

(11) *Número de Publicação:* PT 92163 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
G01N033/94 A

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1989.10.31	(73) <i>Titular(es):</i> SCHWARZ PHARMA AG ALFRED-NOBEL-STRASSE 10 D-4019 MONHEIM DE
(30) <i>Prioridade:</i> 1988.11.01 US 265749	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1990.05.31	(72) <i>Inventor(es):</i> SUDHAKAR WAGLE US BRIAN WILGER US
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 03/95 1995.03.14	(74) <i>Mandatário(s):</i> JORGE BARBOSA PEREIRA DA CRUZ RUA DE VÍTOR CORDON 10-A 3/AND. 1200 LISBOA PT
(54) <i>Epígrafe:</i> PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO MDM LIOFILIZADA	
(57) <i>Resumo:</i>	

[Fig.]



92.163

MEMÓRIA DESCRITIVA

Resumo

O presente invento diz respeito a um processo para a preparação de uma composição "Minor Determinant Mixture" (MDM) liofilizada, estável à armazenagem, que pode ser reconstituída com água para dar uma solução que é usada para detectar alergia ou hipersensibilidade a penicilinas, compreendendo ácido benzilpenilóico, benzilpenicilina; ácido benzilpenicilóico em que pelo menos cerca de 94,5% do ácido benzilpenicilóico é o estereoisómero ácido (5R,6R)-benzil-D-penicilóico, um sal de metal alcalino; uma substância tampão de pH e uma quantidade de água criticamente baixa.

=====

SCHWARZ PHARMA AG.

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO MDM LIOFILIZADA"

No processo do invento são preparados uma solução aquosa de ácido benzilpenilóico, um sal de metal alcalino e uma substância tampão de pH. O ácido benzilpenilóico nesta solução é neutralizado com hidróxido de sódio aquoso. Enquanto se mantém esta solução a uma temperatura cerca de 0°C até cerca de 5°C, são realizados os seguintes passos Primeiro, a benzilpenicilina e o ácido benzilpenicilóico são dissolvidos na solução. O ácido benzilpenicilóico na solução é neutralizado com hidróxido de sódio aquoso. Em seguida, o pH fisiológico. Esta solução é depois filtrada sob condições esterilizadas. Depois da realização destes processos em que a solução foi mantida a uma temperatura de cerca de 0°C até cerca de 5°C, a solução é conseguida e congelada em recipientes desidratantes. Depois da congelação, a solução congelada é liofilizada.

DOMÍNIO DO INVENTO

O presente invento refere-se a composições usadas para detectar alergia ou hipersensibilidade às penicilinas e a métodos para a sua preparação. Mais especificamente, o presente invento refere-se a uma composição MDM liofilizada, estável ao armazenamento que pode ser reconstituída com água e que é usada para detectar alergia ou hipersensibilidade às penicilinas. O invento refere-se também ao método de preparação desta composição.

BASE DO INVENTO

Infelizmente, o útil antibiótico penicilina induz reacções alérgicas em doentes com alergia ou hipersensibilidade à penicilina. Frequentemente, estas reacções podem ser severas. Nos piores casos, a penicilina induz choque anafilático resultando na morte devido a colapso cardiovascular arritmia ventricular ou obstrução respiratória. Noutros casos menos severas, mas ainda também casos sérios, a penicilina induz anafilaxia não fatal e reacções urticárias causando borbulhas espalhadas, dificuldades na respiração, câimbras no abdómem, desmaio, hipotensão ou arritmia.

A incidência de alergia ou hipersensibilidade às penicilas é significativa. Médicos e investigadores estimam que até 10% de todos os doentes tratados com penicilina irão sofrer uma reacção alérgica. Destas, 10% são ameaças à vida. Ocorrem reacções imediatas, ou anafilaxia, em 0,01% de todos os doentes tratados com penicilina. Destas, 9% das reacções alérgicas de anafilaxia provam ser fatais. Mesmo

doentes sem história de alergia ou hipersensibilidade à penicilina estão em risco, pois ocorreram reacções de urticária em 4,5% destes doentes.

A alergia ou hipersensibilidade à penicilina tem sido o principal factor que limita a utilidade desta medicação por outro lado benéfica. Durante muitos anos, se um doente tinha uma história de alergia ou hipersensibilidade à penicilina, os médicos designariam aquele doente como "alérgico à penicilina" e retirariam a penicilina daquele doente durante toda a sua vida. Em vez de receitar penicilina, os médicos tratariam um destes doentes com antibióticos alternativos.

Apesar da disponibilidade de muitos agentes anti-microbianos novos, a penicilina é ainda o medicamento de escolha em algumas situações clínicas. Por exemplo, os antibióticos alternativos são muito menos eficazes e menos toleráveis do que a penicilina para o tratamento de sífilis na mulher grávida. Como outro exemplo, os antibióticos alternativos não são tão bem sucedidos como a penicilina para o tratamento de endocardite bacteriana.

Nas duas últimas décadas, os médicos e investigadores descobriram que a alergia ou hipersensibilidade podem ser sobre-diagnosticsadas. Se assim é, então muitos doentes considerados como "alérgicos à penicilina" podem na realidade tomar esta medicação com segurança sem experimentarem uma reacção grave.

Portanto, por todas estas razões, o mundo da medicina tem investigado muito para encontrar um método seguro para detectar alergia ou hipersensibilidade à penicilina.

O mecanismo químico pelo qual a penicilina desencadeia reacções alérgicas em doentes com aler-

gia ou hipersensibilidade, e o estado do campo em testes da pele de "arranhadela" e "intradérmica" para detectar tal alergia ou hipersensibilidade, é extensivamente apresentado na literatura. As citações que se seguem pretendem ser apenas representativas e fornecem uma base técnica útil no domínio do invento:

1. Ressler C., Mendelson L.M.: "Skin test for diagnosis of penicillin allergy - current status". Annals of Allergy 1987; 59:167.
2. Levino B. B., Zolov D.M.: "Prediction of penicillin allergy by immunological tests". J. Allergy 1969; 43:231.
3. Adkinson N.F. Jr., Thompson W.L., Maddrey W.C., e colaboradores: Routine use of penicillin skin testing as an in-patient service". N. Engl. J. Med. 1971; 285:22.
4. Chandra R.K., Joglekar S.A. Tomas E.; "Penicillin allergy". Arch. Dis. Child 1980; 55:857.
5. Mendelson L.M., Ressler C., Rosen J.P. e colaboradores: Routine elective penicillin allergy skin testing in children and adolescents: study of sensitization". J. Allergy Clin. Immunol. 1984; 73:76.
6. Adkinson, N.F. Jr.: Private Communication, 1981.
7. Green G.R., Rosenblum A.H., Sweet L.C.: "Evaluation of penicillin hypersensitivity: value of clinical history and skin-testing with penicilloylpolylysine and penicillin". G. J. Allergy Clin. Immunol. 1988; 60: 339.
8. Sullivan T.J., Wedner H.J., Shatz G. S., e colaboradores: "Skin testing to detect penicillin allergy." J. Allergy Clin. Immunol. 1981; 68: 171.
9. Solley G. O., Gleich G. J., Van Dellen R. G.: "Penicillin allergy: clinical experience with a battery of skin-test reagents". J. Allergy Clin. Immunol. 1982; 69:238.
10. Warrington R. J., Simons F. E. R. Ho H. W., e colaborado-

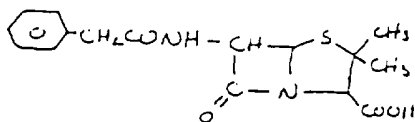
- res: "Diagnosis of penicillin allergy by skin testing: the Menitoba experience." Can. Med. Assoc. J. 1978; 118-787.
11. Van Dellen R. G., Walsh W. E., Peters G. A., e colaboradores : " Differing patterns of wheal and flare skin reactivity inpatients allergic to the penicillins". J. Allergy 1971; 47: 230.
 12. Sogn D. D., Casale T. B., Condemi J. J., e colaboradores "Interim results of the NIAID collaborative clinical trial of skin testing with major and minor penicillin derivatives in hospitalized adults." (abstract) J. Allergy Clin. Immunol. 1983; 71 (suppl): 147.
 13. Kerns D. L., Shira J. E., Go S. e colaboradores "Ampicillin rash in children: relationship to penicillin allergy and infectious mononucleosis." Am. J. Dis. Child 1973; 125: 187.
 14. Levine B. B., Ovary Z.: "Studies on the mechanism of the formation of the penicillin antigen. III. The N-(D-a-benzylpenicilloyl) group as an antigenic determinant responsible for hypersensitivity to penicillin" G. J. Exp. Med. 1961; 114: 875.
 15. Budd M.A., Parker C. W., Norden C. W.: "Evaluation of intradermal skin tests in penicillin hypersensitivity". J. Am. Med. Assoc. 1964; 190: 203.
 16. Levine B. B., Redmond A. P.: "Minor haptenic determinant-specific reagents of penicillin hypersensitivity in man. Int. Arch. Allergy" 1969; 35: 445.
 17. Levine B. B., Redmond A. P., Fellner M. J., e colaboradores: "Penicillin allergy and the heterogeneous immune response of man to benzylpenicillin". J. Clin. Invest. 1966; 45: 1895.
 18. Adkinson N. F. Jr., Spence M., Wheeler B.: "Randomized clinical trial of routine penicillin skin testing". (abstract) J. Allergy Clin. Immunol. 1984; 73 (suppl.): 163.

19. Saxon, Beall, Rohr, Adelman; Am. Internal Med. 1987; 107: 204-215

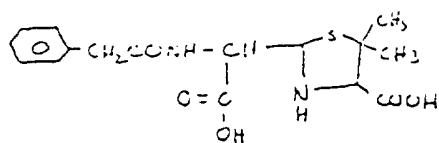
Ver também as Patentes dos Estados Unidos da América Nos. 4.316.882, 4.252.784, 4.228.147 e 4.183.910 publicadas por Levine; e as Patentes dos Estados Unidos da América Nos. 3.979.508 e 3.867.365 publicadas por Sahmann e Wagle.

Em estudos anteriores, tais como os atrás citados, tem sido demonstrado que quando a penicilina e os seus produtos de degradação reagem com tecidos humanos, são formados imunogenes que são capazes de provocar uma resposta imunológica. O grupo predominante ligado ao tecido é o benzilpenicilóilo. Devido à sua predominância, é chamado determinante antigénico principal. A penicilina forma também determinantes antigénios adicionais em quantidades mais pequenas. Por causa destes determinantes se formarem em quantidades mais pequenas relativas ao determinante principal, eles são chamados determinantes antigénicos menores. "MDM" representa "Mixture Determinante Menor".

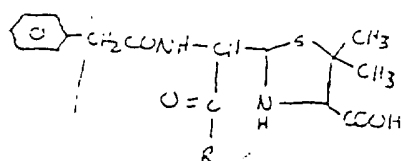
As estruturas dos determinantes de penicilina importantes são



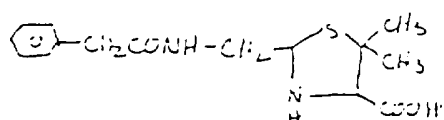
BENZILPENICILINA



Acido Benzilpenicilóico



Peniciloílo



Acido benzilpenilóico

Por causa da penicilina reagir com os tecidos humanos, os doentes que são tratados com penicilina desenvolvem anticorpos à medicação. A maior parte dos doentes produzem anticorpos IgG ou IgM. Estes anticorpos não induzem imediata hipersensibilidade ou reacção alérgica.

Outros doentes, porém, desenvolvem anticorpos IgE. São os anticorpos IgE que desencadeiam imediata reacção alérgica à penicilina, e estas reacções são as mais perigosas. Assim, a presença de anticorpos IgE indica alergia ou hipersensibilidade à penicilina num doente.

Alguns anticorpos IgE são específicos para o determinante antigénico principal, benzilpeniciloílo, e outros anticorpos IgE são específicos para os materiais MDM. Embora ambos os determinantes principal e menor possam provocar reacções alérgicas ameaçadoras à vida, os materiais MDM estão associados com a maior parte de reacções imediatas severas à penicilina.



Os reagentes teste que compreendem quer o determinante principal quer os materiais MDM são eficazes para detectar a presença do anticorpo IgE. O reagente teste mais vulgar para detectar os anticorpos IgE específicos para o determinante principal é a peniciloíl-polilisina. Este reagente é um conjugado sintético do determinante benzilpeniciloílo e de um veículo não imunogénico.

Até agora, os reagentes teste para detectar os anticorpos IgE específicos para os materiais MDM têm compreendido combinações de benzilpenicilina, ácido benzilpenilóico, ácido benzilpenicilóico, benzilpeniciloíl aminas e N-peniciloíl aminas de uma amina alifática ou de um ácido α -amino. Recentemente, contudo, aprendeu-se que os três primeiros dos materiais listados são os determinantes antigénicos menores relevantes, Por causa disto, pensa-se que as benzilpiniciloíl aminas não oferecem vantagem clinica para os testes de pele.

Os testes para alergia ou hipersensibilidade à penicilina usando reagentes dos determinantes principal e menor são seguros e eficazes. Independentemente de uma história anterior de alergia com a penicilina de um doente, um teste negativo com os dois determinantes principal e menor refasta virtualmente uma reacção alérgica séria à penicilina. No entanto, reacções retardadas de uma espécie muito menos séria, são menos excluídas completamente por um teste negativo. Por outro lado, um teste positivo indica uma grande probabilidade que o doente seja alérgico ou hipersensível à penicilina. O risco à penicilina de tais doentes não deve ser levado a cabo.

Apesar da sua eficácia, continuam a existir problemas com as composições MDM usadas para detectar alergia ou hipersensibilidade à penicilina. Em particular os materiais MDM são instáveis em solução devido à degradação da benzilpenicilina, do ácido benzilpenilóico e do ácido ben-

zilpenicilóico. Esta degradação é devido, em grande parte, à epimerização destes materiais. Por exemplo, a epimerização é tão rápida que 34% do ácido benzilpenicilóico e 30% do ácido benzilpenilóico epimerizam apenas numa hora à temperatura ambiente. Como resultado, apenas podiam ser usadas com confiança composições MDM preparadas recentemente até Há pouco. Por causa da instabilidade dos materiais MDM, não têm sido encontrados comercialmente.

Como revelado anteriormente, certos materiais MDM podem ser liofilizados com o fim de preparar composições com um armazenamento aceitável. A Patente dos Estados Unidos da América Levine Nº 4.316.882 revela uma composição MDM liofilizada que compreende a benzilpenicilina, benzilpeniciloato de sódio e uma N-peniciloíl-amina de uma amina alifática ou ácido α -amino. Com o fim de obter uma composição MDM com um armazenamento aceitável, estes materiais são liofilizados em recipientes de dose simples e são capazes de reconstituição com um tãmpão aquoso mesmo antes de se usar.

Porém, devido à instabilidade inerente dos materiais MDM em solução, as composições MDM de Levine devem ser liofilizadas a temperaturas muito frias e, portanto, a velocidades muito lentas. Assim, a liofilização é efectuada durante um período total de 48 horas. Durante a liofilização, a temperatura é mantida entre cerca de -40°C durante aproximadamente 10 horas e é depois aumentada 2°C por hora até ser atingida a temperatura ambiente.

RESUMO DO INVENTO

Assim, é um objectivo do nosso invento providenciar uma composição MDM estável em armazenamento que possa ser liofilizada a uma temperatura mais elevada e, portanto, a uma velocidade mais rápida do que as composições conhecidas anteriormente.

Um objectivo adicional do nosso invento é providenciar uma composição MDM liofilizada, estável em armazenamento, que possa ser reconstituída com água para dar uma solução isotónica de pH fisiológico que é usada para detectar alergia ou hipersensibilidade às penicilinas.

Também é um objectivo do nosso invento providenciar um método para a preparação destas composições.

Estes e outros objectivos são atingidos pelo presente invento como será evidente a partir da descrição seguinte.

Numa perspectiva, as composições do invento compreendem: ácido benzilpenilóico; benzilpenicilina; ácido benzilpenicilóico; uma quantidade de um sal de metal alcalino eficaz para aumentar o ponto de fusão da composição MDM congelada para que possa ser liofilizada a uma temperatura mais elevada sob condições suficientes para evitar a fusão ou colapso; uma substância tampão - pH numa quantidade suficiente para que a substância tampão-pH e o sal de metal alcalino deixem a composição MDM liofilizada ser reconstituída com água para dar uma solução isotónica contendo um pH fisiológico; e uma quantidade de água que é suficientemente baixa pelo que a degradação do ácido benzilpenilóico, da benzilpenicilina e do ácido benzilpenicilóico é substancialmente impedido.

As composições do presente invento são preparadas de acordo com um método novo. No método do invento, é preparada uma solução aquosa de ácido benzilpenilóico de um sal de metal alcalino e de uma substância tampão-ph. O ácido benzilpenilóico nesta solução é neutralizado com uma quantidade suficiente de hidróxido de sódio aquoso pelo que a adição do hidróxido de sódio dá uma concentração de catiões sódio que impedem efectivamente a epimerização, formando-se assim um sal estabilizador com os aniões do ácido benzilpenilóico. A solução resultante é arrefecida até uma temperatura de cerca de 0°C a cerca de 5°C.

Enquanto se mantém esta solução a uma temperatura entre cerca de 0°C e cerca de 5°C, são realizados os passos seguintes: Primeiro, a benzilpenicilina e o ácido benzilpenicilóico são dissolvidos na solução. O ácido benzilpenicilóico na solução é neutralizado com uma quantidade de hidróxido de sódio aquoso pelo que a adição do hidróxido de sódio dá uma concentração de catiões sódio que impedem efectivamente a epimerização, formando-se assim um sal estabilizador com os aniões do sódio benzilpenicilóico. Em seguida, o pH da solução é ajustado para um pH fisiológico. Esta solução é depois esterilizada e filtrada. Esta solução filtrada é depois distribuída em recipientes desidratados.

Depois da realização destes passos em que a solução foi mantida a uma temperatura entre cerca de 0°C e cerca de 5°C, a solução nos recipientes desidratados é congelada a uma temperatura entre cerca de -45°C e cerca de -15°C. Depois da congelação, a solução congelada é liofilizada sob condições efectivas para impedir a fusão e colapso, pelo que se forma um produto liofilizado contendo um conteúdo de água que é suficientemente baixo para impedir substancialmente a degradação do ácido benzilpenilóico, da benzilpenicilina e do ácido benzilpenicilóico.

As composições MDM liofilizadas, estáveis ao armazenamento, do presente invento são úteis para testar doentes para alergia ou hipersensibilidade às penicilinas de acordo com os métodos teste conhecidos no domínio.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS ILUSTRAÇÕES
PRESENTEMENTE PREFERIDAS

O invento será mais plenamente apreciado em vista da seguinte descrição detalhada das ilustrações presentemente preferidas.

A. As composições do invento

A detecção melhorada de alergia ou hipersensibilidade às penicilinas pode ser atingida com as novas composições MDM liofilizadas, estáveis ao armazenamento do presente invento. Estas composições compreendem o ácido benzilpenilóico, a benzilpenicilina, o ácido benzilpenicilóico, um sal de metal alcalino, uma substância tampão de pH e uma quantidade de água criticamente baixa. As composições do invento são caracterizadas por um baixo nível de epimerização dos materiais MDM. Por exemplo, é preferido que as condições que impedem a epimerização sejam usadas de modo que pelo menos cerca de 94,5% do ácido benzilpenicilóico seja o estereoisómero ácido (5R, 6R) - benzil - D - penicilóico.

Em geral, com o fim de se obter uma composição MDM que seja estável ao armazenamento, os materiais MDM devem ser liofilizados. A liofilização dá um produto contendo uma quantidade de água que é suficientemente baixa para impedir substancialmente a degradação dos materiais

MDM. Para remover uma quantidade suficiente de água, uma composição MDM é liofilizada enquanto congelada. O congelamento é necessário porque, enquanto congelada, a composição existe numa forma cristalina a partir da qual a água pode ser facilmente extraída. Se esta estrutura cristalina não é mantida durante a liofilização então ocorre a fusão e colapso, e a composição MDM não pode ser seca suficientemente para se obter uma composição estável ao armazenamento contendo um baixo nível de epimerização.

As composições do invento compreendem uma quantidade de um sal de metal alcalino eficaz para aumentar o ponto de fusão da composição MDM liofilizada de modo que a composição possa ser liofilizada a uma temperatura mais elevada sob as condições suficientes para impedir a fusão ou colapso. Como resultado, a estrutura cristalina do liofilato congelado pode ser mantida sobre uma gama de temperaturas mais elevada do que a estrutura cristalina de uma composição MDM que não contém o sal de metal alcalino. A água é mais facilmente removida do liofilato congelado a estas temperaturas mais elevadas. Consequentemente, devido à presença do sal, as composições MDM do presente invento liofilizam-se a uma temperatura mais elevada, e, portanto, a uma velocidade mais rápida do que as composições que não utilizam um tal sal.

Este uso de temperaturas mais elevadas e de uma velocidade mais rápida de liofilização é vantajoso porque os riscos do produto sofrer colapso são diminuídas. Também, a água é mais facilmente removida da composição MDM quando é liofilizada. Por sua vez, a remoção mais eficiente de água aumenta o armazenamento do produto liofilizado.

Qualquer sal de metal alcalino funcionará nas composições do invento tal como os cloretos de metal alcalino. O cloreto de sódio e o cloreto de potássio são preferidos, e é particularmente preferido o cloreto de potássio. O cloreto de potássio é particularmente bem sucedido

para uso nas composições do invento porque este sal origina uma estrutura cristalina mais ordenada dos materiais MDM congelados do que originam outros sais de metal alcalino. Em adição o cloreto de potássio aumenta a temperatura eutética da matriz congelada mais do que os outros sais de metal alcalino. Apesar das razões físico-químicas para isto não serem completamente compreendidas, estas propriedades de liofilização superiores do cloreto de potássio resultam na remoção de água mais rápida da matriz congelada e permite ocorrer a liofilização a temperaturas mais elevadas.

As composições do invento compreendem uma substância tampão de pH numa quantidade suficiente de modo que a substância tampão de pH e o sal de metal alcalino permitem a composição MDM liofilizada de ser reconstituída com água para dar uma solução isotónica contendo um valor de pH fisiológico entre cerca de 7,3 e cerca de 7,5. O fosfato de sódio é preferido por causa das suas propriedades tampão de pH superiores. No entanto, podem ser usadas outras substâncias tampão de pH.

As composições do invento compreendem uma quantidade criticamente baixa de água. Sabe-se que a água causa a degradação do ácido benzilpenilóico, da benzilpenicilina e do ácido benzilpenicilóico. Por exemplo, na presença de água, o ácido benzilpenicilóico efectua a epimerização para dar uma mistura de quatro estereoisómeros: o composto homólogo ácido (5R,6R)-benzil-D-penicilóico, o ácido (5S,6R)-benzil-D-penicilóico, o ácido (5R,6S)-benzil-D-penicilóico e o ácido (5S,6S)-benzil-D-penicilóico. O composto homólogo epimeriza-se completamente em solução aquosa para os outros três estereoisómeros dentro de 24 horas a cerca de 40°C.

Para ilustrar, o Exemplo I providencia valores para a degradação de ambos benzilpenicilina e do composto homólogo do ácido benzilpenicilóico em solução aquosa.

EXEMPLO I

Estabilidade do Ácido Benzilpenicilóico e da Benzilpenicilina em Solução Tampão de pH = 7,3

Composto	Temperatura °C	Constante de velocidade de 1ª Ordem calculada kh^{-1}	Horas para Atingir Perda de Concentra- ção de 5% 10%	
(5R,6R)-benzil- -D-peniciloato Hidratado monossódico	0	0,0015035	34,1	70,1
	5	0,0033819	15,2	31,2
	10	0,0073926	6,9	14,3
	15	0,0157268	3,3	6,7
	20	0,0326057	1,6	3,2
	25	0,0659659	0,8	1,6
Penicilina G de Potássio	0	0,0000966	531,3	1091,2
	5	0,0001988	258,0	530,0
	10	0,0003989	128,6	264,1
	15	0,0007815	65,6	134,8
	20	0,0014963	34,3	70,4
	25	0,0028029	18,3	37,6

Neste exemplo, foram testadas as solu-
ções de (5R,6R)-benzil-D-peniciloato monossódico tetra-hídra-
tado e penicilina G potássio usando o método de ensaio HPLC
descrito em Vandino, W.A., e colab.: J. Pharm. Sci. 1979; 68:
1316.

Os resultados neste exemplo mostram as horas necessárias para se atingir uma perda de concentração de 5% e 10% da benzilpenicilina e do ácido benzilpenicilóico sobre uma gama de temperatura de 0°C a 25°C.

Através da degradação do ácido benzilpenilóico, da benzilpenicilina e do ácido benzilpenicilóico a água irá diminuir severamente o armazenamento de qualquer composição MDM liofilizada. Assim, as composições MDM liofilizadas, estáveis ao armazenamento, do invento compreendem uma quantidade de água que é suficientemente baixa pelo que a degradação do ácido benzilpenilóico, benzilpenicilina e do ácido benzilpenicilóico é substancialmente impedida.

Com o fim de maximizar o armazenamento, as composições do invento são guardadas mais vantajosamente em recipientes desidratados que têm sido secos de modo a remover substancialmente toda a água. Assim guardadas, as composições do invento têm uma estabilidade de cerca de dois anos à temperatura de cerca de 4°C e uma estabilidade de um ano a uma temperatura próxima da temperatura ambiente.

A composição preferida compreende: ácido benzilpenilóico de cerca de 1,60 até cerca de 1,85 moles de benzilpenicilina para cada mole de ácido benzilpenilóico; cerca de 1,0 mole de ácido benzilpenicilóico para cada mole de ácido benzilpenilóico; de cerca de 9,38 até cerca de 10,86 moles de um sal de metal alcalino para cada mole de ácido benzilpenilóico; e uma quantidade de água que é suficientemente baixa para que a degradação do ácido benzilpenilóico, da benzilpenicilina e do ácido benzilpenicilóico seja substancialmente impedida.

EXEMPLO 2

Eficácia da Mistura Determinante Menor Liofilizada

As composições do invento são úteis para testar doentes para alergia ou hipersensibilidade às penicilinas de acordo com os métodos teste conhecidas no domínio.

Resumidamente, uma composição MDM liofilizada preparada de acordo com o Exemplo IV foi guardada a uma temperatura de cerca de 4°C durante cerca de uma semana. Por causa do aumento de estabilidade das composições MDM do presente invento, os resultados que se seguem também podem ser alcançados usando uma composição MDM liofilizada preparada de acordo com o Exemplo IV que tinha sido guardada a uma temperatura de cerca de 0°C até cerca de 5°C durante cerca de dois anos, ou que tinha sido guardada à temperatura ambiente aproximadamente até cerca de um ano. Antes do teste, a composição MDM liofilizada foi reconstituída com água para dar uma solução isotónica contendo um pH fisiológico de cerca de 7,5. A concentração de ingredientes na solução de MDM reconstituída é a apresentada no Exemplo VII.

O teste de pele foi realizado pelos métodos de teste de "arranhadela" e teste de injeção intradérmica. O teste de "arranhadela" envolvia arranhadela superficial da pele e cobertura da área arranhada com uma gota de solução de MDM. Se os resultados do teste de "arranhadela" eram negativos, então o teste de "arranhadela" era seguido por teste de injeção intradérmica. O teste intradérmico era uma injeção de cerca de 0,010 ml até cerca de 0,050 ml da solução MDM. Os fornecimentos clínicos eram guardados a uma temperatura de cerca de 0°C até cerca de 5°C antes do uso.

Na realização destes testes, um teste de pele positivo, que é diagnóstico para alergia à penicilina, foi interpretado de acordo com as linhas gerais conhecidas para os reagentes teste de pele. Quando estes resultados são positivos, o desafio à penicilina de tais doentes não pode ser levado a cabo eticamente. Um teste negativo indicava reacção nula para o teste de pele pontual.

Nestes testes todos os doentes tinham uma história de alergia à penicilina. Os resultados são apresentados na tabela seguinte.

Doente	MDM Liofilizada	Resultado do teste	
		de pele com MDM recentemente preparada	Peniciloil Polilisina
1	Negativo	Negativo	Negativo
2	Negativo	Negativo	Negativo
3	Positivo	Positivo	Negativo
4	Positivo	Positivo	Negativo
5	Positivo	Positivo	Positivo
6	Positivo	Positivo	Positivo
7	Negativo	Negativo	Positivo
8	Negativo	Negativo	Positivo

Os valores ilustram a eficácia das composições MDM do presente invento. Mais especificamente estes resultados mostram que, depois da armazenagem prolongada, as composições do invento são tão efectivas quanto é uma composição MDM preparada recentemente. A utilidade das composições MDM do invento é salientado pela sua capacidade

para detectar indivíduos com alergia ou hipersensibilidade cuja alergia ou hipersensibilidade não pode ser detectada com peniciloíl polisina.

B. O método do Invento

No método do invento, é preparada uma solução aquosa compreendendo ácido benzilpenilóico, um sal de metal alcalino e uma substância tampão de pH.

De preferência, esta solução compreende de cerca de 9,38 até cerca de 10,86 moles do sal de metal alcalino para cada mole do ácido benzilpenilóico, e cerca de 1,0 mole da substância tampão de pH para cada mole do ácido benzilpenilóico.

O ácido benzilpenilóico nesta solução é neutralizado com uma quantidade suficiente de hidróxido de sódio pelo que a adição do hidróxido de sódio dá uma concentração de catiões sódio que é efectiva para formar um sal solúvel e estabilizante com os aniões do ácido benzilpenilóico. A análise racional para esta neutralização é que, em solução aquosa, o ácido benzilpenilóico dissocia-se num catião hidrogénio e um anião do ácido benzilpenilóico, levando cada ião uma carga eléctrica simples. Nesta forma, o ácido benzilpenilóico é especialmente susceptível de degradação em solução aquosa. Assim, para estabilizar o anião do ácido benzilpenilóico, estas cargas eléctricas devem ser neutralizadas. Isto é realizado através da adição do hidróxido de sódio.

Apesar de também poderem ser usadas para a neutralização outras, bases, o hidróxido de sódio



é particularmente bem sucedido para uso no invento. Em geral em solução aquosa, o hidróxido de sódio dissocia-se num catião sódio e num anião hidróxido, contendo cada ião uma carga eléctrica simples. Por causa de cada ião do hidróxido de sódio conter uma carga simples que é igual a, mas opostas, cargas levadas pelos iões do ácido benzilpenilóico, o hidróxido de sódio é ionicamente compatível com o método do invento. Além disso, o catião sódio, em particular é crítico pelas suas características de grande dimensão iónica em solução aquosa.

Quando é adicionado hidróxido de sódio à solução aquosa, o anião hidróxido neutraliza o catião hidrogénio e o catião sódio forma um sal estável com o anião do ácido benzilpenilóico. Depois da adição do hidróxido de sódio, a concentração do catião sódio na solução deve ser de cerca de 95% até cerca de 110% da concentração do anião do ácido benzilpenilóico para a neutralização do ácido benzilpenilóico ser efectiva.

Depois da neutralização, a solução é arrefecida até uma temperatura de cerca de 0°C até cerca de 5°C. Enquanto se mantém a solução a uma temperatura a uma temperatura entre cerca de 0°C e cerca de 5°C, a benzilpenicilina e o ácido benzilpenicilóico são dissolvidos na solução. De preferência, a solução resultante, compreende de cerca de 1,60 até cerca de 1,85 moles de benzilpenicilina para cada mole de ácido benzilpenilóico e cerca de 1,0 mole de ácido benzilpenicilóico para dar cada mole de ácido benzilpenilóico. Como foi feito com o ácido benzilpenilóico, o ácido benzilpenicilóico é neutralizado por adição de uma quantidade suficiente de hidróxido de sódio pelo que, a adição do hidróxido de sódio dá uma concentração de catiões sódio que é efectiva para formar um sal estável com os aniões do ácido benzilpenicilóico. Depois da neutralização, a concentração dos catiões sódio resultantes desta adição do hidróxido de sódio deve ser de cerca de 95% até cerca de 110% da concentração do anião do ácido benzilpenicilóico para a neutralização ser efectiva.

Enquanto se mantém a solução a uma temperatura entre cerca de 0°C e cerca de 5°C, o pH é ajustado para um valor de pH fisiológico de cerca de 7,3 até cerca de 7,5. Este ajustamento do pH deve ser realizado com soluções aquosas quer de hidróxido de sódio quer ácido clorídrico. Depois do ajustamento do pH, a solução é filtrada esterilizada enquanto se continua a manter uma temperatura entre cerca de 0°C e cerca de 5°C. Depois da filtração, a solução é distribuída em recipientes desidratados.

Depois da realização destes passos em que a solução é mantida a uma temperatura de cerca de 0°C até cerca de 5°C, a solução nos recipientes desidratados é congelada a uma temperatura de cerca de -45°C até cerca de -15°C. De preferência, a solução deve ser congelada durante um período de cerca de 20 até cerca de 30 minutos.

Depois da dissolução do ácido benzilpenicilóico na solução, a solução deve ser mantida a uma temperatura de cerca de 0°C até cerca de 5°C durante um período de tempo suficientemente breve continuando na referida congelação com o fim de impedir substancialmente a epimerização de mais do que cerca de 5,5% do estereoisómero (5R,6R)-benzil-D-ácido penicilóico. O impedimento deste grau de epimerização pode ser realizado se a solução é congelada dentro de cerca de 15 horas depois da dissolução do ácido benzilpenicilóico.

Depois do congelamento, a solução congelada é liofilizada sob condições efectivas para impedir a fusão ou colapso, pelo que é formado um produto liofilizado contendo um conteúdo de água que é suficientemente baixo para impedir substancialmente a degradação do ácido benzilpenicilóico, da benzilpenicilina e do ácido benzilpenicilóico. Em geral, podem ser usados noutros sistemas liofilizados no método do invento. Como um exemplo, no método preferido, a solução congelada é primeiro liofilizada durante cerca de 8 até cerca

de 13 horas a uma temperatura de cerca de -45°C até cerca de -15°C sob um vácuo de cerca de 15 até cerca de 30 microns. Enquanto se mantém este vácuo, a solução congelada é depois liofilizada durante cerca de 7 até cerca de 14 horas a uma temperatura de cerca de 0°C até cerca de 5°C durante um tempo total de secagem de cerca de 20 até cerca de 22 horas.

Depois da liofilização, o vácuo nos recipientes desidratados é interrompido de preferência usando filtração, seco sob azoto. Os recipientes desidratados devem ser selados imediatamente depois de interrompido o vácuo. Depois da selagem, os recipientes devem ser guardados a uma temperatura de cerca de 0°C até cerca de 5°C durante períodos de tempo prolongados até cerca de 2 anos ou guardados a uma temperatura próxima da temperatura ambiente durante períodos de tempo prolongados até cerca de um ano.

Os recipientes desidratados usados no método do invento podem ser qualquer recipiente que possa ser desidratado adequadamente. Por exemplo, as composições MDM liofilizadas do invento podem ser preparadas e guardadas em âmpolas de vidro seladas ou em recipientes com tampa de borracha. No caso de recipientes com tampa de borracha, o domínio anterior não ensina qualquer tratamento especial das rolhas de borracha. Observamos no entanto, que autoclonando as rolhas de borracha para a esterilização, i. e., esterilizando as rolhas de borracha com vapor aquecido sob pressão, faz com que a água seja absorvida pelas rolhas. Se não é seco a uma temperatura elevada, esta água irá sair das rolhas de borracha e entra no produto liofilizado. Se isto acontecer, a água irá causar a degradação do ácido benzilpenilóico, da benzilpenilóico, da benzilpenicilina e do ácido benzilpenicilóico devido às reacções químicas. Para evitar este problema, as rolhas de borracha e recipientes devem ser secos a uma temperatura de cerca de 160°C durante cerca de 1 até cerca de 2 horas.



As composições MDM liofilizadas do presente invento devem ser estáveis ao armazenamento até cerca de 2 anos quando guardadas a uma temperatura de cerca de 0°C até cerca de 5°C e serão também estáveis do armazenamento até cerca de um ano quando guardadas à temperatura ambiente aproximada. Quando reconstituída com água, a solução aquosa resultante da composição MDM deve ter um valor de pH fisiológico de cerca de 7,3 até cerca de 7,5.

EXEMPLO III

Estabilidade de MDM: Efeito das Rolhas de borracha não secas

Neste exemplo, as composições MDM liofilizadas preparadas de acordo com o Exemplo IV foram colocadas em recipientes contendo quer rolhas de borracha secas quer não secas. As amostras foram reconstituídas e testadas usando o método de ensaio HPLC descrito em Vandino, W. A., e colab.: J. Pharm. Sci. 1979; 68: 1316. Os resultados são apresentados na tabela seguinte.

<u>Amostra</u> ¹	<u>Composto</u>	<u>Quantidade</u> <u>Inicial (%)</u>	<u>Quantidade</u> <u>Restante</u> ²	<u>Variação</u>
Rolhas não secas X1	Penicilina	100	68,4	-31,6
	Peniciloato	100	115,0	+15,0
	Peniloato	100	98,7	- 1,3
Rolhas secas X5	Penicilina	100	97,5	- 2,5
	Peniciloato	100	97,8	- 2,2
	Peniloato	100	104,6	+ 4,6

1. Rolhas de borracha a 160°C durante 1-2 horas e rolhas não secas foram secas ao ar depois de autoclovadas.
2. X1 ensaiadas 4 meses depois de guardadas à temperatura ambiente. X5 ensaiadas 10 meses depois de guardadas à temperatura ambiente.

Estes valores mostram que quando foram usados rolhas de borracha não secas na preparação de composições MDM liofilizadas, a benzilpenicilina, o ácido benzilpenilóico e o ácido benzilpeniciclóico sofriam degradação substancial, reduzindo assim a vida de armazenamento da composição MDM liofilizada. Apenas depois de 4 meses, foi verificados um aumento de 10 vezes na quantidade de benzilpenicilina perdida quando foram usadas rolhas de borracha não secas quando comparado com os casos em que foram usadas rolhas de borracha secas.

EXEMPLO IV

Preparação de uma composição MDM liofilizada, estável ao armazenamento que pode ser reconstituída com água para dar uma solução que é usada para detectar Alergia ou Hipersensibilidade à Penicilina

Em primeiro lugar, todo o material de vidro e utensílios foram depiropeneizados antes do uso. O enchimento e manuseamento de recipientes abertos foi feito sob condições asépticas, livres de partículas.

Foram preparadas soluções aquosas de hidróxido de sódio 0,1M e ácido clorídrico 0,1M. Na preparação da solução de hidróxido de sódio, foi pesado 1,00 grama de hidróxido de sódio e colocado num balão volumétrico de 250 ml. O hidróxido de sódio no balão foi depois diluído até à marca com água para injeção. Na preparação da solução de ácido clorídrico, foi pipetado 0,83 ml de ácido clorídrico concentrado num balão volumétrico de 100 ml. O ácido clorídrico neste balão foi depois diluído até à marca com água para injeção.

Em seguida, foram colocados 1,632 gramas de ácido benzilpenilóico, 3,680 gramas de cloreto de potássio e 0,710 gramas de fosfato de sódio anidro, dibásico, num cilindro graduado. Foi também colocado uma pequena barra de agitação magnética, com 25 mm de comprimento por 9 mm de diâmetro, no cilindro graduado para realizar a mistura.

Depois disto, foi adicionado 44,0 ml da solução de hidróxido de sódio 0,1M ao cilindro graduado com o fim de neutralizar e dissolver o ácido benzilpenilóico. O interior do cilindro graduado foi depois lavado com 10 ml de água para injeção pelo que todos os ingredientes sólidos es-

tavam em solução. Esta solução foi arrefecida num banho de gelo a uma temperatura de cerca de 0°C até cerca de 5°C.

Enquanto se mantém a solução no cilindro graduado a uma temperatura de cerca de 0°C até cerca de 5°C, foram adicionados 3,136 gramas de benzilpenicilina de potássio (penicilina G potássio) ao cilindro graduado. Depois da adição da benzilpenicilina, o interior do cilindro graduado foi lavado com 10 ml de água para injeção. A solução foi depois misturada até ser completa a dissolução da benzilpenicilina.

Continuando a manter a solução a uma temperatura de cerca de 0°C até cerca de 5°C, foi adicionado 2,232 gramas de benzilpeniciloato monossódico tetra-hidratado à solução no cilindro graduado. Depois de adicionar o ácido benzilpenicilóico, o interior do cilindro graduado foi lavado com 10 ml de água para injeção. A solução foi depois agitada até ser completa a dissolução do ácido benzilpenicilóico. Depois da dissolução do ácido benzilpenicilóico, foi adicionado 48,0 ml de solução de hidróxido de sódio 0,1M com o fim de neutralizar o ácido benzilpenicilóico.

Em seguida, enquanto se continua a manter a solução a uma temperatura de cerca de 0°C até cerca de 5°C, o pH da solução foi ajustada até cerca de 7,30 com hidróxido de sódio 0,1M ou ácido clorídrico 0,1M usando uma combinação de eléctrodo de pH lavado com água para injeção. Depois de ser feito o ajustamento do pH, o eléctrodo de pH foi lavado com água para injeção e removido do cilindro graduado.

Depois disto, enquanto se continua a manter a solução a uma temperatura de cerca de 0°C até cerca de 5°C, a solução foi diluída até ao volume final, dando a solução para liofilização. Para realizar esta, a barra de agitação foi elevada da solução usando um magnete que foi colocado contra o exterior do cilindro graduado. Depois da remoção da

barra de agitação, foi adicionado água para injeção até o volume da solução no cilindro graduado ser de 200 ml seguindo esta diluição, a barra de agitação foi outra vez descida na solução e depois misturou-se completamente. O exemplo V apresenta as concentrações de ingredientes na solução para liofilização.

Enquanto se continua a manter a solução para liofilizar a uma temperatura de cerca de 0°C até cerca de 5°C, a solução foi filtrada e esterilizada através de um fluxo laminar com membrana de 47 mm de diâmetro, 0,2 microns, de uma "hotte" livre de poeiras (de alta eficiência; HEPA). O uso de uma "hotte" HEPA permitiu o manuseamento de materiais livres de partículas. O filtro foi depois lavado com cerca de 30 ml da solução. Algum deste filtrado inicial foi recolhido num recipiente para análise por HPLC. Depois de recolher este filtrado, foi distribuído porções de cerca de 9 ml até cerca de 10 ml de solução filtrada em recipientes com soro esterilizado usando um cilindro graduado de 10 ml esterilizado. Entretanto, foi realizado o teste de integridade da membrana no ponto de "bolha" no filtro de acordo com as direcções do fabricante. O fim deste teste de integridade era assegurar que não houvessem fendas, buracos, ou outros defeitos no filtro. De preferência, os recipientes de soro esterilizado devem ser prontamente selados e colocados num congelador com -10°C enquanto se realiza o teste de integridade da membrana no ponto de borbulhar.

Em seguida, os recipientes desidratados foram cheios com a solução para liofilizar. O enchimento dos recipientes desidratados foi realizado numa "hotte" HEPA de fluxo laminar. Para realizar isto, foi derretido num banho de gelo um recipiente da solução do congelador a -10°C. Enquanto a solução no recipiente foi derretendo, foram colocados num recipiente de metal vários recipientes de 2 ml. Estes recipientes de 2 ml foram depois arrefecidos colocando o recipiente de metal em gelo esmagado. Depois de derreter a solu-

ção para liofilização até uma temperatura de cerca de 0°C até cerca de 5°C, e sem demora, foram distribuídas porções da solução para liofilização de cerca de 0,100 ml até cerca de 0,105 ml nos recipientes de 2 ml arrefecidos usando uma pipeta contendo uma ponta de propileno previamente autoclavada. Em seguida, foram colocados as rolhas de borracha secas nos recipientes de 2 ml. As rolhas de borracha tinham sido secas a 160°C durante cerca de 1 a 2 horas antes do uso. Depois dos recipientes tapados, foram transferidos entre cerca de 35 a 40 recipientes para Stoppering-Tainers arrefecidos em gelo-esmagado (Sistemas FTS, Inc., Stone Ridge, NY) usando pinças compridas. Os conteúdos de cada um dos recipientes de 2 ml foram listados no Exemplo VI que se segue.

Depois do enchimento dos recipientes, foi congelada a solução para liofilização. Para realizar isto, foi preparado um banho de lama de cerca de -50°C até cerca de -40°C, por arrefecimento de uma mistura de 60% de etileno glicol e 40% de água (as percentagens são em peso) com pastilhas de gelo seco. Depois da preparação do banho de lama, a solução para liofilização contida nos recipientes de 2 ml foi congelada por imersão dos "Stoppering-Tainers" no banho de lama durante cerca de 30 minutos.

Depois do congelamento, foi realizada a liofilização. A liofilização ocorreu em duas fases. Primeiro, na fase de secagem primário, a solução congelada foi liofilizada a uma temperatura de cerca de -45°C até cerca de -15°C durante cerca de 8 até cerca de 13 horas. Como medido por um manómetro de McLeod. o vácuo durante a fase de secagem primária era de cerca de 15 até cerca de 30 microns.

A fase de secagem primária foi seguida por uma fase de secagem secundária. Durante esta fase a solução congelada foi depois liofilizada a uma temperatura de cerca de 0°C até cerca de 5°C durante cerca de 7 até cerca de 14 horas sob um vácuo de cerca de 15 até cerca de 30 microns

como medido por um monómetro de McLeod. O tempo total de secagem para as duas fases foi de cerca de 20 até cerca de 22 horas. Pensa-se que as condições para liofilização podem ser variadas desde que a estabilidade do produto fique inalterável.

Depois da liofilização, o tubo de vácuo dando para os "Stoppering-Tainers" foi fixado e os "Stoppering-Tainers" foram removidos do sistema. Em seguida, foi interrompido o vácuo nos "Stoppering-Tainers" com azoto seco por um filtro molecular e filtrado através de uma unidade de filtro (Millex - GF50, Millipore Corp., ou equivalente) de 0,2 micron esterilizado e de 50 mm de diâmetro. Em seguida os recipientes de 2 ml dentro dos "Stoppering-Tainers" foram selados fazendo girar o manípulo do "Stoppering-Tainer" no sentido contrário ao dos ponteiros do relógio para conduzir a placa que tapa para baixo. Depois da selagem dos recipientes de 2 ml, estes recipientes foram inspeccionados. Qualquer recipiente que tinha um resíduo em pó na tubuladura era desprezado. Tal resíduo é indesejável, por que o resíduo baixa a qualidade do selo dos recipientes de 2 ml. Depois de tapar e marcar os recipientes de 2 ml, estes recipientes foram guardados a uma temperatura de cerca de 0°C até cerca de 5°C. Os recipientes também podiam ter sido guardados à temperatura ambiente aproximada durante cerca de um ano.

Quando a composição MDM liofilizada, estável à armazenagem num dos recipientes de 2 ml foi reconstituído para 0,25 ml com água, a solução MDM isotónica resultante tinha um valor de pH fisiológico de cerca de 7,5. A concentração de ingredientes numa destas soluções reconstituídas é fornecida no Exemplo VII.

EXEMPLO V

Concentração de Ingredientes na solução MDM para Liofilização

<u>Composto</u>	<u>Concentração</u>
Ácido benzilpenicilóico	25,0 mM
Benzilpenicilina	42,1 mM
Ácido benzilpenilóico	25,0 mM
Cloreto de Potássio	246,8 mM
Fosfato de Sódio	25,0 mM

EXEMPLO VI

Conteúdos de Cada Recipiente Contendo Solução Congelada para Liofilização

Cada recipiente contem o seguinte:

Volume de solução para liofilização	0,10 ml
Cloreto de potássio	1,840 mg
Fosfato de sódio anidro, dibásico	0,355 mg
Ácido benzilpenilóico monohidratado	0,816 mg
Benzilpenicilina de potássio	1,568 mg
Benzilpeniciloato Monossódico tetra-hidratado	1,116 mg

EXEMPLO VII

Concentração de Ingredientes em solução MDM Reconstituída

Quando reconstituída para 0,25 ml com água, as concentrações em cada recipiente são:

<u>Composto</u>	<u>Concentração</u>
Ácido benzilpenilóico	10,0 mM
Benzilpenicilina	16,8 mM
Ácido benzilpenicilóico	10,0 mM
Cloreto de potássio	98,7 mM
Fosfato de sódio	10,0 mM

A solução MDM isotónica resultante terá um pH de cerca de 7,5.

Foi assim apresentado e descrito uma nova composição MDM liofilizada, estável ao armazenamento e o método para a sua preparação. A descrição anterior da ilustração preferida do invento foi apresentada com o objectivo de ilustração e descrição. Não se pretendem ser exaustivo ou limitar o invento à forma precisa descoberta. As pessoas experientes no domínio reconhecerão que são possíveis muitas modificações, variações e adaptações. Assim, todas estas alterações, modificações, variações e outros usos e aplicações que não se afastem do espírito e âmbito do invento são supostas cobertas pelo invento que está apenas limitado pelas Reivindicações que se seguem.



R E I V I N D I C A Ç Õ E S:

1ª. - Processo para a preparação de uma composição "Mistura Determinante Menor" (MDM), estável à armazenagem, que pode ser reconstituída com água para dar uma solução que é usada para detectar alergia ou hipersensibilidade a penicilina, caracterizado por compreender os passos de:

(a) preparação de uma solução aquosa de ácido benzilpenilóico, de uma sal de metal alcalino e de uma substância tampão de pH;

(b) neutralização da solução do passo (a) com uma quantidade suficiente de hidróxido de sódio aquoso para que a adição do hidróxido de sódio dê uma concentração de catiões sódio que é efectiva para formar um sal estável com os aniões do ácido benzilpenilóico;

(c) arrefecimento da solução do passo (b) para uma temperatura de cerca de 0° até cerca de 5°

(d) realização dos passos seguintes enquanto se mantém a solução do passo (c) a uma temperatura de cerca de 0°C até cerca de 5°C:

(i) dissolução da benzilpenicilina e do ácido benzilpenicilóico na solução resultante do passo (c);

(ii) neutralização do ácido benzilpenicilóico na solução resultante do passo (d) (i) com uma quantidade suficiente de hidróxido de sódio aquoso pelo que a adição do hidróxido de sódio dá uma concentração de catiões sódio que é efectiva para formar um sal estável com os aniões do ácido benzilpenicilóico;

(iii) ajustamento do pH da solução resultante do passo



(d) (ii) para pH fisiológico;

(iv) filtração estéril da solução resultante do passo (d) (iii); e

(v) distribuição da solução filtrada resultante do passo (d) (iv) em recipientes desidratados;

(e) congelação da solução nos recipientes desidratados a uma temperatura entre cerca de -45°C e cerca de -15°C ; e

(f) liofilização da solução congelada sob condições eficazes para evitar a fusão e colapso, pelo que um produto liofilizado é formado contendo um conteúdo de água que é suficientemente baixa para evitar substancialmente a degradação do ácido benzilpenilóico, da benzilpenicilina e do ácido benzilpenicilóico.

2a. - Processo para a preparação de uma composição MDM liofilizada, estável à armazenagem, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o sal de metal alcalino ser um cloreto de metal alcalino.

3a. - Processo para a preparação de uma composição MDM liofilizada, estável à armazenagem, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o sal de metal alcalino ser cloreto de potássio.

4a. - Processo para a preparação de uma composição MDM liofilizada, estável à armazenagem, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o sal de metal alcalino ser cloreto de sódio.



5a. - Processo para a preparação de uma composição MDM liofilizada, estável à armazenagem, de tampão de pH ser fosfato de sódio.

6a. - Processo para a preparação de uma composição MDM liofilizada, estável à armazenagem, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por pelo menos cerca de 94,5% do ácido benzilpenicilóico ser o estereoisómero ácido (5R,6R)-benzil-D-penicilóico.

7a. - Processo para a preparação de uma composição MDM liofilizada estável à armazenagem, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por compreender também a conversão da solução formada no passo (d) (i) a uma temperatura de cerca de 0°C até cerca de 5°C durante um período de tempo suficientemente breve antes do prosseguimento no passo (e) para impedir a epimerização de mais do que cerca de 5,5% do estereoisómero ácido (5R,6R)-benzil-D-penicilóico.

8a. - Processo para a preparação de uma composição MDM liofilizada, estável à armazenagem, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por durante a referida liofilização, a solução congelada ser primeiro liofilizada durante cerca de 8 até cerca de 13 horas a uma temperatura entre cerca de -45°C e cerca de -15°C e ser também liofilizada durante cerca de 7 até cerca de 14 horas a uma temperatura de cerca de 0°C até cerca de 5°C sob um vácuo de cerca de 15 até cerca de 30 microns durante um tempo de secagem total de cerca de 20 até cerca de 22 horas.

9a. - Processo para a preparação de uma composição MDM liofilizada, estável à armazenagem, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por compreender

também os passos de interromper o vácuo nos recipientes desidratados com azoto seco, filtrado.

10^a. - Processo para a preparação de uma composição MDM liofilizado, estável à armazenagem, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por compreender também os passos de selagem dos recipientes desidratados imediatamente depois do interromper do vácuo.

11^a. - Processo para a preparação de uma composição "Mistura Determinante Menor" (MDM) liofilizada, estável à armazenagem, que pode ser reconstituída com água para dar uma solução que é usada para detectar alergia ou hipersensibilidade a penicilinas, caracterizado por compreender os passos de:

(a) preparação de uma solução aquosa compreendendo:

(1) ácido benzilpenilóico

(2) de cerca de 9,38 até cerca de 10,86 moles de um sal de metal alcalino para cada mole do ácido benzilpenilóico; e

(3) cerca de 1,0 mole de uma substância tampão de pH para cada mole de ácido benzilpenilóico;

(b) neutralização do ácido benzilpenilóico na solução de (a) com uma quantidade suficiente de hidróxido de sódio aquoso para dar uma concentração de cátions sódio que é efectiva para formar um sal estável com os aniões do ácido benzilpenilóico;

(c) arrefecimento da solução resultante do passo (b) até uma temperatura de cerca de 0°C a cerca de 5°C;

(d) realização dos passos seguintes enquanto se mantém a solução do passo (c) a uma temperatura de cerca de 0°C até cerca de 5°C;

(i) dissolução de cerca de 1,60 até cerca de 1,85 mole da benzilpenicilina para cada mole de ácido benzilpenilóico na solução resultante do passo (c);

(ii) dissolução de cerca de 1,0 mole do ácido benzilpenicilóico para cada mole de ácido benzilpenilóico na solução resultante do passo (d) (i);

(iii) neutralização do ácido benzilpenicilóico com uma quantidade de hidróxido de sódio aquoso suficiente para dar uma concentração de catiões sódio que é efectiva para formar um sal estável com os aniões do ácido benzilpenicilóico;

(iv) ajustamento do pH da solução resultante do passo (d) (iii) para um valor de cerca de 7,3 até cerca de 7,5; e

(v) filtração estéril da solução resultante do passo (d) (iv);

(vi) conservação da solução filtrada resultante do passo (d) (v) em recipientes desidratados;

(e) congelação da solução nos recipientes desidratados a uma temperatura de cerca de -45°C até cerca de -15°C durante cerca de 30 minutos;

(f) liofilização da solução congelada, em que durante a referida liofilização, a solução congelada é primeiro liofilizada durante cerca de 8 até cerca de 13 ho-

ras a uma temperatura entre cerca de -45°C e cerca de -15°C sob um vácuo de cerca de 15 até cerca de 30 microns, e é também liofilizada durante cerca de 7 até cerca de 14 horas a uma temperatura entre cerca de 0°C e cerca de 5°C sob um vácuo de cerca de 15 até cerca de 30 microns durante um tempo de secagem total de cerca de 20 até cerca de 22 horas.

12a. - Processo para a preparação de uma composição MDM liofilizada, estável à armazenagem, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por o sal de metal alcalino ser um cloreto de metal alcalino.

13a. - Processo para a preparação de uma composição MDM liofilizada, estável à armazenagem, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por o sal de metal alcalino ser cloreto de potássio.

14a. - Processo para a preparação de uma composição MDM liofilizada, estável à armazenagem, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por o sal de metal alcalino ser cloreto de sódio.

15a. - Processo para a preparação de uma composição MDM liofilizada, estável à armazenagem, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado por a substância tampão de pH ser fosfato de sódio.

16a. - Processo para a preparação de uma composição MDM liofilizada, estável à armazenagem, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por pelo menos cerca de 94,5% do ácido benzilpeniciclólico ser o estereo-

isómero ácido (5R,6R)-benzil-D-penicilóico.

17ª. - Processo para a preparação de uma composição MDM liofilizada, estável à armazenagem, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por compreender também a conservação da solução aquosa formada no passo (d) (i) a uma temperatura de 5°C durante um período de tempo suficientemente breve antes do prosseguimento no passo (e) para impedir a epimerização de mais do que cerca de 5,5% do estereoisómero ácido (5R,6R)-benzil-D-penicilóico.

18ª. - Processo para a preparação de uma composição MDM liofilizada, estável à armazenagem, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por compreender também os passos de interrupção do vácuo nos recipientes desidratados com azoto seco, filtrado.

19ª. - Processo para a preparação de uma composição MDM liofilizada, estável à armazenagem, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado por compreender também os passos de selagem dos recipientes desidratados imediatamente depois da interrupção do vácuo.

20ª. - Processo de acordo com a reivindicação anterior 20, caracterizado por se preparar uma composição "Mistura Determinante Menor" (MDM) liofilizada, estável à armazenagem, que pode ser reconstituída com água para dar uma solução que é usada para detectar alergia ou hipersensibilidade a penicilinas, e por compreender:

(a) ácido benzilpenilóico;

(b) benzilpenicilina;

(c) ácido benzilpenicilóico em que pelo menos cerca de 94,5% do ácido benzilpenicilóico é o estereoisómero ácido (5R,6R)-benzil-D-penicilóico;

(d) uma quantidade de um sal de metal alcalino eficaz para aumentar o ponto de fusão da composição MDM para ser liofilizada de modo que a composição possa ser liofilizada a uma temperatura superior e a fusão ou colapso sejam evitados;

(e) uma substância tampão de pH numa quantidade suficiente de modo que a substância tampão de pH e o sal de metal alcalino permitam a composição MDM liofilizada de ser reconstituída com água para dar uma solução isotónica contendo um pH fisiológico; e

(f) uma quantidade de água que é suficientemente baixa para que a degradação do ácido benzilpenilóico, da benzilpenicilina e do ácido benzilpenicilóico seja substancialmente evitada.

21a. - Processo de acordo com a reivindicação 21, caracterizado por o referido sal de metal alcalino ser um cloreto de metal alcalino.

22a. - Processo de acordo com a reivindicação 21, caracterizado por o referido sal de metal alcalino ser cloreto de potássio.

23a. - Processo de acordo com a reivindicação 21, caracterizada por o referido sal de metal alcalino ser cloreto de sódio.



24ª. - Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por a substância tampão de pH ser fosfato de sódio.

25ª. - Processo de acordo com a reivindicação 21, caracterizado por compreender também a referida composição MDM estando contida num recipiente desidratado que tinha sido seco para remover substancialmente toda a água.

26ª. - Processo usado na reivindicação anterior caracterizado por se preparar uma composição "Mistura Determinante Menor" (MDM) liofilizada, estável à armazenagem, que pode ser reconstituída com água para dar uma solução que é usada para detectar alergia ou hipersensibilidade a penicilinas, e por compreender:

(a) ácido benzilpenilóico;

(b) de cerca de 1,60 até cerca de 1,85 moles de benzilpenicilina para cada mole de ácido benzilpenilóico;

(c) cerca de 1,0 mole de ácido benzilpenicilóico para cada mole de ácido benzilpenilóico em que pelo menos cerca de 94,5% do ácido benzilpenicilóico é o estereoisómero ácido (5R,6R)-benzil-D-penicilóico;

(d) de cerca de 9,38 até cerca de 10,86 moles de um sal de metal alcalino para cada mole de ácido benzilpenilóico;

(e) cerca de 1,0 mole de uma substância tampão de pH para cada mole de ácido benzilpenilóico; e

(f) uma quantidade de água que é suficientemente baixa para que a degradação do ácido benzilpenilóico, da benzilpenicilina e do ácido benzilpenicilóico seja substancialmente evitada.

27a. - Processo de acordo com a reivindicação 21, caracterizado por o referido sal de metal alcalino ser um cloreto de metal alcalino.

28a. - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por o referido sal de metal alcalino ser cloreto de potássio.

29a. - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por o referido sal de metal alcalino ser cloreto de sódio.

30a. - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por a substância tampão de pH ser fosfato de sódio.

31a. - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por compreender também a referida composição MDM estando contida num recipiente desidratado que tinha sido seco de forma a remover substancialmente toda a água.

Lisboa, 31 de Outubro de 1989



J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial de Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10-A, 1.º
1200 LISBOA