



ESPAÑA

⑩ ES	⑪ NUMERO	⑩ A1
	449.635	
	⑫ FECHA DE PRESENTACION	
	7-7-1976	

P.- 63.489

PATENTE DE INVENCION

A1367-11
CROSS

③① PRIORIDADES:	③② FECHA	③③ PAIS
③① NUMERO		
654.964	3-2-76	E.U.A.

④⑦ FECHA DE PUBLICIDAD	⑤① CLASIFICACION INTERNACIONAL	⑥② PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	B01F	

⑥④ TITULO DE LA INVENCION
"UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR UNA EMULSION ESTABLE EN UN MEDIO ACUOSO FISIOLÓGICAMENTE ACEPTABLE DE UN COMPUESTO PERFLUOROCARBONADO"

⑦① SOLICITANTE (ES)
THE GREEN CROSS CORPORATION

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
1, 3-chome, Gamaucho, Joto-ku, Osaka, Japón

⑦② INVENTOR (ES)
Kazumasa Yokoyama, Kouichi Yamanouchi, Ryoichiro Murashina y Yoshio Tsuda

⑦③ TITULAR (ES)

⑦④ REPRESENTANTE
DON FERNANDO DE ELZABURU MARQUEZ

1 Esta invención se refiere a una emulsión de
compuesto fluorocarbonado capaz de transferir oxígeno, para
inyección y perfusión, que se usa para salvar la vida de
un paciente que sufre una hemorragia masiva, y en la conser
5 vación de órganos internos en transplantes, y a un procedi-
miento para preparar esta emulsión.

Cierto número de investigadores han indicado
ya que las emulsiones de compuestos fluorocarbonados pueden
usarse posiblemente como sustitutivo artificial de la san-
10 gre de los mamíferos, y como flúido de perfusión para la
conservación de órganos internos que hay que transplantar,
particularmente como flúido de infusión sustitutivo capaz
de transportar oxígeno [Leland C. Clark, Jr., F. Becattini
y S. Kaplan: The physiology of synthetic blood, Journal of
15 Thoracic Cardiovascular Surgery, 60, 757-773 (1970); R. P.
Geyer: Fluorocarbon-polyol artificial blood substitutes,
New England Journal of Medicine, 289, 1077-1082 (1973)].

Sin embargo, estas emulsiones no pueden consi-
derarse bastante satisfactorias para uso práctico, dada su
20 estabilidad farmacéutica y la seguridad de los animales vi-
vos. Para que las emulsiones de compuestos fluorocarbona-
dos sean apropiadas para uso práctico como sustituto arti-
ficial de la sangre, es necesario desarrollar una prepara-
ción que sea suficientemente estable para que se mantenga
25 durante un largo período de tiempo sin cambio en el tamaño
de partículas.

En las emulsiones de compuestos fluorocarbona-
dos, el tamaño de partícula tiene un papel importante en la
toxicidad y la eficacia de la emulsión [K. Yokoyama, K. Ya-
30 manouchi, M. Watanabe, R. Murashima, T. Matsumoto, T. Hama

1 no, H. Okamoto, T. Suyama, R. Watanabe y R. Naito: Prepara-
tion of perfluorodecalin emulsion, an approach to the red
cells substitute., Federation Proceedings, 34, 1478-1483
(mayo, 1975) J. Una emulsión de mayor tamaño de partículas
5 es más tóxica y de menor tiempo de retención de las partí-
culas en la corriente sanguínea. Por consiguiente, cuando
la emulsión de compuesto fluorocarbonado se destina a uso
como sustituto artificial de la sangre para salvar la vida
de un paciente que padece una hemorragia masiva, su tamaño
10 medio de partícula tiene que ser de 0,3 micras o menos de
diámetro, y preferiblemente 0,2 micras o menos Solicitud
de patente japonesa Kokai (expuesta a inspección pública)
nº 22612/73 J.

Además del tamaño de partícula, y para que la
15 emulsión de compuesto fluorocarbonado pueda usarse como sus-
titutivo artificial de la sangre, es necesario que, una vez
eliminada de la corriente sanguínea, el compuesto fluorocar-
bonado administrado por vía intravenosa sea excretado del
cuerpo tan rápidamente como sea posible. Algunos de los au-
20 tores de la presente invención habían estudiado ya la velo-
cidad de excreción y la toxicidad de varias clases de emul-
siones de compuestos fluorocarbonados y, como resultado, en-
contraron que los compuestos perfluorocarbonados de 9 a 11
átomos de carbono pueden usarse como material para un sus-
25 tituto artificial de la sangre, siendo especialmente la
perfluorodecalina el mejor de todos ellos K. Yokoyama, K.
Yamanouchi y R. Murashima: Excretion of perfluorochemicals
after intravenous injection of their emulsion, Chemical
Pharmaceutical Bulletin, 23, 1368-1373 (Junio 1975) J.

30 Además, algunos de los autores de la presente

1 invención habían encontrado también que la emulsión fina y estable de compuesto fluorocarbonado puede prepararse a partir de estos compuestos fluorocarbonados seleccionados de 9 a 11 átomos de carbono emulsionando dichos compuestos 5 fluorocarbonados con la mezcla de fosfolípidos de yema de huevo o fosfolípidos de soja y una pequeña cantidad de ácidos grasos de 8 a 22 átomos de carbono o sus sales o sus monoglicéridos [Solicitud de patente japonesa Kokai (expuesta a la inspección pública) nº 69.219/75].

10 Sin embargo, en comparación con una emulsión de perfluorotributilamina estabilizada con un emulsionante de copolímero de polioxietileno-polioxipropileno de alto peso molecular (R. P. Geyer, loc. cit.), la emulsión anterior estabilizada tanto con fosfolípidos como con ácidos 15 grasos es superior en la velocidad de excreción, pero inferior en estabilidad en la corriente sanguínea circulante después de su inyección intravenosa, siendo la vida media de aproximadamente dos terceras partes de la de la primera.

20 Además, una emulsión de compuesto fluorocarbonado preparada con un agente tensioactivo no iónico de alto peso molecular, tal como una emulsión de perfluorotributilamina, puede usarse como mezcla en cualquier proporción con los sustitutivos comerciales del plasma, tales como dextrano, o hidroxietilalmidón, o disolución de gelatina modificada, mientras que la emulsión de perfluorodecalina descrita en la Solicitud de patente japonesa Kokai (expuesta a la inspección pública) nº 69.219/75 no puede usarse en 25 combinación con dicho sustitutivo del plasma, por la formación de precipitados cuando se mezcla con estos últimos. Parece que la precipitación se debe a la destrucción de partí

1 culas emulsionadas causada por interacción entre los fosfo-
lípidos contenidos en alta concentración en la emulsión y
el sustitutivo del plasma, tal como dextrano o hidroxietil
almidón, que es una sustancia coloidal de alto peso molecu-
5 lar.

Cuando se pretende usar una emulsión de com-
puesto fluorocarbonado como flúido de infusión o sustituto
artificial de la sangre para salvar la vida de un paciente
en el caso de hemorragia masiva, el uso combinado con un
10 sustitutivo del plasma se hace importante para lograr la
isotonicidad, es decir para igualar las presiones oncóti-
cas de ambas disoluciones coloidales, es decir la emulsión
y la sangre; la emulsión de compuesto fluorocarbonado su-
ministra oxígeno, mientras que el sustitutivo del plasma
15 permite mantener el volumen de sangre en circulación en un
nivel apropiado. Por lo tanto, es preferible usar un agen-
te tensioactivo no iónico de alto peso molecular, que es
inactivo frente al sustitutivo del plasma, para preparar
una emulsión de compuesto fluorocarbonado destinada a uso
20 como sangre artificial. Aunque estos agentes tensioactivos
no iónicos de alto peso molecular son eficaces con algunos
compuestos fluorocarbonados tales como la perfluorotributi-
lamina y otros compuestos fluorocarbonados del tipo amina
como emulsionante, no son adecuados para compuestos fluoro
25 carbonados de 9 a 11 átomos de carbono, tal como la perfluoro-
rodecalina, que tienen una alta velocidad de excreción.

En estas circunstancias, en la presente inven-
ción se han realizado amplias investigaciones farmacéuticas
para preparar las emulsiones de los compuestos fluorocarbo-
30 nados de 9 a 11 átomos de carbono representados por la per-

1 fluorodecalina, que tiene una alta velocidad de excreción,
emulsiones que son estables en la corriente sanguínea y son
capaces de mezclarse con el sustitutivo del plasma sin des-
trucción alguna de las partículas emulsionadas. Como resul-
5 tado, se ha llegado a la presente invención.

Según esta invención, se proporciona una emul-
sión, estable en un medio acuoso fisiológicamente acepta-
ble, de un compuesto perfluorocarbonado capaz de transferir
oxígeno, que tiene un tamaño de partícula de aproximadamen-
10 te 0,05 a 0,3 micras, que comprende (A) al menos un compues-
to perfluorocarbonado que tiene de 9 a 11 átomos de carbono,
seleccionado del grupo que consta de perfluorodecalina,
perfluorometildecalina, perfluoroalcoholciclohexanos que
tienen de 3 a 5 átomos de carbono en el alcohol, perfluoro-
15 roalcohiltetrahidrofuranos que tienen de 5 a 7 átomos de
carbono en el alcohol, perfluoroalcohiltetrahidropiranos
que tienen de 4 a 6 átomos de carbono en el alcohol, per-
fluoroalcanos que tienen de 9 a 11 átomos de carbono; (B)
al menos una perfluoro-terc-amina que tiene de 9 a 11 áto-
20 mos de carbono seleccionada del grupo que consta de perfluoro-
terc-alcoholaminas que tienen de 9 a 11 átomos de carbono,
perfluoro-N-alcoholpiperidinas que tienen de 4 a 6 áto-
mos de carbono en el alcohol, y perfluoro-N-alcoholmorfo-
linas que tienen de 5 a 7 átomos de carbono en el alcohol;
25 un tensioactivo no iónico de alto peso molecular que tiene
un peso molecular de aproximadamente 2.000 a 20.000; un fos-
folípido; y al menos un compuesto de ácido graso seleccio-
nado del grupo que consta de ácidos grasos que tienen de 8
a 22 átomos de carbono, sus sales y monoglicéridos fisioló-
30 gicamente aceptables, siendo la proporción de dicho compues-

1 to perfluorocarbonado y dicha perfluoro-terc-amina de 95-50
a 5-50 en peso.

El "tensioactivo no iónico de alto peso mole-
cular" como se hace referencia en esta memoria, tiene un
5 peso molecular de 2.000 a 20.000, e incluye copolímeros de
polioxietileno-polioxipropileno, éteres de alcohol de
polioxietileno, y éteres de alcohol arilo de polioxietile-
no. La concentración de dicho tensioactivo en la emulsión
es de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 5,0, y preferi-
10 blemente de 3,0 a 3,5% (en peso/volumen).

La expresión "% en peso/volumen" citada en la
Memoria descriptiva y en las reivindicaciones de esta soli-
citud, significa la proporción de cantidad de un material
en peso (gramos) basada en 100 ml. de la emulsión resultan-
15 te.

Son ejemplos de los compuestos perfluorocarbo-
nados (A) que tienen de 9 a 11 átomos de carbono un per -
fluorocicloalcano o perfluoroalcoholcicloalcano, que com-
prenden, por ejemplo, perfluoro-alcoholo de C₃₋₅-ciclohexa-
20 nos tales como perfluorometilpropilciclohexano, perfluoro-
butilciclohexano, perfluorotrimetilciclohexano, perfluoro-
etilpropilciclohexano, perfluorodescalina y perfluorometilde-
calina; un perfluoro-alcohol de C₄₋₆-tetrahidropirano tal
como perfluorohexiltetrahidropirano; un perfluoro-alcohol
25 de C₅₋₇-tetrahidrofurano tal como perfluoro-pentiltetrahi-
drofurano, perfluoro-hexiltetrahidrofurano y perfluorohep-
tiltetrahidrofurano; y un perfluoroalcano que tiene de 9
a 11 átomos de carbono tal como perfluorononano y perfluoro-
decano.

30 Son ejemplos de la perfluoro-terc-amina (B)

1 que tiene de 9 a 11 átomos de carbono una perfluoro-terc-
-alcoholamina que tiene de 9 a 11 átomos de carbono, que
comprende, por ejemplo, perfluorotrialcoholaminas tales co-
mo perfluoro-N,N-dibutilmonometilamina, perfluoro-N,N-die-
5 tilpentilamina, perfluoro-N,N-dietilhexilamina, perfluoro-
-N,N-dipropilbutilamina y perfluorotripropilamina; una per-
fluoro-N,N-dialcoholciclohexilamina que tiene de 9 a 11 áto-
mos de carbono, tal como perfluoro-N,N-dietilciclohexilami-
na; una perfluoro-N-alcohol de C₄₋₆-piperidina tal como
10 perfluoro-N-pentilpiperidina, perfluoro-N-hexilpiperidina
y perfluoro-N-butilpiperidina; y una perfluoro-N-alcohol
de C₅₋₇-morfolina tal como perfluoro-N-pentilmorfolina,
perfluoro-N-hexilmorfolina y perfluoro-N-heptilmorfolina.

La proporción a emplear del compuesto perfluoro-
15 carbonado (A) a la perfluoro-terc-amina (B) es de 50-95 a
50-5 en peso, y la cantidad total de (A) y (B) contenida
en la emulsión es de alrededor de 10 a alrededor de 50%
(peso/volumen).

Los fosfolípidos usados como auxiliar de emul-
20 sificación en la invención son los usados corrientemente en
la técnica, y son preferibles los que comprenden fosfolípi-
do de yema de huevo o fosfolípido de soja. La cantidad pre-
sente en la emulsión está comprendida entre aproximadamente
0,1 y aproximadamente 1,0% (peso/volumen), y preferiblemen-
25 te alrededor de 0,4 a alrededor de 0,6% (peso/volumen).

El compuesto de ácido graso usado como auxiliar
de emulsificación es un ácido graso que tiene de 8 a 22 áto-
mos de carbono, una sal del mismo fisiológicamente acepta-
ble, tal como la sal de sodio o de potasio, o un monoglicé-
30 rido del mismo fisiológicamente aceptable, que comprende,

1 por ejemplo, los ácidos grasos ácido caprílico, ácido cá -
prico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, áci
do esteárico, ácido behénico, ácido palmitoleico, ácido
5 de sodio o de potasio o sus monoglicéridos. Estos compues-
tos de ácidos grasos pueden usarse sólo o en forma de una
mezcla de dos o más de los mismos, en una cantidad tan pe-
queña como el 0,004 al 0,1% (peso/volumen), y preferible-
mente alrededor de 0,02 a 0,04% (peso/volumen). Entre es-
10 tos compuestos de ácidos grasos, los preferibles son los
que tienen de 14 a 20 átomos de carbono y sus sales fisiológ
gicamente aceptables, y los más preferibles son el palmi-
tato de potasio y el oleato de potasio, teniendo en cuenta
su buena solubilidad y la facilidad de la preparación de la
15 emulsión.

La emulsión de compuesto fluorocarbonado de
esta invención se prepara mezclando homogéneamente las can-
tidades prescritas de los componentes antedichos en cual-
quier orden en un medio acuoso fisiológicamente aceptable,
20 tal como agua destilada, o disolución isotónica, para obte-
ner una emulsión bruta, y emulsionando después la emulsión
bruta inyectándola a una temperatura de hasta 55°C a tra -
vés de una ranura, bajo una presión de alrededor de 100
kg/cm² hasta 500 kg/cm², someténdola así a una fuerza de
25 cizalla y una acción de mezcla basada en un fuerte gradien-
te de velocidad, hasta que se obtienen el tamaño de partí-
cula deseado antes citado.

El mezclado homogéneo de los materiales usa-
dos se efectúa usando un mezclador convencional, tal como
30 un "homoblender" o un mezclador de paletas.

1 La emulsificación de la emulsión bruta se logra por medio de un homogeneizador de alta presión, que es una bomba de alta presión que homogeneiza una mezcla de dos líquidos inmiscibles por inyección a través de una ranura
5 a presión elevada y a muy alta velocidad, para dar una cizalladura y un mezclado a los líquidos. El homogeneizador típico del mercado es un homogeneizador de tipo Manton-Gaulin (Marca de fábrica de este tipo de homogeneizador, vendido por Manton-Gaulin Manufacturing Co, Inc. EE.UU.), que tiene
10 una válvula multigradual en combinación con dos o más válvulas, cada una de las cuales tiene un resorte en su interior por el que se forman las ranuras.

 La mezcla se hace circular varias veces en este tipo de homogeneizador bajo una presión total de alrededor de 500 kg/cm², para obtener así la emulsión estable de
15 la invención. La temperatura de trabajo se mantiene en un intervalo de hasta 55°C, y preferiblemente de 25 a 40°C.

 La emulsión de la presente invención tiene una fase dispersada de partículas ultrafinas cuyo diámetro es
20 menor de 0,2 micras o como máximo menor de 0,3 micras. Además, es estable, no mostrando ningún crecimiento del tamaño de partícula, aunque se caliente o se almacene durante un largo período de tiempo. Por lo tanto, la emulsión de la presente invención asegura en un grado muy elevado al animal receptor contra un efecto perjudicial debido a la aglomeración de las partículas de la emulsión.
25

 Además, la emulsión de la presente invención tiene un largo tiempo de retención en la corriente sanguínea en circulación, de modo que la capacidad de transporte
30 de oxígeno se mantiene durante un largo período.

Por ejemplo, en comparación con una emulsión de compuesto fluorocarbonado preparada usando fosfolípidos como emulsionantes según la solicitud de patente japonesa Kokai (expuesta a la inspección pública) nº 69219/75, la emulsión de la presente invención se mantiene durante un tiempo mucho mayor en la corriente sanguínea del animal. La excreción de la emulsión de la presente invención del cuerpo es mucho más rápida que la de una emulsión de perfluorotributilamina.

La emulsión de la presente invención puede usarse como fluido de infusión, después de haberse hecho fisiológicamente isotónica. Puede usarse también en forma de mezclas con sustitutivos comerciales del plasma, tales como dextrano, hidroxietilalmidón y gelatina modificada. Además, puede usarse como sustituto de la sangre para mamíferos y como líquido de perfusión para conservar órganos internos.

La presente invención se ilustra además por medio de los Ejemplos siguientes, que no han de considerarse como limitativos de la invención.

En los Ejemplos, el tamaño de partícula se midió por el método de sedimentación centrífuga propuesto por K. Yokoyama, A. Suzuki, I. Utsumi y R. Naito. [Chem. Pharm Bull. 22 (12), 2966-2971 (1974)] .

Ejemplo 1

En 8 litros de agua destilada se disolvieron 300 g de un copolímero de polioxietileno-polioxipropileno (peso molecular: 10.800). Se añadieron a la disolución 40 g de fosfolípidos de soja, 2 g de oleato de potasio, y una

1 mezcla que comprendía 3 kg de perfluorodecalina y 300 g de
perfluorotripropilamina. La mezcla resultante se agitó en
un mezclador para formar una emulsión bruta. La emulsión
bruta resultante se introdujo en el tanque de líquido de un
5 emulsionador de chorro (fabricado por Manton-Gaulin Co.) y
se emulsionó haciéndola pasar doce veces a través de una
válvula a alta presión de 200 a 500 kg/cm², manteniendo al
mismo tiempo la temperatura del líquido a 35±5°C, para efec-
tuar la emulsificación. La emulsión resultante contenía
10 30,5% (peso/volumen) de perfluorodecalina y 2,9% (peso/volu-
men) de perfluorotripropilamina. El diámetro medio de par-
tícula era de 0,09 a 0,1 micra, medido por el método de se-
dimentación centrífuga. La emulsión no mostró sustancial-
mente ningún aumento del tamaño de partículas cuando se in-
15 trodujo en una ampolla para inyección y sometida a una es-
terilización térmica a 115°C durante 12 minutos en el este-
rilizador giratorio diseñado especialmente. En la Tabla 1
se muestra la distribución de tamaños de partículas de es-
ta emulsión, y la de una emulsión de perfluorodecalina sólo
20 preparada sin usar perfluorotripropilamina.

Como se ve en la Tabla 1, cuando se almacena
a 4°C durante 6 meses, la presente emulsión no muestra nin-
guna aglomeración, quedando sustancialmente inalterado el
diámetro medio de partícula.

25 Se repitió el procedimiento anterior, excepto
en que se usó perfluoropentiltetrahidrofurano en lugar de
la perfluorodecalina, y se obtuvieron resultados similares
a los anteriores.

Ejemplo 2

5 En 8 litros de agua destilada se disolvieron 330 g de un éter polioxietilen-octílico (peso molecular medio: 3.500). Se añadieron a la disolución 40 g de fosfolípido de soja y 2 g de oleato de potasio, y la mezcla resultante se agitó en un mezclador para preparar una dispersión. Se añadió a la dispersión una mezcla que comprendía 3 kg de perfluorometildecalina y 600 g de perfluoro-N-pentilpiperidina, y la mezcla resultante se agitó en un mezclador para preparar una emulsión bruta. La emulsión bruta se emulsio-
10 nó bien del mismo modo que en el Ejemplo 1, y la emulsión resultante se introdujo en pequeñas ampollas. La ampolla que contenía la emulsión se sometió a esterilización térmica a 115°C durante 12 minutos en un esterilizador giratorio. La emulsión contenía 29,7% (peso/volumen) de perfluorometildecalina y 5,8% (peso/volumen) de perfluoro-N-pentilpiperidina. La distribución de tamaños de partículas después de la esterilización, y el diámetro medio de partícula después de un almacenamiento a 4°C durante 6 meses, así como los mismos datos de una emulsión de referencia de perfluorodecalina sola, se muestran en la Tabla 1.

Ejemplo 3

25 En 2 litros de agua destilada se disolvieron 100 g de un polioxietileno-polioxipropileno que tenía un peso molecular medio de 8.350. A la disolución resultante se le añadieron 20 g de fosfolípidos de yema de huevo y 0,5
30 g de ácido oleico, y la mezcla se agitó en un mezclador pa-

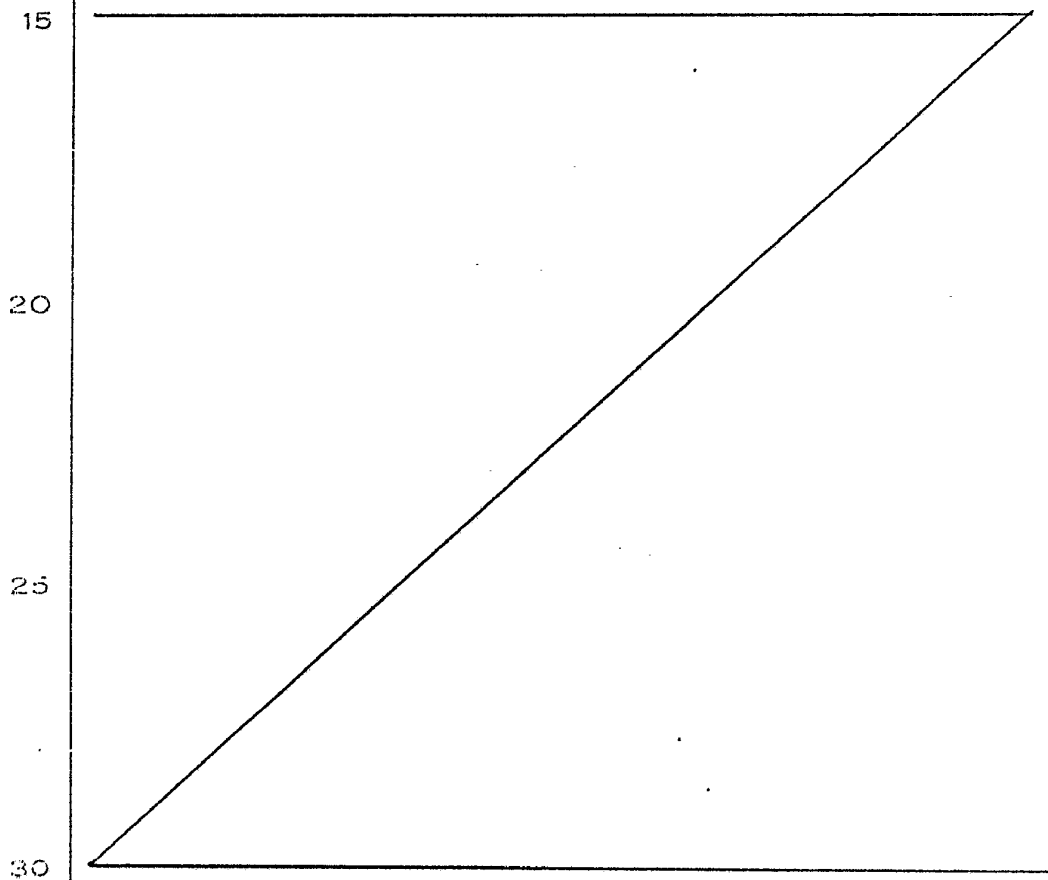
1 ra preparar una dispersión. Se añadió a la dispersión una
mezcla que comprendía 640 g de perfluorodecalina y 250 g
de perfluorodibutilmonometilamina, y la mezcla resultante
se agitó en un mezclador para obtener una emulsión bruta.
5 La emulsión bruta se emulsionó del mismo modo que en el Ejem-
plo 1 y se esterilizó por calentamiento a 115°C durante 12
min. en el esterilizador giratorio. La emulsión contenía
25,3% (peso/volumen) de perfluorodecalina y 9,8% (peso/volumen)
de perfluorodibutilmonometilamina. El diámetro medio
10 de partícula y la distribución de tamaños de partículas, y
los de una muestra de referencia de una emulsión preparada
usando perfluorodecalina sola fueron como se muestra en la
Tabla 1. En la Tabla 1 se muestra también el diámetro medio
de partícula de la emulsión de la presente emulsión (pre-
15 sente ejemplo) después de almacenarla a 4°C durante 6 me-
ses.

Ejemplo 4

20 En 800 ml de agua destilada se disolvieron 35
g de copolímero de polioxietileno-polioxipropileno que te-
nía un peso molecular medio de 15.800. Se añadieron a la
disolución 4 g de fosfolípidos de yema de huevo y 0,1 g de
monoglicérido de ácido láurico, y la mezcla resultante se
25 agitó en un mezclador para preparar una dispersión. Se añ-
dió a la dispersión una mezcla que comprendía 350 g de per-
fluorohexiltetrahidropirano y 40 g de perfluoro-N,N-dietilci-
clohexilamina, y la mezcla resultante se agitó en un mez-
clador para preparar una emulsión bruta. La emulsión bruta
30 se emulsionó después del mismo modo que en el Ejemplo 1, y

1 la emulsión resultante se subdividió en pequeñas porciones
que se introdujeron en ampollas. La ampolla que contenía
la emulsión se sometió a esterilización térmica a 115°C du-
rante 12 min. en un esterilizador giratorio. La emulsión
5 contenía 35,7% (peso/volumen) de perfluorohexiltetrahidro-
pirano, y 4,1% (peso/volumen) de perfluoro-N,N-distilciclo
hexilamina.

El diámetro medio de partícula de la emulsión
del presente ejemplo, y el de una muestra de referencia de
10 una emulsión preparada usando perfluorohexiltetrahidropira-
no sólo, después de la esterilización, se muestran en la
Tabla 1. La emulsión del presente ejemplo no mostró ningún
cambio del tamaño de partícula después de almacenarla a
15 4°C durante 6 meses.



30 25 20 15 10 5 1

Tabla 1. Distribución de tamaños de partículas de diversas emulsiones

Ejemplo nº	Compuesto fluorocarbonado (A) % (peso/volumen)	Perfluoro-terc-amina (B), % (peso/volumen)	Emulsionante % (peso/volumen.)
1	Perfluorodecalina 30,5	Perfluorotripropil amina 2,9	A ₁ * 3,0
		30	A ₁ * 3,0
2	Perfluorometil- decalina 29,7	Perfluoro-N-pen tilpiperidina 5,8	B * 3,3
		30	B * 3,3

Tabla 1 (continuación)

Auxiliar de emulsificación, % (peso/volumen)	Diámetro medio de partículas, micras		Distribución de tamaños de partículas tras esterilización, % en peso		
	Tras la esterilización	Tras almacenam. (4°C, 6 meses)	< 0,1 μ	0,1 - 0,2 μ	> 0,3 μ
Fosfolípidos de soja 0,4	0,097	0,099	58,3	39,1	2,6
Oleato de K 0,02					
Fosfolípidos de soja 0,4	0,395	> 0,4	3,9	11,7	24,1
Oleato de K 0,02					
Fosfolípidos de soja 0,4	0,088	0,090	63,6	35,9	0,5
Oleato de K 0,02					
Fosfolípidos de soja 0,4	0,273	> 0,4	10,6	20,5	42,0
Oleato de K 0,02					

30

25

20

15

10

5

Tabla 1 (continuación)

3	Perfluoro- decalina	25,3	Perfluorodibutil monometilamina 9,8	A ₂ *	4,0
			25	-	A ₂ *
4	Perfluorohexil- tetrahidropirano	35,7	Perfluoro-N,N-die- tilciclohexilamina 4,1	A ₃ *	3,5
			35	-	A ₃ *

Nota: A * : Copolímero de polioxi-etileno-polioxi-propileno. Peso molecular medio:
A₁ 10.800; A₂ 8.350; A₃ 15.600.

B : Eter de polioxi-etileno-uctílico. Peso molecular medio: 3.500

30 25 20 15 10 5 1

Tabla 1 (continuación)

Fosfolípidos de yema de huevo 0,8	0,090	0,091	61,9	37,2	0,9	0
Acido oleico 0,02						
Fosfolípidos de yema de huevo 0,8	0,245	>0,4	11,9	18,7	46,4	23,0
Acido oleico 0,02						
Fosfolípidos de yema de huevo 0,4	0,102	0,112	49,0	43,2	7,8	0
Monoglicérido de ácido láurico 0,01						
Fosfolípidos de yema de huevo 0,4	0,298	>0,4	9,3	18,6	25,4	46,7
Monoglicérido de ácido láurico 0,01						

1 Ejemplo experimental 1

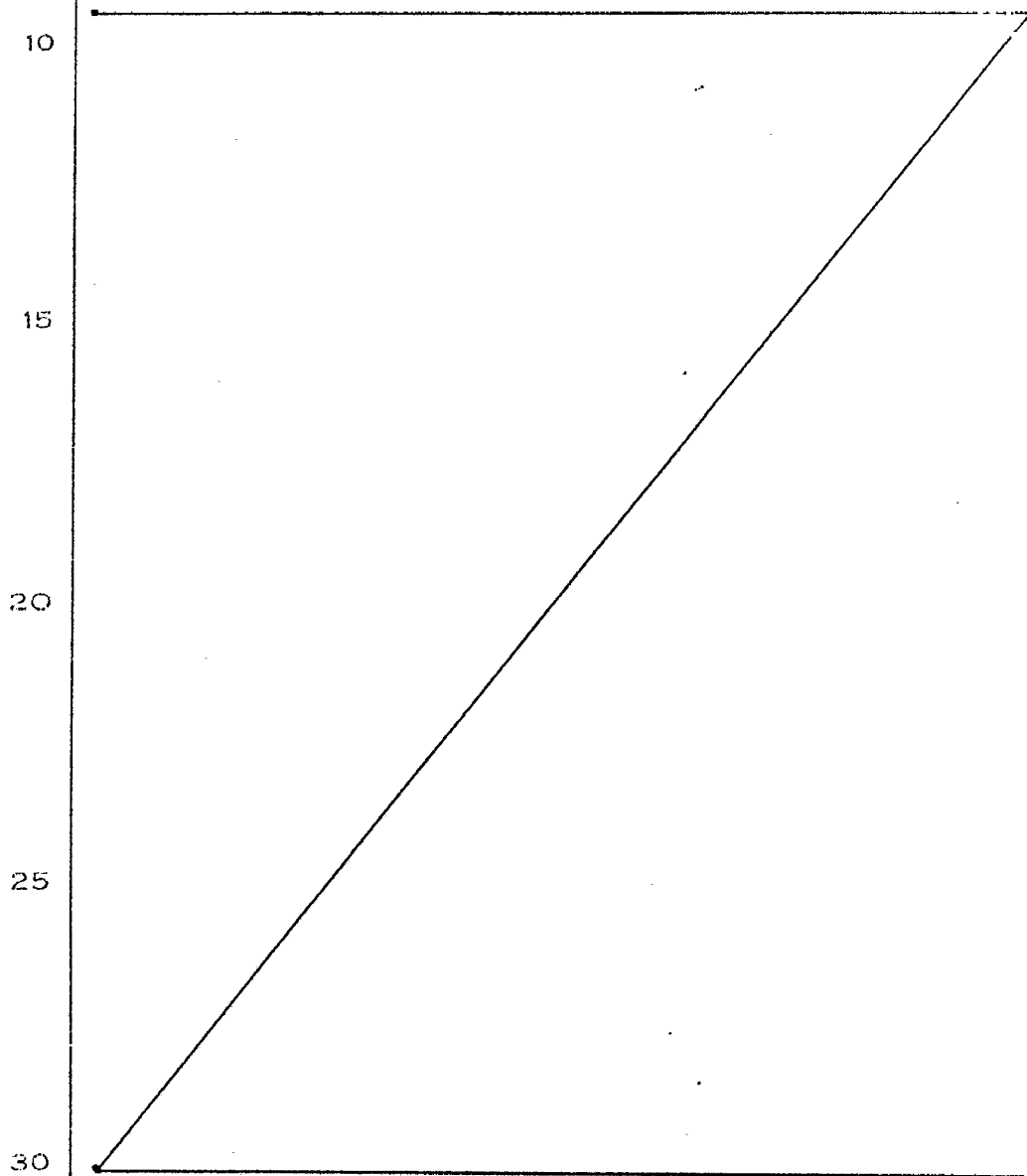
Ensayo de mezcla con un sustituto de plasma.

Para el uso clínico como fluido de infusión,
5 la emulsión de la presente invención se usa preferiblemente en combinación con un sustituto de plasma para reponer la deficiencia de presión oncótica. Cuando la emulsión de la presente invención se mezcló con un sustituto del plasma, no se detectó la precipitación reversible que pudo causarse
10 por interacción entre ambas disoluciones coloidales, lo que indicaba que se había eliminado una de las dificultades que podían encontrarse al usar la emulsión de la presente invención como fluido de infusión.

Las emulsiones usadas en el experimento eran
15 emulsiones de perfluorodecalina-perfluoro-N,N-dibutilmetilamina (5:2) de diversas concentraciones, preparadas del mismo modo que en el Ejemplo 3 (copolímero de polioxietileno-polioxipropileno, 3,4% (peso/volumen); fosfolípidos de yema de huevo, 0,6% (peso/volumen); oleato de potasio, 0,04%
20 (peso/volumen)), y, como referencia, emulsiones de perfluorodecalina de diversas concentraciones, preparadas según la Solicitud de patente japonesa Kokai (expuesta a la inspección pública) nº 69219/75 [Fosfolípido de yema de huevo, 4% (peso/volumen); oleato de potasio, 0,02% (peso/volumen)].
25 Todas las emulsiones se hicieron isotónicas con la disolución de Ringer lacteada o la disolución de bicarbonato de Krebs-Ringer, y después se mezclaron, cada una, con un sustitutivo del plasma, de modo que la concentración final de este último fuera de 1 a 6% (peso/volumen), y se observó visualmente la formación de precipitados durante 6 horas des-
30

1 pués de mezclar a temperatura ambiente. Los substitutivos
del plasma usados son hidroxietilalmidón (HES) (peso mole-
cular medio: 200.000, 20% en peso/volumen en disolución sa-
lina, suministrado por Ajinomoto Co., Ltd) y Dextran 40
5 $\bar{\Delta}$ dextrano, peso molecular medio 40.000, 10% (peso/volumen)
en disolución salina en agua, suministrado por The Green
Cross Corp. J.

Los resultados se muestran en las Tablas 2 y 3.



1
5
10
15
20
25
30

Tabla 2

Concentración final de comp. fluorocarbonado, % en peso/volumen	Emulsión de la invención			Emulsión de la Solic. de pat. jap. expuesta a inspec. pública Nº 69219/75		
	10 %	20 %	30 %	10 %	20 %	30 %
0,5	-	-	-	-	-	-
1,0	-	-	-	-	-	+
1,5	-	-	-	+	+	+
2,0	-	-	-	+	+	+
2,5	-	+	+	+	+	+
3,0	+	+	+	+	+	+

100
100
100
100
100
100

1
5
10
15
20
25
30

Tabla 3

Contenido final de comp. fluorocarbonado, % en peso/volumen	Emulsión de la invención			Emulsión de la Solic. de pat. jap. expuesta a inspec. pública Nº 69219/75		
	10 %	20 %	30 %	10 %	20 %	30 %
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	+
3	-	-	-	-	+	+
4	-	-	-	+	+	+
5	-	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+

Nota: - : no precipita
+ : formación de precipitados.

1 En los resultados obtenidos se pone de mani -
fiesto que la emulsión de la presente invención es afecta-
da mucho menos por la presencia de un sustitutivo del plas-
ma en comparación con la emulsión según la Solicitud de pa-
5 tente japonesa Kokai (expuesta a la inspección pública) Nº
69219/75, lo que indica que la emulsión de la presente in-
vención puede mezclarse con el Dextran 40 y la preparación
de HES para lograr la isotonicidad coloidal fisiológica
que se obtiene por adición de Dextran 40 y HES, en una con-
10 centración final de 2% (peso/volumen) y 3% (peso/volumen),
respectivamente.

 Se encontraron también resultados similares a
los citados antes en las emulsiones preparadas en los Ejem-
plos 1, 2 y 4.

15 Ejemplo experimental 2

 Para evaluar la eficacia de la emulsión de la
presente invención se hizo un estudio de transfusión de in-
20 tercambio en ratas.

 En este experimento se usaron dos clases de
emulsión de compuesto fluorocarbonado, que fueron la emul-
sión de la presente invención, la mezcla de perfluorodecali-
na y perfluorodibutilmonometilamina preparada en el Ejemplo
25 3, y la emulsión de perfluorodecalina estabilizada con fos-
folípidos de yema de huevo según la Solicitud de Patente Ja-
ponesa Kokai (expuesta a la inspección pública) Nº 69219/75.

 Los ingredientes de ambas emulsiones se mues-
tran en la Tabla 4.

30 Para hacer el electrolito de la emulsión y lo-

5
10
15
20
25
30

grar la isotonicidad coloidal, un volumen de disolución de electrolitos hipertónica como se muestra en la Tabla 4 se añade a 9 volúmenes de la emulsión, y después 1 volumen de la emulsión resultante que contenía electrolitos se mezcló con 3 volúmenes de hidroxietilalmidón (peso molecular 40.000-50.000) al 6% en disolución de Ringer lacteada o plasma de rata como referencia, antes de su uso.

Las ratas (raza Wister, que pesaban 200 a 250 g) se sometieron a transfusión de intercambio con la emulsión que contenía electrolitos e hidroxietilalmidón o plasma por sangría repetida de la arteria carótida y transfusión de sustitución a través de la vena del rabo alternadamente hasta un valor hematocrito de 1%, 4% y 7% respectivamente, bajo la atmósfera de 100% de oxígeno.

Después se determinaron los tiempos de supervivencia de las ratas sometidas a la transfusión de intercambio.

Los resultados se muestran en la Tabla 5. Como se deduce de la Tabla 5, la emulsión de la presente invención era mucho más eficaz para salvar la vida de un animal que sufría una hemorragia masiva que la emulsión de perfluorodecalina estabilizada con fosfolípidos de yema de huevo.

Tabla 4

Ingrediente		Emulsión de la presente invención	Emulsión según la solici- tud de Pat. Jap. (exp. a la insp. públi- ca) Nº 69219/75.
Emulsión fluorocar- bonada (9 vol.)	Compuesto fluorocarbo- nado	Perfluorodecalina Perfluorodibutil- monometilamina	28% (peso/volumen)
	Tensioac- tivo	Pluronic F68 * Fosfolípido de ye- ma de huevo Oleato de potasio	- - 4,0 0,02
Electro- lito (1 vol.)		NaCl NaHCO ₃ KCl Lactato de sodio MgCl ₂ ·6H ₂ O CaCl ₂ ·2H ₂ O D-glucosa	6,00 - 0,336 3,10 0,427 - 1,0
			25,3% (peso/ vol.)
pH		8,0	6,0

* Copolímero de polioxi-etileno-polioxi-propileno (P. molec. 8350).

30 25 20 15 10 5 1

Tabla 5

	Valor hemato- crito final, %	Conjuntamente con plasma		Conjuntamente con HES	
		Tiempo de supervivencia			
Emulsión de la presente invención	7 4 1	> 72 horas 50 00 min 29 02	> 72 horas > 72 61 00 min		
Emulsión según la Solic. de pat. jap. (exp. a insp. pú- blica) Nº 69219/75	7 4 1	23 horas 10 min 11 5 8 10	5 horas 53 min 5 2 2 56		

Nota: los valores se han obtenido con 5 ratas
en cada grupo.

1 Ejemplo experimental 3

5 La emulsión del compuesto fluorocarbonado de la presente invención obtenida en el Ejemplo 3, y la emulsión obtenida según la Solicitud de Patente japonesa Kokai (expuesta a inspección pública) Nº 69219/75, se sometieron a ensayo de toxicidad aguda.

10 Para hacer isotónica la emulsión, se añade un volumen de electrolitos a 9 volúmenes de la emulsión antes de usarla. Los ingredientes de estas emulsiones se mostraron en la Tabla 4. Como animales de ensayo se usaron ratas macho de raza wistar que pesaban de 100 a 120 g. Se inyectó a las ratas la emulsión por vía intravenosa, y se observó la proporción de supervivencia durante una semana después de la inyección. Los resultados obtenidos se indican en la Tabla 6. Como se ve en esta tabla, la LD₅₀ (dosis letal media) de ambas emulsiones era de alrededor de 130 ml/kg. de peso corporal, lo que indica que son muy poco tóxicas.

20

25

30

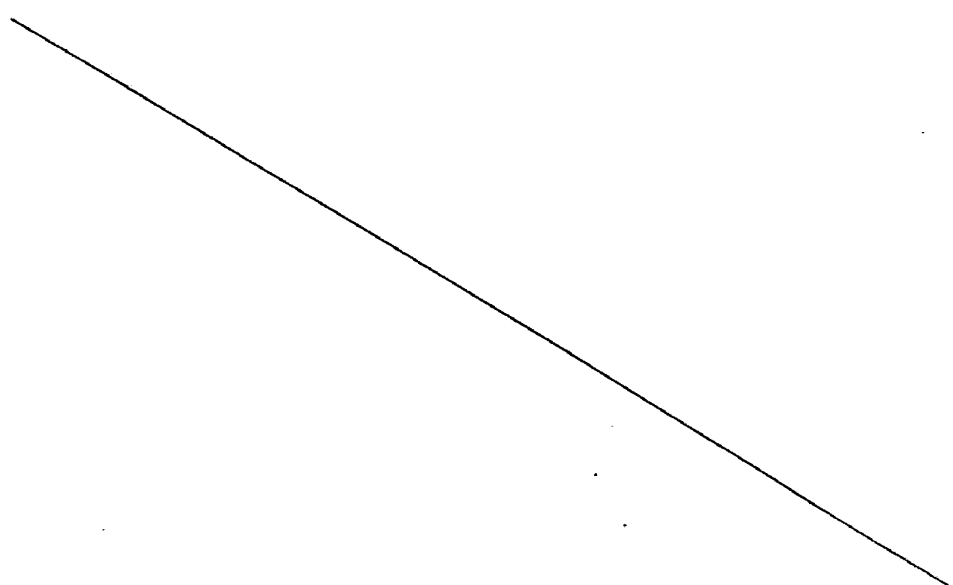


Tabla 6. Toxicidad aguda de la emulsión de comp. fluorocarbonado

Muestra	Dosis, ml/kg	Proporción de supervivencia: Número de ratas que sobreviven							LD ₅₀ (al cabo de 1 semana)
		Número de ratas ensayadas							
		Días después de la inyección							
		1	2	3	5	7			
Emulsión de la presente inyección	87	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10		
	100	10/10	10/10	9/10	9/10	9/10	9/10		
	115	10/10	9/10	8/10	8/10	8/10	7/10		
	132	9/10	8/10	6/10	6/10	6/10	6/10		
	152	6/10	4/10	3/10	3/10	3/10	1/10	135 ml/kg	

(Continúa)

1
5
10
15
20
25
30

Tabla 6 (conclusión)

Emulsión según la Solicitud de Pat. jap. exp. a inspección pública Nº 69219/75	87	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
	100	10/10	10/10	9/10	9/10	9/10
	115	10/10	9/10	9/10	7/10	7/10
	132	9/10	8/10	7/10	6/10	5/10
	152	7/10	6/10	4/10	3/10	1/10
131 ml/kg						

1 Ejemplo experimental 4

5 Para examinar el efecto hemolítico de las preparaciones fluorocarbonadas en el sistema de circulación extracorpórea, se efectuaron experimentos in vitro usando hematíes de conejo.

10 Dos preparaciones de emulsión usadas en el Ejemplo experimental 2, como se muestran en la Tabla 4, se mezclaron con una disolución de Ringer lactada, para hacer las sustancialmente isotónicas fisiológicamente. Las preparaciones en emulsión isotónicas resultantes se mezclaron con la sangre de conejo heparinizada en una relación de 3:1, 1:1 y 1:3, para preparar disoluciones de muestra para los ensayos. El efecto hemolítico se evaluó midiendo el

15 contenido de hemoglobina libre de 8 ml. de la sangre después de haber sido mantenidos a 37°C durante 6 horas. La determinación de la hemoglobina hemolizada se hizo por el método de la cianometahemoglobina E. J. Kampen y W. J. Ziilstram, Clin. Chim. Acta, 6, 538, 1961).

20 Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7.

25

30

Como puede deducirse de la Tabla 7, el efecto hemolítico de la emulsión de la presente invención es mucho más pequeño que el de la técnica anterior, y no muy diferente del de la disolución de Ringer lacteada usada como referencia.

- REIVINDICACIONES -

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

1ª.- Un procedimiento para preparar una emulsión estable en un medio acuoso fisiológicamente aceptable de un compuesto perfluorocarbonado que puede transferir oxígeno que tiene un tamaño de partícula de aproximadamente 0,05 a 0,3 micras, que comprende mezclar homogéneamente (A) al menos un compuesto perfluorocarbonado que tiene de 9 a 11 átomos de carbono seleccionado del grupo que consta de perfluorodecalina, perfluorometildecalina, perfluoroalcoholciclohexano que tiene de 3 a 5 átomos de carbono en el alcohol, perfluoroalcoholtetrahydrofurano que tiene de 5 a 7 átomos de carbono en el alcohol, y perfluoroalcoholtetrahidropirano que tiene de 4 a 6 átomos de carbono en el alcohol, perfluoroalcanos que tienen de 9 a 11 átomos de carbono, (B) al menos una perfluoro-terc-amina que tiene de 9 a 11 átomos de carbono, seleccionada del grupo que consta de perfluoro-terc-alcoholamina que tiene de 9 a 11 átomos de carbono, perfluoro-N-alcoholpiperidina que tiene de 4 a 6 átomos de carbono en el alcohol, y perfluoro-N-

5 -alcohilmorfolina que tiene de 5 a 7 átomos de carbono en el alcohol; un tensioactivo no iónico de alto peso molecular que tiene un peso molecular de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 20.000; un fosfolípido, y al menos un com-
puesto de ácido graso seleccionado del grupo que consta de
10 ácidos grasos que tienen de 8 a 22 átomos de carbono, sus sales y monoglicéridos fisiológicamente aceptables, siendo la proporción de dicho compuesto perfluorocarbonado (A) y de dicha perfluoro-terc-amina (B) de 95-50 a 5-50 en peso, en dicho medio acuoso fisiológicamente aceptable, para obtener una emulsión bruta, y después emulsionar la emulsión bruta inyectándola, a una temperatura de hasta 55°C, a través de una ranura bajo una presión de aproximadamente 100 kg/cm² a 500 kg/cm², sometiéndola así a una fuerza de cizalla y a una acción de mezclado basada en un fuerte gradiente de velocidad, hasta que el tamaño de partículas del compuesto perfluorocarbonado en la emulsión resultante llega a ser de 0,05 a 0,3 micras.

20 2ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que el compuesto perfluorocarbonado (A) es perfluoroalcohilciclohexano que tiene de 3 a 5 átomos de carbono en el alcohol, perfluorodecalina o perfluorometildecalina.

25 3ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que el compuesto perfluorocarbonado (A) es un perfluoroalcohiltetrahidropirano que tiene de 4 a 6 átomos de carbono en el alcohol, un perfluoroalcohiltetrahidrofurano que tiene de 5 a 7 átomos de carbono en el alcohol, una perfluoroalcohilpiperidina que tiene de 4 a 6 átomos de carbono en el alcohol, o una perfluoroalcohilmorfolina que
30

tiene de 5 a 7 átomos de carbono en el alcohol.

4ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que la perfluoro-terc-amina es una perfluoro-terc-alcoholamina.

5

5ª.- Un procedimiento según la reivindicación 4ª, en el que la perfluoro-terc-amina es perfluoro-N,N-dibutilmetilamina, perfluoro-N,N-dietilpentilamina, perfluorodietilhexilamina, perfluorodipropilbutilamina, perfluorotripropilamina o perfluoro-N,N-dietilciclohexilamina.

10

6ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que el medio acuoso fisiológicamente aceptable es agua o disolución isotónica.

15

7ª.- Un procedimiento según la reivindicación 6ª, en el que la disolución isotónica es disolución de Ringer lacteada o una disolución de Ringer que contiene glucosa.

20

8ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que la suma de la proporción del compuesto perfluorocarbonado y la perfluoro-terc-amina es de 10 a 50% (peso/volumen), la proporción del tensioactivo no iónico de alto peso molecular es de 2,0 a 5,0% (peso/volumen), la del fosfolípido es de 0,1 a 1,0% (peso/volumen), y la del compuesto de ácido graso es de 0,004 a 0,1% (peso/volumen).

25

9ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que la relación en peso del compuesto perfluorocarbonado (A) a la perfluoro-terc-amina (B) presentes en la emulsión es de 50-95:50-5.

30

10ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que el compuesto de ácido graso es ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido

behénico, ácido palmitoleico, ácido oleico, ácido linoleico o ácido araquidónico.

5 11ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que el ácido graso es una sal de metal alcalino de un ácido graso seleccionado de entre ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido behénico, ácido palmitoleico, ácido oleico, ácido linoleico y ácido araquidónico.

10 12ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que la sal de metal alcalino del ácido graso es oleato de potasio u oleato de sodio.

13ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que la sal de metal alcalino del ácido graso es palmitato de potasio o palmitato de sodio.

15 14ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que el compuesto de ácido graso es un monoglicérido de un ácido graso seleccionado de entre ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido behénico, ácido palmitoleico, ácido oleico, ácido linoleico y ácido araquidónico.

20 15ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que el fosfolípido está constituido por fosfolípidos de yema de huevo o fosfolípidos de soja.

25 16ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que la emulsión se hace isotónica con la sangre en su presión oncótica por adición de plasma o de un sustitutivo del plasma.

30 17ª.- Un procedimiento según la reivindicación 16ª, en el que el sustitutivo del plasma es hidroxietilalmidón, gelatina modificada o dextrano.

5 18ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que el tensioactivo no iónico de alto peso molecular es un copolímero de polioxietileno-polioxipropileno que tiene un peso molecular de 2.000 a 20.000, un éter polioxietilen-alcohólico que tiene un peso molecular de 2.000 a 20.000, ó un éter polioxietilen-alcohilarílico que tiene un peso molecular de 2.000 a 20.000.

10 19ª.- Un procedimiento según la reivindicación 18ª, en el que el copolímero de polioxietileno-polioxipropileno tiene un peso molecular de 8.350 a 15.800.

20ª.- Un procedimiento según la reivindicación 18ª, en el que el éter polioxietilen-alcohólico es éter polioxietilen-octílico que tiene un peso molecular de 3.500.

15 21ª.- UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR UNA EMULSION ESTABLE EN UN MEDIO ACUOSO FISIOLÓGICAMENTE ACEPTABLE DE UN COMPUESTO PERFLUOROCARBONADO.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y con los fines que se han especificado.

20 Esta Memoria consta de treinta y siete hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 06.OCT.1976

P.A.

25 **Fernando de Elizaburu**
Por Poder

MTS.