизирующего агента, насыщенный углекислым газом, и прогревают в течение 12-14 часов при температуре не выше 75°C. После охлаждения раствора стабилизирующего агента в него струйно подают при включенной высокоскоростной мешалке 2 смесь стерилизованных депирогенизированных ПФОС, насыщенных углекислым газом. Образующуюся грубую предэмульсию несколько раз пропускают через первую камеру 3 высокого давления при давлении 300- 400 кг/см² при постоянном поддуве углекислого газа в реактор. Затем поток предэмульсии с помощью клапана 4 направляют во второй термостатируемый реактор 5 второго контура гомогенизатора и пропускают несколько раз через вторую камеру 7 высокого давления при давлении 400-500 кг/см² до получения частиц нужного размера. Процесс гомогенизации идет при постоянном охлаждении реакторов и поддуве углекислого газа в оба реактора. Затем в реактор 5 при включенной мешалке 6 подают стерильный апиrogenный водно-солевой раствор (ASS) и после равномерного перемешивания его с эмульсией ПФОС полученную лекарственную форму эмульсии ПФОС с помощью клапана 8 направляют на розлив в приемные емкости 9.

Известно применение эмульсий перфторорганических соединений для лечения анемий различного генеза, геморрагического, травматического, ожогового, кардиогенного шока, ишемических поражений сердца и мозга, черепно-мозговой травмы, нарушений коронарного и мозгового кровотока, как высокоэффективной перфузионной среды для сохранения органов, предназначенных к трансплантации, для перфузионной и бесперфузионной противоишемической защиты миокарда при

реконструктивных операциях на сердце, для использования в аппаратах искусственного кровообращения, при региональной перфузии конечностей при проведении химио- и радио-терапии, в качестве контрастных средств при рентгенологической, ультразвуковой и ЯМР-диагностике заболеваний сосудов, в качестве средства воздействия на иммунную систему, а также при фармакологических, физиологических и биофизических исследованиях, проводимых на перфузируемых органах.

Предлагается использовать полученную нами эмульсию помимо перечисленных выше применений для лечения воздушно-жировой эмболии сосудов, облитерирующих заболеваний сосудов конечностей, для детоксикации при отравлении липофильными токсическими соединениями и для профилактики токсических поражений, вызываемых различными ксенобиотиками.

Подробное описание изобретения

Далее изобретение поясняется примерами, которые призваны продемонстрировать осуществимость изобретения, лишь в частных вариантах выполнения изобретения.

Пример 1

Приготовление предпочтительного варианта состава эмульсии ПФОС.

В термостатируемый реактор 1 заливали 1,8 л 10%-ного стерильного водного раствора стабилизирующего агента с молекулярной массой 8000 Да, насыщенного углекислым газом, прогревали в течение 12 часов при температуре 70°C и после охлаждения раствора стабилизирующего агента включали высокоскоростную мешалку 2 и двумя струями подавали 200 мл смеси стерильных апиrogenных и насыщенных углекислым газом ПФОС, состоящей из быстро выводящихся перфторуглеродов и медленно выводящихся перфтортретичных аминов, взятых в соотношении 2:1, а именно: перфтордекалина в количестве 6,0 об.% с примесями перфтометилиндана, перфтор-1-метил-3-пропилциклопексана, транс-перфториндана, перфтор-4-

оксодекалина, перфторбутилциклогексана, перфторпропилциклогексана, перфторэтилциклогексана, перфторбутил-циклопентана, цис-перфтор-1-метил-2-этил-циклогексана - всего в количестве 0,7 об.%, перфтор-N-4-(метилциклогексил)-пиперидина в количестве 2,3 об.% с примесями перфтор-N-(4-метилциклогексил)-2-метилпирролидина, перфтор-метилбутил-(4-метил-циклогексил)-амина, цис- и транс-изомеров перфторметилпропил-(4-метилциклогексил)-амина, изомеров перфторметилпропил-(метил-циклопентил)-амина и перфтор-N-(4-метилциклогексил)-1-метилпиперидина - всего в количестве 1,0 об.%, а также 0,02 об.% N-перфторалканов. Образующуюся грубую предэмульсию четыре раза пропускали через камеру 3 высокого давления первого контура гомогенизатора при давлении 350 кг/см^2 и затем пять раз через камеру 7 высокого давления второго контура гомогенизатора при давлении 450 кг/см^2 и температуре $18-22^\circ\text{C}$ и при постоянном поддуве углекислого газа. В реакторе 5 второго контура гомогенизатора полученную субмикронную эмульсию смешивали с концентрированным водно-солевым составом, так что готовая лекарственная форма эмульсии содержала 10 об.% ПФОС, 4% стабилизирующего агента, 102 мМ NaCl, 5,2 мМ KCl, 1,8 мМ MgCl_2 , 7,7 мМ NaHCO_3 , 1,65 мМ NaH_2PO_4 , и 11 мМ D-глюкозы. Готовый упакованный препарат представляет собой композицию, изоосмотичную плазме крови с осмотическим давлением 280 мОсм, вязкостью 2,5 сП, рН 7,3, при концентрации свободных ионов фтора $5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ и перекисных соединений 50 мкМ. Средний размер частиц эмульсии составил 0,07 мкм, примесь частиц с размером 0,2-0,3 мкм составляла менее 1% при компьютерном электронно-микроскопическом контроле. Величина LD_{50} для мышей при внутрибрюшинном введении - 160 мл/кг. Выживание кроликов после 5 кратного внутривенного введения по 20 мл с интервалом в 1 неделю составила 100% после 3 месяцев наблюдений. После хранения эмульсии в замороженном виде и пятикратного замораживания-оттаивания средний размер частиц эмульсии составил 0,11 мкм (таблица 4).

Пример 2

Получали эмульсию, как описано в примере 1, но при соотношении быстро и медленно выводящихся ПФОС 3:1, при содержании в составе быстро выводящихся перфторуглеродов 6,4% перфтордекалина и 1,1% примесей перфтометилиндана, перфтор-1-метил-3-пропилциклогексана, транс-перфториндана, перфтор-4-оксодекалина, а в составе медленно выводящихся ПФОС 1,8% перфтор-N-4-(метилциклогексил)-пиперидина и 0,7% примесей перфтор-N-(4-метилциклогексил)-2-метилпирролидина, перфтор-метилбутил-(4-метил-циклогексил)-амина, цис- и транс-изомеров перфторметил-пропил-(4-метилциклогексил)-амина., а также 0,01 об% N-перфторалканов. Предэмульсию пропускали три раза через камеру 3 высокого давления первого контура гомогенизатора при давлении 450 кг/см², эмульсию пропускали пять раз через камеру 7 высокого давления второго контура гомогенизатора при давлении 550 кг/см². Средний диаметр частиц полученной эмульсии ПФОС - 0,07 мкм, доля частиц диаметром 0,2-0,3 мкм составила 0,9 %. Величина LD₅₀ для мышей составляла 150 мл на кг массы тела. Получили апиrogenную эмульсию ПФОС при концентрации перекисных соединений 75 мкМ. Выживаемость кроликов после внутривенного введения 20 мл эмульсии ПФОС на кг составляла 100% в течение 90 дней наблюдений.

Эмульсию использовали для возмещения 55% кровопотери у собак и для 65% кровезамещения у крыс. Выживаемость животных составила 100%.

Пример 3

Эмульсию ПФОС получали, как описано в примере 2, и использовали в качестве перфузионного состава для консервации почки собаки в рециркуляторном режиме при нормотермической перфузии. Время сохранения почки до подъема перфузионного давления (до развития тканевого отека) составило 36 часов. В процессе перфузии эмульсию меняли каждые 9 часов. При посадке собаке реципиенту перфузируемой почки трансплантат

начал давать мочу сразу после восстановления кровотока.

Пример 4

Получали эмульсию, как описано в примере 1, но в качестве стабилизирующего агента использовали сополимер полиоксиэтилен-полиоксипропилена со средней молекулярной массой 6 тыс. Да, предэмульсию ПФОС измельчали в камере 3 первого контура гомогенизатора при давлении 500 кг/см², эмульсию измельчали в камере 7 второго контура при давлении 550 кг/см², водно-солевой состав готовой лекарственно формы эмульсии ПФОС содержал 102 мМ NaCl, 5,2 мМ KCl, 1,8 мМ MgCl₂, 7,7 мМ NaHCO₃, 1,65 мМ NaH₂PO₄, и 11 мМ D-глюкозы, 5 мМ пирувата натрия 5 мМ β-оксибутирата натрия, 5 мМ сукцината натрия, 5 мМ глутамата натрия, 5 мМ таурина. Средний диаметр частиц полученной эмульсии ПФОС - 0,06 мкм, доля частиц диаметром 0,2-0,3 мкм составила 1,1. %. Величина ЛД₅₀ для мышей - 130 мл на кг массы тела. Концентрация перекисных соединений - 100 мкМ. Эмульсию использовали для фармако-холодовой кардиоплегии. Сердце собаки выделяли в едином сердечно-легочном препарате и перфузировали охлажденной до 16°C эмульсией ПФОС в течение 30 минут. Затем сердце отключали от перфузионной системы и сохраняли погруженным в эмульсию ПФОС при температуре 6°C в течение 4-х часов, после чего подключали сердце к перфузионной системе, заполненной эмульсией ПФОС и перфузировали 15 минут при 16°C, а затем подключали к бедренным сосудам собаки реципиента. В четырех случаях из шести электрическая и сократительная активность сердца восстанавливались при трансплантации без дополнительной электростимуляции, в двух случаях после первого разряда электростимулятора. Во всех случаях не наблюдалось признаков сердечной недостаточности.

Пример 5

Способ лечения жировой и воздушной эмболии сосудов. Воздушно-жировая эмболия в эксперименте вызывалась

внутривенным введением кроликам 10 мл грубодисперсной эмульсии кукурузного масла в воде с частицами размером от 10 до 300 мкм и с мелкими пузырьками воздуха. Эксперимент выполнен на 12 животных массой 3-3,5 кг. Эмульсия ПФОС, полученная по прописи, описанной в примере 2, вводилась внутривенно через 20 минут после потери кроликом сознания или через 3-4 минуты после нарушения ритма дыхания или остановки дыхания. Лечение жировой и воздушной эмболии основано на использовании чрезвычайно большой сорбционной поверхности частиц эмульсии, относительного избытка поверхностно-активного вещества в адсорбционном слое частиц и в водной фазе, способности высокодисперсных частиц проникать в частично обтурированные сосуды и вызывать эмульгирование, размельчение и сорбцию капель жира и воздуха, в результате чего восстанавливается проходимость сосудов и массообмен. Лечебная эффективность эмульсии ПФОС проявлялась в выведении животных из комы и состояния клинической смерти, наступающей в результате остановки дыхания из-за нарушения кровотока в головном мозге животных. До окончания введения всего объема (10-15 мл на кг массы тела) эмульсии ПФОС кролики приходили в сознание, открывали глаза, восстанавливались зрачковые рефлексы. Введение эмульсии ПФОС после нарушения дыхания способствовало восстановлению равномерного дыхания животных в течение нескольких минут и обеспечивало восстановление самостоятельного дыхания в случае остановки дыхания и подключения животного к аппарату искусственной вентиляции легких.

Пример 6.

Способ лечения облитерирующего поражения сосудов конечностей. Модель облитерирующего атеросклероза создавали в результате перекармливания кроликов пищей, обогащенной продуктами с высоким содержанием холестерина. Методом ультразвуковой доплерометрии определяли реологические характеристики кровотока в конечностях, и с помощью

неинвазивных датчиков определяли динамику парциального давления кислорода (pO_2) в тканях бедра и голени задней конечности. Для сравнения лечебного эффекта использовали внутривенное введение реополиглюкина - известного реологически активного препарата. Реополиглюкин (5 мл на кг массы тела) улучшал кровоток на 10 ± 3 % и повышал тканевое pO_2 в среднем на 6 ± 2 %. После внутривенного введения эмульсии ПФОС в дозе 5 мл на кг массы тела также наблюдалось улучшение кровотока, как и после введения реополиглюкина, но при этом величина тканевого pO_2 возрастала на 25 ± 5 % ($p < 0,02$).

Пример 7

Способ лечения токсических поражений, вызванных липофильными соединениями. Эмульсию ПФОС, полученную, как описано в примере 1, использовали в качестве средства, сорбирующего липофильные соединения, поступившие в кровоток, например, этанол. Благодаря этому уменьшается их действующая концентрация и замедляется поступление в ткани. Десяти крысам массой 250-290 г ввели через рот смертельную дозу 33% водного раствора этанола в дозе 4 г этанола на кг массы тела - 8 животных погибло. Десяти крысам второй группы после введения смертельной дозы этанола внутривенно ввели эмульсию ПФОС в дозе 5 мл на кг массы тела - погибла только 1 крыса.

Пример 8.

Способ профилактики токсических поражений.

А). Эмульсию ПФОС, полученную, как описано в примере 1, использовали в качестве средства, тормозящего в ранние сроки после аккумуляции ПФОС в печени работу монооксигеназной системы печени, для уменьшения поражающего действия чужеродных ксенобиотиков, продукты метаболизма которых обладают большей токсичностью, чем исходные вещества. В эксперименте на крысах для уменьшения токсических последствий эфирного наркоза вызывали торможение детоксикационной функции печени путем внутривенного введения эмульсии ПФОС за 6 часов

до эфирного наркоза. Торможение метаболизма этилового эфира уменьшает скорость образования более токсичных, чем эфир продуктов его гидроксилирования. У крыс, не подвергавшихся предварительной обработке эмульсией ПФОС, двукратная в течение дня передозировка эфирного наркоза вызывала в течение 3-4 суток развитие выраженной жировой инфильтрации и диффузные дистрофические изменения в ткани печени. Если за 6 часов до первого эфирного наркоза животным вводили внутривенную эмульсию ПФОС в дозе 5-7 мл на кг массы тела, то последующая двукратная передозировка эфирного наркоза вызывала лишь незначительные диффузные изменения печени без развития жировой инфильтрации ткани.

Б). Эмульсию ПФОС, полученную, как описано в примере 1, использовали в качестве средства, активирующего в поздние сроки после аккумуляции ПФОС в печени работу монооксигеназной системы печени, для уменьшения поражающего действия чужеродных ксенобиотиков, продукты метаболизма которых обладают меньшей токсичностью, чем исходные вещества. В эксперименте на крысах для уменьшения токсических последствий хлороформного наркоза необходимо было ускорить метаболизм хлороформа в ткани печени. Для этого за 4 суток до хлороформного наркоза, проводимого с передозировкой вплоть до нарушения ритма дыхания, 5 крысам вводили внутривенно 7 мл эмульсии ПФОС, приготовленной как описано в примере 1. За день до хлороформного наркоза проверяли состояние печени по длительности гексеналового сна: она снижалась до 1,5-3 минут, то есть в 5-7 раз по сравнению с длительностью гексеналового сна у интактных животных, продолжавшегося 18-20 минут, что является, как ранее было показано В.В.Образцовым и соавт. [Obraztsov V., Sklifas A., Maevskii E., Shekhtman D., Kukushkin N. Is the induction of cytochrome P-450 a cause of rabbit death after injection of perfluorodecalin emulsion? // Cytochrome P-450: Biochemistry and Biophysics. 1992, INCO-TNC, Moscow, 597-600.] следствием повышения количества цитохрома P450 фенобарбитального типа в гепатоцитах в 2-3

раза. Печень животных, не получавших эмульсию ПФОС, после передозировки хлороформного наркоза имела признаки деструкции, набухания клеток и митохондрий, выраженную жировую инфильтрацию. У животных, которым за 4 дня до передозировки хлороформного наркоза вводили эмульсию ПФОС, несмотря на существенно большую дозу хлороформа, не наблюдалось значительной деструкции и жировой инфильтрации гепатоцитов. Длительность сохранения повышенной детоксицирующей активности печени примерно совпадала с периодом полувыведения быстро выводящихся ПФОС, аккумулируемых клетками печени после внутривенного введения эмульсии ПФОС,

RU 2206319 C2

RU 2206319 C2

Таблица 1

Сравнение токсичности* ПФД и ПФМЦП, различающихся по содержанию примесей, а также эмульсий, полученных из этих ПФОС.

Вид исследуемого препарата (ИП)	Соотношение среда культивирования/ИП	Концентрация ионов фтора (10^{-6} М)	Процент прироста клеток после культивирования
Среда культивирования	-	1,0	100%
Смесь высокоочищенных ПФД и ПФМЦП (по патенту РФ № 2070033)	20:1	1,0	90±10%
Смесь ПФД с примесями перфторуглеродов и ПФМЦП с примесями перфтортретичных аминов (по патентуемому изобретению)	20:1	1,0	90±12%
Эмульсия ПФОС по патенту № 2070033	10:1	4,0	70÷95%
Эмульсия ПФОС по патентуемому изобретению	10:1	5,0	70÷95%

*токсичность ПФОС оценивали по подавлению роста культивируемых трансформированных лимфоидных клеток линии Raji

Таблица 2

Сравнение токсичности различных эмульсий ПФОС по величине полулетальной дозы для мышей и по выживанию кроликов

Вид исследуемого препарата	Острая токсичность для мышей	Выживание кроликов (в %) через 180 дней после внутривенного введения исследуемых препаратов (разовая доза 20 мл на кг массы тела).	
	ЛД ₅₀ в мл на кг	Однократное введение	Двадцатикратное введение
Контроль: водно-солевой состав с 4% стабилизирующим агентом	> 200-	100,0	100,0
Эмульсия ПФД	150	0,0	*
Эмульсия ПФД/ПФТПА (соотношение 3:1)	140	10,0	*
Эмульсия ПФД/ПФМЦП (соотношение 2:1) по патенту РФ № 2070033	140	100,0	60,0
Эмульсия ПФОС по патентуемому изобретению	140	100,0	100,0

*многократное введение невозможно, так как животные гибнут после однократного введения препарата.

Таблица 3

Растворимость некоторых ПФОС в липидах оливкового масла и мембранах эритроцитов при 37° С.

Тип ПФОС	Растворимость в масле (мМ)	Растворимость в мембранах (мл на 1 кг сухих мембран)
Перфтордекалин (ПФД)	26,0	2,0
Примеси ПФД*	17,0?22,0	1,4
Перфтор-метил-N-(4-циклогексил) - пиперидин- (ПФМЦП)	7,6	0,5
Примеси ПФМЦП*	9,5?12,0	0,8
Перфтортрипропиламин	5,1	0,3
Перфтортрибутиламин	1,2	0,08

*Примеси ПФД: и примеси ПФМЦП перечислены в тексте описания предпочтительного варианта изобретения.

Таблица 4

Сравнение стабильности эмульсии по патенту РФ №2070033 и заявляемой эмульсии

Вид ПФОС в составе эмульсий	Средний размер частиц эмульсии, мкм (по данным электронной микроскопии при контрастировании уранил ацетатом)			Оптическая плотность (D на 540 мкм) после смешивания с разными концентрациями декстрана в соотношении 1:1			Вязкость, в сП
	Исходная	Через 45 дней хранения при 4°С	После 5-кратного замораживания-оттаивания	Без декстрана	3% декстран	6% декстран	
Смесь высокоочищенных ПФД и ПМЦП в соотношении 2:1	0,08 ±0,01	0,16 ±0,02	0,14 ±0,02	0,09	0,37	0,90	2,7
Смесь ПФД с примесями* и ПМЦП с примесями* в соотношении 2:1	0,08 ±0,01	0,12 ±0,01	0,11 ±0,01	0,09	0,18	0,64	2,5

*Примеси ПФД: и примеси ПФМЦП перечислены в тексте описания предпочтительного варианта изобретения.

Таблица 5

Величина нейтропенического индекса как показатель реактогенности сравниваемых образцов эмульсии ПФОС

Вид исследуемого препарата	Нейтропенический индекс (по М.В. Беркос)	
	Свежеприготовленный препарат	Через 6 месяцев хранения в замороженном виде
Эмульсия ПФОС по патенту № 2070033,	$2,5 \pm 0,3$	$4,2 \pm 0,5$
Эмульсия ПФОС по патентуемому изобретению	$1,8 \pm 0,2$	$3,0 \pm 0,4$
Контроль (водно-солевой состав с 4% стабилизирующего агента)	$1,3 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,2$

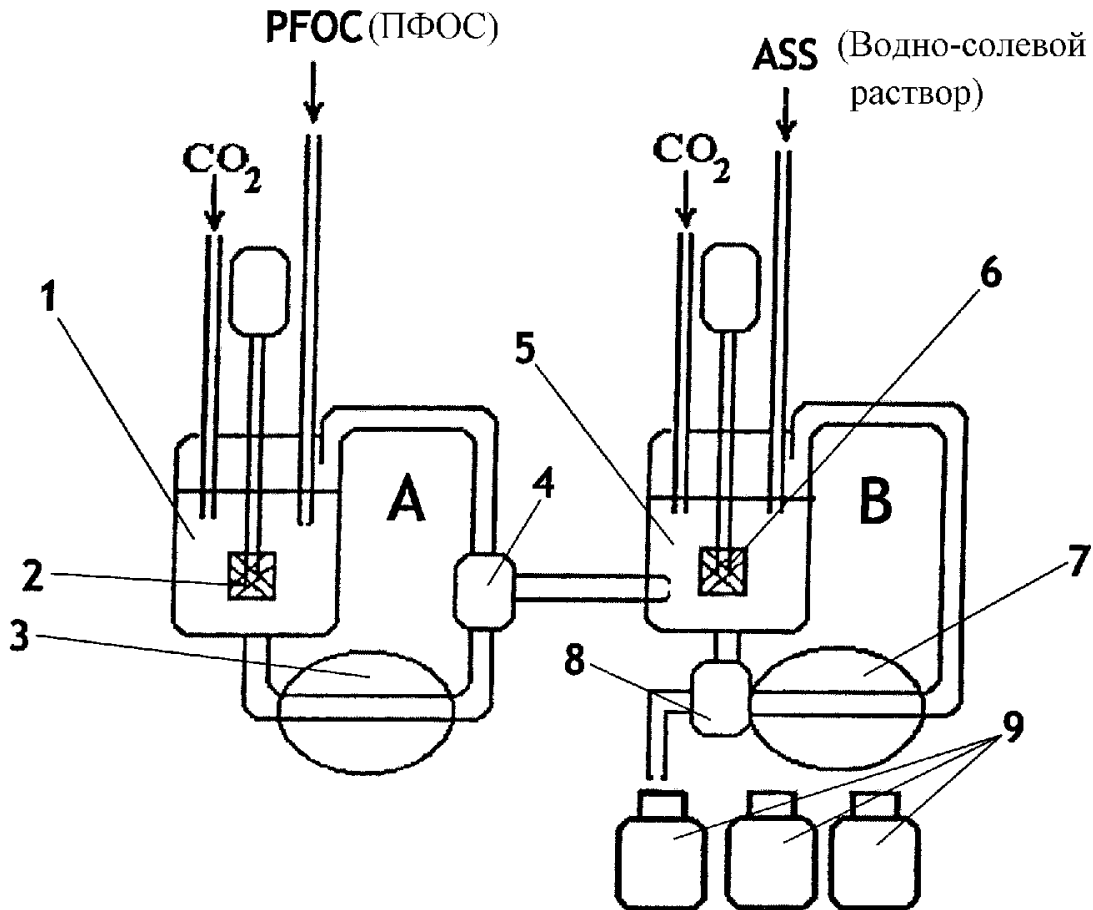
Таблица 6

Сравнение основных параметров эмульсии ПФОС по патенту РФ № 2070033 и эмульсии по патентуемому изобретению.

Сравниваемый параметр	Значения параметров и характеристик	
	По патенту РФ № 2070033	По патентуемому изобретению
Вид эмульсии ПФОС	Смесь индивидуальных высокоочищенных ПФД и ПФМЦП	Смесь ПФД и ПФМЦП с примесями быстро и медленно выводящихся ПФОС
Стоимость ПФОС	Стоимость прототипа принята за 100%	< 40% от стоимости прототипа
Операция и время получения 20 л предэмульсии	Капельное ведение ПФОС в раствор ПАВ - 180-220 мин.	Многоструйное введение ПФОС в раствор ПАВ - 15-20 мин.
Концентрация перекисных радикалов в эмульсии	$2,6 \cdot 10^{-4} \text{M}$	$2,1 \cdot 10^{-5} \text{M}$
Количество циклов рециркуляции при гомогенизации	12	Не более 9
Общее время приготовления 40 л эмульсии ПФОС	8 часов	3,5 часа
Относительная вязкость (η), сП	3,5	2,5
Средний размер частиц, мкм	$0,08 \pm 0,1$	$0,05 \pm 0,1$
Абсолютная кислородная емкость (VO_2) при $t = 25^\circ\text{C}$ и $pO_2 = 760 \text{ мм рт. ст.}$	6,9 об% ₂	6,9 об% ₂
Динамическая кислородная емкость (VO_2/η)	1,97	2,76
Время полувыведения из кровотока у крыс, час.	$6,0 \pm 0,5$	$9,5 \pm 1,0$

Промышленная применимость

Эмульсия перфторорганических соединений, согласно изобретению, предназначена для внутрисосудистого введения при возмещении кровопотерь, для лечения различных заболеваний, сопровождающихся гипоксическими или ишемическими поражениями, а также для применения в качестве контрастных и перфузионных сред.



Фиг. 2

RU 2206319 C2

RU 2206319 C2