

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) BG

(11) 108188 A
7(51) A 61 K 31/715,
47/14, 9/127

ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 108188
(22) Заявено на 23.09.2003
(24) Начало на действие
на патента от:

Приоритетни данни

(31) 217/MUM/2001 (32) 01.03.2001 (33) IN

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 9 на 30.09.2004
(45) Отпечатано на
(46) Публикувано в бюлетин №
на
(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(71) Заявител(и):
BHARAT SERUMS & VACCINES LTD.,
THANE (IN)

(72) Изобретател(и):
Srikanth Annappa Pai
Sangeeta Hanurmesh Rivankar, Thane (IN)

(74) Представител по индустриална
собственост:
Никола Костадинов Васев, 1463 София,
ул. "Бузлуджа" 64

(86) № и дата на РСТ заявка:
PCT/IN2001/000040, 16.03.2001

(87) № и дата на РСТ публикация:
WO2002/069983, 12.09.2002

(54) ВОДЕН СЪСТАВ НА АМФОТЕРИЦИН В

(57) Изобретението се отнася до нискотоксичен, парентерален, воден състав, съдържащ амфотерицин В, свободен от диметилсулфоксид. Като допълнение към амфотерицин В съставите съдържат фосфолипиди и натриев хлорид и се стерилизират в автоклав. Изобретението се отнася и до метод за производство на тези състави без използване на разтворители за разтваряне на амфотерицин В. Съставите се използват за лечение на инвазивни фунгални инфекции.

26 претенции

BG 108188 A

ВОДЕН СЪСТАВ НА АМФОТЕРИЦИН В

ОБЛАСТ НА ТЕХНИКАТА

Изобретението се отнася до нискотоксични водни състави съдържащи Амфотерицин В. По-конкретно изобретението се отнася до нискотоксични водни състави на Амфотерицин В, съдържащи фосфолипиди, подходящи за парентерално прилагане.

ПРЕДШЕСТВАЩО СЪСТОЯНИЕ НА ТЕХНИКАТА

Амфотерицин В е един полиенно, антифунгално, антибиотично лекарство, подходящо за лечение на инвазивни фунгални инфекции. Обаче има висока нефротоксичност.

Токсичността на Амфотерицин В се понижава по различни методи:

- (а) улавяне на лекарството в липозоми и
- (б) превръщане на лекарството в богат на лекарство липиден комплекс (HDLC).

Получаване на липозомен Амфотерицин В

В US 4973465 (1990) е описан метод за получаването на HDLC, при който се използват стероли като холестерол или самостоятелно или с естествени фосфолипиди, фосфатидилхолин.

В US 5616334 (1997) е описан метод за получаване на липозомен Амфотерицин В, който включва първоначално получаването на празна мултиламеларна вазикла (MLVs) и след това смесването на MLVs с обработена с ултразвук суспензия на Амфотерицин В във вода. Този метод не включва използването на никакви разтворители. Но този метод води до получаване на липозомен Амфотерицин В, който е по-токсичен от Амфотерицин В във вид на богат на лекарство липиден комплекс HDLC. Методът включва екструзия на празните липозоми за оразмеряване през

подредени поликарбонатни филтри отново и отново в продължение на 10 пъти. Методът включва също и отделяне на невключения Амфотерицин В чрез центрофугиране след подаване на лекарството.

Този патент от САЩ описва също и метод за получаване на HDLC в “Ниско токсични лекарствено липидни системи”. В него е описан и метод за получаване на липиден комплекс на Амфотерицин В. Най-общо тези техники са както следва:

Получаване на HDLC: Най-напред лекарството Амфотерицин В се разтваря в разтворител такъв като диметилсулфоксид или метанол. Липидите, за предпочитане димиристоилфосфатидилхолин (DMPC) и димиристоилфосфатидилглицерол (DMPG) в молно отношение 7 : 3 се разтварят в разтворители като метанол, етанол, хлорирани въглеводороди. Разтворът на лекарството и разтворът на липида се смесват. Разтворителите се изпаряват при понижено налягане, в резултат на което се получава фин липидно-лекарствен филм. Филмът се хидратираща с воден разтвор като вода, физиологичен разтвор, фосфатен буфер или глицинов буфер, като се получава HDLC.

При една модификация на горния метод, полученият сух липидно-лекарствен филм се ресуспендира в разтворител като метиленхлорид и отново се изпарява при понижено налягане, преди хидратиране на филма.

В друг вариант на горния метод, сухият липидно-лекарствен филм се дехидратираща, като образува люспи, а люспите се хидратират след това с водния разтвор.

При друг метод, водният разтвор като физиологичен разтвор, буфер или вода се прибавя към разтвора, съдържащ лекарството и липида, а след това разтворителят се изпарява като се получава HDLC. При този метод не е необходимо образуването на тънък филм на фосфолипиди.

В един алтернативен метод за образуване на HDLC, описан в този патент, липидните частици (или липозоми) съдържащи биоактивно средство

като Амфотерицин В, се образуват като най-напред се получават мултиламеларни вазикולי, съдържащи от 6 до 50 % молни от биоактивното средство. След това вазиколите преминават през етап на нагряване от около 25 до около 60°C, най-добре около 60°C. Такъв цикъл води до получаването на по-високо подредени и по-ниско токсичен липиден комплекс на Амфотерицин В.

В този патент е описан и друг алтернативен метод за получаване на липиден комплекс на Амфотерицин В. При този метод липидите се смесват с разтвор на натриев хлорид (0.9%) и се хомогенизират с хомогенизатор. Амфотерицин В се разтваря в диметилсулфоксид и се прибавя към липидния разтвор по време на хомогенизацията и хомогенизирането продължава още тридесет минути, докато размерът на частиците се понижи под 10 микрона, за предпочитане до около 10 микрона. Получените липидни частици се разпределят по размери чрез филтруване с тангенциален поток. Недостатък на този метод е, че използваният разтворител диметилсулфоксид има висока температура на кипене и по тази причина е трудно да се отдели от продукта. Освен това следи от диметилсулфоксидът остават в крайния продукт. Не е желателно да имаме следи от такъв разтворител в състава за интравенозно прилагане, тъй като този разтворител е известен като хепатотоксичен (The Journal of Infectious Diseases 1991: 418-421).

HDLC са подходящи средства за понижаване на токсичността на Амфотерисин В, но техниките, описани в US 5616334 (1997) изискват използването на големи количества органичен разтворител, тъй като Амфотерицин В има ниска разтворимост в повечето от общоизползваните парентерално приемливи органични разтворители. По тази причина методът включва отделянето на големи количества органични разтворители чрез изпаряване. Алтернативно за разтварянето на Амфотерицин В се използват аprotни разтворители като диметилсулфоксид, диметилформамид. Тези аprotни разтворители имат висока температура на кипене и е установено, че

следи от тях остават в крайния продукт. Тъй като за тези аprotни разтворители се знае, че са хепатотоксични, не е желателно използването им в метода на производство.

Следователно има нужда от подобряване на метода за едромашабното производство на такива състави на Амфотерицин В – чрез намаляване на количеството на използвания разтворител. Това също така, би понижило производствената цена.

Главната цел на настоящото изобретение е да се разработи нискотоксичен парентерален воден състав, съдържащ Амфотерицин В и фосфолипиди от гледна точка да бъде прост и да се намали производствената цена. Следващо разширение на основната цел на настоящото изобретение е да се разработи нискотоксичен парентерален воден състав, съдържащ Амфотерицин В и фосфолипиди и свободен от следи на диметилсулфоксид и/или хлорирани въгледороди.

ТЕХНИЧЕСКА СЪЩНОСТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Настоящото изобретение се отнася до нискотоксичен, парентерален, свободен от диметилсулфоксид, воден състав, съдържащ Амфотерицин В, натриев хлорид и фосфолипиди.

Настоящото изобретение се отнася също и до метод за производство на нискотоксичен, парентерален, свободен от диметилсулфоксид, воден състав, съдържащ Амфотерицин В, натриев хлорид и фосфолипиди, включващ следните етапи:

- i) разтваряне на един или повече фосфолипиди в един или повече органични разтворители, избрани от групата на парентерално приемливи разтворители като метанол, етанол, изопропилов алкохол, хлороформ, тетрахлорметан и метилен хлорид и след това отделяне на разтворителя чрез изпаряване при понижено налягане като се образува сух филм от единичен или смесени фосфолипиди;

- ii) суспендиране на Амфотерицин В в парентерално приемлива водна фаза, несъдържаща натриев хлорид или суспендиране на микронизиран Амфотерицин В в парентерално приемлива водна фаза, която може да съдържа натриев хлорид;
- iii) Прибавяне на Амфотерицин В, получен в края на етап ii) към посочения филм от фосфолипиди, получен в края на етап i) и смесването им до получаване на суспензия от посочения Амфотерицин В с посочените фосфолипиди в посочената водна фаза;
- iv) Коригиране на рН на посочената суспензия, получена в края на етап iii) до 6.0-8.0 и след това хомогенизирането и, докато стане филтруваем през 2μ филтър от стъклени влакна;
- v) Прибавяне на достатъчно воден разтвор на натриев хлорид в края на етап iv), така че съдържанието на натриев хлорид в крайния продукт е поне 0.1% тегло/обем (w/v);
- vi) Филтруване на посочената хомогенизирана суспензия, получена в края на етап v) през 2μ филтър от стъклени влакна и поставяне на филтрата в ампули в среда от азот, запечатване на ампулите и стерилизация на запечатаните ампули, като се получава краен продукт, подходящ за парентерално прилагане.

Настоящото изобретение се отнася също и до нискотоксичен, парентерален воден състав на Амфотерицин В, съдържащ поне 0.1% w/v натриев хлорид и фосфолипиди, както е описано тук и произведен по метода на настоящото изобретение, както е описано по-горе.

Подробно описание на примерните изпълнения на изобретението

Съдържанието на Амфотерицин В в състава на настоящото изобретение варира от 0.1% w/v до 1.0% w/v от състава, за предпочитане съдържанието на Амфотерицин В е 0.5% w/v от състава.

Общото съдържание на фосфолипиди варира от 0.1% w/v до 1.0% w/v от състава, за предпочитане съдържанието на фосфолипиди е от около 0.4% w/v до около 0.6% w/v.

Тегловното отношение на Амфотерицин В към фосфолипидите е от около 1:0.5 до около 1:1.5. Предпочетеното тегловно отношение е от около 1:0.8 до около 1:1.2.

При този метод фосфолипидите са избрани от групата яйчен фосфатидилхолин, или смес от димиристоилфосфатидилхолин (DMPC) и димиристоилфосфатидилглицерол (DMPG). Когато се използва смес от двата фосфолипида димиристоилфосфатидилхолин (DMPC) и димиристоилфосфатидилглицерол (DMPG), тегловното отношение между фосфолипидите DMPC : DMPG е между 7:1 и 7:15, за предпочитане 7:3.

Разтворите, използвани за разтваряне на фосфолипидите са избрани от групата, състояща се от алкохолни разтвори като етанол, метанол, изопропилов алкохол със или без добавяне на хлорирани въглеводороди като хлороформ, метилен хлорид, тетрачлор метан. Като разтворители за разтваряне на фосфолипиди могат да се използват самостоятелно както алкохолните разтворители, така и хлорираните въглеводороди. Алтернативно, алкохолните разтворители и хлорираните въглеводороди могат да бъдат използвани в комбинация за разтваряне на фосфолипидите. Когато не са избрани хлорирани въглеводороди, съставът е свободен от хлорирани въглеводороди. Предпочетеният разтворител за разтваряне на фосфолипиди е етанол.

Микронизираният Амфотерицин В, където е използван в изобретението, е микронизиран в мелница с въздушна турбина до размери на частиците под 10 микрона.

pH на водната фаза, използвана за диспергиране на Амфотерицин В се коригира до 6.0-8.0 като се използва разреден разтвор на натриева основа, когато не се използва буферен разтвор в състава.

Водната фаза за суспендиране на Амфотерицин В е парентерално приемлив преносител като вода или фосфатен буфер. Когато се използва микронизиран Амфотерицин В, водната фаза използвана за суспендиране на Амфотерицин В може да бъде физиологичен разтвор, фосфатен буфер – физиологичен разтвор, вода или фосфатен буфер.

Натриевият хлорид се прибавя във вид на воден разтвор след хомогенизацията и преди филтруване. Обаче, в случаите когато се използва микронизиран Амфотерицин В, натриевият хлорид може да бъде прибавен на всеки етап на производството от ii) до iv), както бяха дефинирани по-рано.

Концентрацията на натриев хлорид е от 0.1% до 0.9% w/v спрямо състава, за предпочитане от 0.4% до 0.9% w/v спрямо състава.

Хомогенизацията се осъществява в хомогенизатор с високо налягане, при не по-малко от 5000 psi, докато продуктът стане филтруваем през 2μ филтър от стъклени влакна.

В друго примерно изпълнение на изобретението, липидната суспензия с Амфотерицин В се обработва с ултразвук в соникатор преди хомогенизацията с цел получаване на еднородна суспензия след коригиране на рН до около 6.0 – 8.0. За корекция на рН се използва разреден разтвор на натриева основа, когато в състава не е използван буферен разтвор.

Хомогенизираната липидна суспензия с Амфотерицин В се филтрува през 2μ филтър от стъклени влакна като се следва обикновената процедура за филтруване под налягане като се използва азот или сгъстен въздух.

След филтруване хомогенизираната суспензия се поставя в стъкленици в азотна среда и се стерилизира в конвенционален автоклав при 110°C до 121°C, за предпочитане при 121°C за 20 минути или при 110°C за 40 минути. Стерилизацията може да се проведе по специализирани процеси за обработка в автоклав, при които продължителността на цикъла на нагриване и охлаждане се намалява чрез използване на система за бързо нагриване и бързо охлаждане.

По известния метод за получаване на HDLC, описан в US 4973465 (1990) и US 5616334 (1997), Амфотерицин В се разтваря в много големи количества органични разтворители. В един от примерите в US 5616334 (1997) за получаването на една ампула Амфотерицин В от 20 мл липиден комплекс на Амфотерицин В, еквивалентен на 100 мг Амфотерицин В, се използва 1 л метанол. В друг пример за намаляване количеството на разтворителя, за разтварянето на 100 мг Амфотерицин се използват 5 мл диметилсулфоксид, но не се препоръчва използването на диметилсулфоксид като разтворител за интравенозно инжектиране, тъй като е известна неговата хепатотоксичност.

По метода на настоящото изобретение, Амфотерицин В не е напълно разтворен в никакви разтворители, докато при конвенционалния метод се използва диметилсулфоксид за разтваряне на Амфотерицин В.

По метода на настоящото изобретение, когато Амфотерицин В, суспендиран във водната фаза съдържаща натриев хлорид, се прибави към липидния филм и се хомогенизира, се наблюдава образуване на агрегати и хомогенизираният продукт не може да се филтрува през 2μ филтър от стъклени влакна по обикновената процедура за филтруване.

След обширни изследвания, беше установено, че когато водната фаза, използвана за суспендиране на Амфотерицин В, е приготвена без добавката на каквото и да е количество натриев хлорид, хомогенизацията протича спокойно, без никакво агрегиране на суспензията и хомогенизираната маса може да се филтрува.

Обаче, по време на разработване на изобретението се установи, че натриевият хлорид е важен за състава за понижаване на токсичността. Водни състави на Амфотерицин В, съдържащи различни концентрации натриев хлорид при дози 80 мг/кг телесно тегло, се инжектират на мишки в групи по осем. Водни състави на Амфотерицин В без никакъв натриев хлорид, както е описан в примерите по-долу, се приготвя и инжектира отделно. Преди всяко

инжектиране, обем еквивалентен на 80 мг/кг телесно тегло се разрежда до 0.5 мл с 5% инжекционна декстроза, за да стане изотоничен. Процентът смъртност, получен в края на 72 часа е показан в Таблица 1.

Таблица 1

Концентрация на натриев хлорид във воден състав на Амфотерицин В	Приготвен, съгласно пример	Процент смъртност при мишки при доза 80мг/кг
0.9% w/v	III	Нула
0.7% w/v	IV	Нула
0.4% w/v	V	Нула
0.1% w/v	VI	50%
Нула	XIII	87.5%

От Таблица 1 става ясно, че една минимална концентрация от 0.1% натриев хлорид е важна за понижаване на токсичността. Следователно, по време на хидратирането на фосфолипидния филм, се използва водна фаза без никакъв натриев хлорид, за да се извърши хомогенизацията спокойно и да се получи продукт, който може лесно да се филтрува през 2μ филтър от стъклени влакна. Натриевият хлорид се прибавя към разтвора след процеса на хомогенизация. Прибавянето на натриев хлорид към състава на настоящото изобретение е важно, за да се намали токсичността на Амфотерицин В. Дори с прибавянето на 0.1% w/v натриев хлорид, LD₅₀ е 80 мг/кг, която е много по-висока от конвенционалния препарат Амфотерицин В, съдържащ натриев дезоксихолат, която е около 4 мг/кг.

След голям брой експерименти беше установено, че понижаването на средния размер на частиците на Амфотерицин В под 10 микрона чрез микронизиране, помага да се преодолее проблема за агрегиране по време на хомогенизация. Анализите за размера на частиците на Амфотерицин В преди и след микронизацията са проведени с Symaptic HELOS Particle Size Analyser. Микронизацията на Амфотерицин В помага също за преодоляване на

проблема с филтруването, свързан с наличието на натриев хлорид в хомогенизираната водна суспензия, съдържаща немикронизирани Амфотерицин В и фосфолипиди.

Филтруването на хомогенизираната маса, като се използва микронизиран Амфотерицин В е лесно и могат да се използват обикновени филтри. В известния метод от US 5616334 (1997), филтруването на HDLC се осъществява чрез криволичеца траектория или директно през мембранен филтър, като поликарбонатен филтър.

По този начин в едно примерно изпълнение на изобретението, може да се преодолее проблема за агрегиране и филтруване при използване на немикронизиран Амфотерицин В чрез избягване добавянето на натриев хлорид във водната фаза. Обаче, беше установено, че добавянето на натриев хлорид в концентрация поне 0.1% w/v е важно за намаляване на токсичността на воден състав на Амфотерицин В. Проблемът за хомогенизирането и филтруването се решава като натриевият хлорид се прибавя след етапа на хомогенизация.

В тази връзка, в едно примерно изпълнение на изобретението, в метода за производство на нискотоксичен стерилен воден състав на Амфотерицин В, съдържащ поне 0.1% w/v натриев хлорид, водната фаза, използвана за диспергиране на не-микронизиран Амфотерицин В е вода или фосфатен буфер, несъдържащ натриев хлорид. Натриевият хлорид се прибавя едва след хомогенизиране на водната суспензия, съдържаща немикронизиран Амфотерицин В и фосфолипиди.

Във второ примерно изпълнение на изобретението, проблемът за агрегирането и филтруването на суспензията от фосфолипиди и водна фаза, съдържаща Амфотерицин В, се решава чрез използване на микронизиран Амфотерицин В.

В комбинация от двете примерни изпълнения, когато използваният Амфотерицин В е микронизиран и суспендиран във водната фаза,

несъдържаща натриев хлорид, натриевият хлорид се прибавя към водната фаза преди, по време или след етапа на хомогенизиране.

ПРИМЕРИ ЗА ИЗПЪЛНЕНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Изобретението се илюстрира със следните примери. Примерите са само да го илюстрират и по никакъв начин не ограничават обхвата му.

Има 4 групи примери, както е показано по-долу в Таблица 2.

Таблица 2

Група	Примери №	Амфотерицин В	Водна фаза, използвана за диспергиране на Амфотерицин В	Добавка на сол	Примерно изпълнение на изобретението
A	I – II	Немикронизиран	Без съдържание на сол	След етап на хомогенизация	Първо
B	III – VI } VIII – IX}	Микронизиран	Със съдържание на сол	-----	Второ
	VII*	Микронизиран	Със съдържание на сол	-----	Второ
C	X - XII	Микронизиран	Без съдържание на сол	По време / след етапа на хомогенизация	Първо & Второ
D	XIII	Микронизиран	Без съдържание на сол	-----	Не е от изобретението
	XIV	Немикронизиран			

*Разтворителят, използван за разтваряне на фосфолипиди е само етанол.

Всички суровини, използвани в тези примери са с качество за парентерално прилагане. Използваното оборудване е от конвенционално естество. Всички процеси са проведени в помещения с контролирана среда, което е изискване при производството на стерилни продукти.

Използваният в тези примери Амфотерицин В е с качество за парентерално прилагане и е получен от Alprama и отговаря на изискванията на USP спецификациите. Микронизираният Амфотерицин В, където е използван в примерите е получен чрез микронизиране на Амфотерицин В

като се използва турбинна мелница до размер на частиците по-малък от 10 микрона.

Фосфолипидите DMPC и DMPG използвани в примерите са с качество за парентерално прилагане и са получени от Avanti Polar Lipids.

Фосфолипидът яйчен фосфатидилхолин, използван в примерите е с качество за парентерално прилагане и е произведен от Lipoids.

Органичните разтворители, използвани в примерите са с качество "Чисти за анализ".

Фосфатният буфер, използван в примерите е получен съгласно Indian Pharmасороеia.

Фосфатния буфер-физиологичен разтвор с рН 7.4, използван в примерите е получен чрез разтваряне на 1.19 г динатриев хидроген ортофосфат, 0.095 г калиев дихидроген ортофосфат, и 43 г натриев хлорид в 400 мл вода. Прибавя се вода, за да се достигне обем 500 мл.

Група А: Пример I и II

Компонентите, използвани в тези примери са дадени в Таблица 3, заедно с процедурата, дадена по-долу:

Таблица 3

		Пример I	Пример II
А)	Амфотерицин В	1.00 г	1.00 г
Б)	DMPC	0.68 г	0.68 г
В)	DMPG	0.30 г	0.30 г
Г)	Етанол*	200 мл	200 мл
Д)	Хлороформ*	10 мл	10 мл
Е)	рН – на дисперсията преди хомогенизация	6.95** 6.80**	7.2 7.2
Ж)	Натриев хлорид	1.80 г	1.80 г
З)	Вода прибавена до	200 мл	---
И)	Фосфатен буфер рН 7.2, добавен до	---	200 мл

*не остава в крайния продукт

**коригирано с използване на 0.1 N разтвор на натриева основа

Процедура:

В Пример I Амфотерицин В се суспендира в 150 мл вода при разбъркване и барбутиране на азот. рН се коригира до около 6.95 с 0.1 N разтвор на натриева основа.

В Пример II, Амфотерицин В се суспендира в 150 мл фосфатен буфер с рН 7.2 при разбъркване и барбутиране на азот.

Фосфолипидите DMPC и DMPG се разтварят в хлороформ в ротационна колба. След пълното разтваряне на фосфолипидите се прибавя етанол и се оставят да се смесят при въртене на колбата с различна скорост при продухване със силна струя от азот. рН на получената липидна суспензия на Амфотерицин В в пример I се коригира до 6.80 с 0.1 N разтвор на натриева основа. Съдържанието на колбата се обработва с ултразвук в сонатор за 1 час. Обемът се довежда до 180 мл с вода в Пример I и с фосфатен буфер с рН 7.2 в Пример II.

Липидната суспензия на Амфотерицин В след това се хомогенизира, в хомогенизатор с високо налягане APV, докато хомогенизираният продукт стане филтруваем през 2μ филтър от стъклени влакна.

Натриевият хлорид се разтваря във вода и се разрежда до 20 мл с вода в Пример I. В Пример II, натриевият хлорид се разтваря и разрежда до 20 мл с фосфатен буфер с рН 7.2. Този разтвор на натриев хлорид се прибавя към хомогенизираната липидна суспензия на Амфотерицин В при ниска скорост на разбъркване и азотна среда. Продуктът се прехвърля обратно в хомогенизатора и се пуска на рециркулация без прилагане на налягане. След това се филтрува през 2μ филтър от стъклени влакна в стъклени контейнери под азот, запечатва се и се обработва в автоклав при 110°C за 40 минути. В Пример II обработката в автоклав се провежда при 110°C за 40 минути с бърз цикъл на нагряване и цикъл на охлаждане.

Група В:

1) Примери от III до VI

Компонентите, използвани в примерите са дадени в Таблица 4 заедно с процедурата, дадена по-долу. Количеството на натриевия хлорид е променяно от 1.8 до 0.2 г.

Таблица 4

		Примери			
		III	IV	V	VI
A)	Амфотерицин В (микронизиран)	1 г	1 г	1 г	1 г
Б)	DMPC	0.68 г	0.68 г	0.68 г	0.68 г
В)	DMPG	0.30 г	0.30 г	0.30 г	0.30 г
Г)	Натриев хлорид	1.80 г	1.40 г	0.80 г	0.20 г
Д)	Етанол	200 мл	200 мл	200 мл	200 мл
Е)	Хлороформ	10 мл	10 мл	10 мл	10 мл
Ж)	рН -на дисперсията преди хомогенизация	7.20**	7.15**	7.05**	7.20**
		7.00**	7.10**	7.15**	7.00**
З)	Вода, добавена до	200 мл	200 мл	200 мл	200 мл

*не остава в крайния продукт

**коригирано с използване на 0.1 N разтвор на натриева основа

Процедура:

Фосфолипидите DMPC и DMPG се разтварят в хлороформ в ротационна колба. След пълното разтваряне на фосфолипидите се прибавя етанол и се оставят да се смесят при въртене на колбата с различна скорост при силна струя от азот. Този алкохолен разтвор се изпарява на ротационен изпарител при понижено налягане до пълна сухота. Продухва се с азот в продължение на 30 минути след пълното отделяне на разтворителите.

Натриевият хлорид се разтваря в 175 мл вода. В продължение на 15 минути в този разтвор барбутира азот. Микронизираният Амфотерицин В се суспендира в разтвора на натриевия хлорид при непрекъснато разбъркване и барбутиране на азот. рН се коригира с прибавяне на 0.1N разтвор на натриева основа до стойностите, показани в Таблица 4 за всеки пример.

Сухият липиден филм се хидратира в ротационната колба с водната суспензия на Амфотерицин В, приготвена както е описано по-горе при непрекъснато въртене на колбата и продухване с азот. рН на така получения липиден комплекс на Амфотерицин В се коригира, както е показано на Таблица 4. Съдържанието на колбата се обработва с ултразвук в соникатор в продължение на 1 час.

Обемът се коригира до 200 мл с вода.

Липидната суспензия на Амфотерицин В след това се хомогенизира, като се използва хомогенизатор с високо налягане докато продуктът стане филтруваем през 2μ филтър от стъклени влакна.

Хомогенизираната липидна суспензия на Амфотерицин В се филтрува през 2μ филтър от стъклени влакна и се поставя в стъклени контейнери под азот, запечатва се и се подлага на обработка в автоклав при 110°C за 40 минути с бързи цикъл на нагряване и цикъл на охлаждане.

Изследванията за токсичност при мишки на продукти от Примери III, IV и V при доза 80 мг/кг телесно тегло не показват никаква смъртност, докато Пример VI показва смъртност 50%.

2) Примери от VII до IX

Компонентите, използвани в примера са дадени в Таблица 5 заедно с процедурата, дадена по-долу.

Таблица 5

		Примери		
		VII	VIII	IX
A)	Амфотерицин В (микронизиран)	1 г	1 г	1 г
Б)	DMPC	0,68 г	---	0,68 г
В)	DMPG	0.30 г	---	0.30 г
Г)	Яйчен фосфотидилхолин	---	0.90 г	---
Д)	Натриев хлорид	1.80 г	1.80 г	***
Е)	Етанол*	300 мл	200 мл	200 мл
Ж)	Хлороформ*	---	15 мл	10 мл

З)	рН - на дисперсията преди хомогенизация	7.15** 7.05**	7.15** 6.95**	7.40 7.40
И)	Вода добавена до	200 мл	200 мл	---
Й)	Фосфатен буфер-физиологичен разтвор, добавен до	---	---	200 мл

*не остава в крайния продукт

**коригирано с използване на 0.1 N разтвор на натриева основа

***~2 г, внесени с Фосфатен буфер-физиологичен разтвор

Процедура:

В Пример VII фосфолипидите DMPC и DMPG се разтварят в етанол в ротационна колба, като колбата се върти с различна скорост при продухване с азот.

В Пример VIII, яйчният фосфолипид фосфатидилхолин се разтваря в хлороформ в ротационна колба, а в Пример IX фосфолипидите DMPC и DMPG се разтварят в хлороформ в ротационна колба. Етанолът се прибавя след пълното разтваряне на фосфолипидите в хлороформ и се оставят да се смесят като колбата се върти с различна скорост при продухване с азот.

В тези Примери така получените фосфолипидни разтвори се изпаряват в ротационни изпарители при понижено налягане до напълно сухо. Продухва се с азот в продължение на 30 минути след пълното отделяне на разтворителите.

В Примери VII и VIII, натриевият хлорид се разтваря в 175 мл вода. В продължение на 15 минути в този разтвор барбутира азот. Микронизираният Амфотерицин В се суспендира в разтвора на натриевия хлорид при непрекъснато разбъркване и барбутиране на азот. рН се коригира до 7.15 с прибавяне на 0.1N разтвор на натриева основа.

В Пример IX микронизираният Амфотерицин В се суспендира в 175 мл фосфатен буфер-физиологичен разтвор с рН 7.4 при непрекъснато разбъркване. Азотът барбутира в продължение на 15 минути. Фосфатният буфер-физиологичен разтвор внася около 2 г натриев хлорид.

Сухият липиден филм се хидратира в ротационна колба с водната суспензия на микронизирания Амфотерицин В, получен както е описано по-горе при непрекъснато въртене на колбата и непрекъснато продухване с азот. рН на така получената липидна суспензия на Амфотерицин В се коригира до 7.05 в Пример VII и до 6.95 в пример VIII с 0.1N разтвор на натриева основа.

Липидна суспензия на Амфотерицин В се долива до обем 200 мл с вода в Примери VII и VIII.

Липидна суспензия на Амфотерицин В се долива до обем 200 мл с фосфатен буфер-физиологичен разтвор с рН 7.4 в Пример IX.

След това липидната суспензия на Амфотерицин В се хомогенизира, като се използва хомогенизатор с високо налягане APV, докато хомогенизираният продукт стане филтруваем през 2μ филтър от стъклени влакна.

Хомогенизираната липидна суспензия на Амфотерицин В се филтрува през 2μ филтър от стъклени влакна и се поставя в стъклени контейнери под азот, запечатва се и се подлага на обработка в автоклав при 121°C за 20 минути за Пример IX и при 110°C за 40 минути за Примери VII и VIII.

Така получената стерилна водна композиция от Пример VII е подложена на изследвания за токсичност при мишки и изследвания за стабилност. Резултатите от изследванията за токсичност са дадени в Таблица 6, а от изследванията за стабилност – в Таблица 7.

Анализ за размера на частиците:

Размерът на частиците на водната композиция на Амфотерицин В, получени в Пример VII е измерен с Model 770 AccuSizer of Particle Size Systems, Inc., USA. Установено е, че 95% от частиците имат размер по-малък от 1.63 микрона, а 90% от частиците имат размер под 1.28 микрона.

Изследване на токсичността при мишки:

Токсичността на водната суспензия на Амфотерицин В, получена в Пример VII е изследвана върху мишки, заедно с конвенционалния продукт

Амфотерицин В, съдържащ натриев дезоксихолат. Наблюденията са отразени както следва:

Таблица 6. Изследване на акутна токсичност при мишки

LD ₅₀ (интравенозно) на Амфотерицин В, конвенционален продукт	-	3.5 мг/кг телесно тегло
LD ₅₀ (интравенозно) на водна суспензия на Амфотерицин В от Пример VII	-	>80 мг/кг телесно тегло

Леталната доза LD₅₀ при мишки на водната композиция на Амфотерицин В, получена в лабораторията след единично инжектиране е > 80 мг/кг телесно тегло. Тя е повече от 20 пъти по-висока от LD₅₀ след единично инжектиране на конвенционалния продукт Амфотерицин В, съдържащ натриев дезоксихолат.

Таблица 7

Данни за стабилността на водна композиция на Амфотерицин В
при препоръчителна температура на съхранение от 2 до 8°C

Период	Външен вид	Съдържание на Амфотерицин В
Начален	Жълтооцветена суспензия, която се утаява при съхранение и се диспергира равномерно при леко разкращане	100.6%
6 месеца	Жълтооцветена суспензия, която се утаява при съхранение и се диспергира равномерно при леко разкращане	100.3%
1 година	Жълтооцветена суспензия, която се утаява при съхранение и се диспергира равномерно при леко разкращане	99.8%
18 месеца	Жълтооцветена суспензия, която се утаява при съхранение и се диспергира равномерно при леко разкращане	98.3%
2 години	Жълтооцветена суспензия, която се утаява при съхранение и се диспергира равномерно при леко разкращане	96.5%

Този пример ясно показва, че парентералната водна композиция на Амфотерицин В няма дори и следи от диметилсулфоксид или хлорирани въглеводороди, когато е получена по подобрения метод на настоящото изобретение, където тези разтворители не се използват, отговаря на общите изисквания за инжекционни суспензионни продукти в търговската мрежа. Новата водна композиция, получена по метода, описан в Пример VII е напълно свободна от вредни разтворители, каквито са диметилсулфоксид и хлорираните въглеводороди.

Група С: Примери от X до XII

Компонентите, използвани в тези примери са дадени в Таблица 8, а процедурата е дадена по-долу.

Таблица 8

		Примери		
		VII	VIII	IX
A)	Амфотерицин В (микронизиран)	1 г	1 г	1 г
Б)	DMPC	0,68 г	0.68 г	0,68 г
В)	DMPG	0.30 г	0.30	0.30 г
Д)	Натриев хлорид	1.80 г	1.80 г	1.80 г
Е)	Етанол*	200 мл	200 мл	200 мл
Ж)	Хлороформ*	10 мл	10 мл	10 мл
З)	рН - на дисперсията преди хомогенизация	7.15**	7.30**	7.2
		6.90**	7.00**	7.2
И)	Вода добавена до	200 мл	200 мл	---
Й)	Фосфатен буфер-физиологичен разтвор, добавен до	---	---	200 мл

*не остава в крайния продукт

**коригирано с използване на 0.1 N разтвор на натриева основа

Процедура:

Фосфолипидите DMPC и DMPG се разтварят в хлороформ в ротационна колба. След пълното разтваряне на фосфолипидите се прибавя етанол и се оставят да се смесят като колбата се върти с различна скорост при продухване с азот. Така получените фосфолипидни разтвори се изпаряват в ротационни изпарители при понижено налягане до напълно сухо. Продухва се с азот в продължение на 30 минути след пълното отделяне на разтворителите.

Микронизираният Амфотерицин В се суспендира в 150 мл вода в Примери X и XI и в 150 мл фосфатен буфер с рН 7.2 в Пример XII при непрекъснато разбъркване и барбутиране на азот. рН се коригира с прибавяне на 0.1N разтвор на натриева основа до стойности, както са показани в Таблица 8 за Примери X и XI.

Сухият липиден филм се хидратира в ротационна колба с водната суспензия на микронизирания Амфотерицин В, получен както е описано по-горе при непрекъснато въртене на колбата и непрекъснато продухване с азот. рН на така получената липидна суспензия на Амфотерицин В се коригира с 0.1N разтвор на натриева основа до стойности, както са показани в Таблица 8.

Липидна суспензия на Амфотерицин В се долива до обем 180 мл с вода в Примери X и XI, докато в Пример XII липидна суспензия на Амфотерицин В се долива до обем 180 мл с фосфатен буфер с рН 7.2. В Пример XI съдържанието на колбата се обработва с ултразвук в соникатор в продължение на 1 час.

В примери X и XII, липидната суспензия на Амфотерицин В се хомогенизира, като се използва хомогенизатор с високо налягане APV, докато хомогенизираният продукт стане филтруваем през 2μ филтър от стъклени влакна.

Натриевият хлорид се разтваря във вода и се разрежда до 20 мл с вода в Пример X. В пример XII натриевият хлорид се разтваря във фосфатен буфер с рН7.2 и се разрежда до 20 мл с фосфатен буфер с рН7.2. Този разтвор на натриев хлорид се добавя към хомогенизираната липидна суспензия при ниска скорост на разбъркване и непрекъснато продухване с азот. Полученият продукт се връща отново в хомогенизатора и се оставя на рециркулация в продължение на 5 минути, без прилагане на налягане.

В Пример XI липидната суспензия на Амфотерицин В след обработка с ултразвук се прекалва три пъти през хомогенизатор под налягане, като се използва хомогенизатор с високо налягане APV. Натриевият хлорид се разтваря във вода и се разрежда до 20 мл с вода. Този разтвор на натриев хлорид се прибавя при ниска скорост на разбъркване към липидната суспензия на Амфотерицин В, получена в края на третото минаване през хомогенизатора. Полученият продукт се връща отново в хомогенизатора и се оставя на рециркулация в продължение на 5 минути, без прилагане на налягане. След това продуктът се хомогенизира отново под налягане, докато стане филтруваем през 2μ филтър от стъклени влакна.

След това продуктът се филтрува през 2μ филтър от стъклени влакна. Филтруваният продукт се поставя в стъклени контейнери под азот, запечатва се и се подлага на обработка в автоклав при 110°C за 40 минути с цикли за бързо нагряване и бързо охлаждане.

Група D: Примери XIII и XIV

Компонентите, използвани в тези примери са дадени в Таблица 9, а процедурата е дадена по-долу.

Таблица 9

		Пример XIII	Пример XIV
А)	Амфотерицин (микронизиран)	1 г	---
Б)	Амфотерицин (немикронизиран)	---	1..г

Б)	DMPC	0,68 г	0.68 г
В)	DMPG	0.30 г	0.30
Г)	Етанол*	200 мл	200 мл
Д)	Хлороформ*	10 мл	10 мл
Е)	Вода добавена до	200 мл	200 мл
Ж)	pH - на дисперсията преди хомогенизация	7.25**	7.20**
		7.15**	7.10**

*не остава в крайния продукт

**коригирано с използване на 0.1 N разтвор на натриева основа

Процедура:

Фосфолипидите DMPC и DMPG се разтварят в хлороформ в ротационна колба. След пълното разтваряне на фосфолипидите се прибавя етанол и се оставят да се смесят като колбата се върти с различна скорост при продухване с азот. Така получените фосфолипидни разтвори се изпаряват в ротационни изпарители при понижено налягане до напълно сухо. Продухва се с азот в продължение на 30 минути след пълното отделяне на разтворителите.

В Пример XIII, микронизираният Амфотерицин В се суспендира във вода при разбъркване и барбутиране на азот. В Пример XIV, немикронизираният Амфотерицин В се суспендира във вода при разбъркване и барбутиране на азот. pH се коригира с прибавяне на 0.1N разтвор на натриева основа до стойности, както са показани в Таблица 9.

Сухият липиден филм се хидратира в ротационна колба с водната суспензия на микронизирания Амфотерицин В, получен както е описано по-горе при непрекъснато въртене на колбата и непрекъснато продухване с азот. pH на така получената липидна суспензия на Амфотерицин В се коригира с 0.1N разтвор на натриева основа до стойности, както са показани в Таблица 9. В Пример XIV съдържанието на колбата се обработва с ултразвук в

продължение на 1 час. Липидна суспензия на Амфотерицин В се долива до обем 200 мл с вода.

След това липидната суспензия на Амфотерицин В се хомогенизира, като се използва хомогенизатор с високо налягане APV, докато хомогенизирания продукт стане филтруваем през 2μ филтър от стъклени влакна. След това продуктът се филтрува през 2μ филтър от стъклени влакна. Филтруваният продукт се поставя в стъклени контейнери под азот, запечатва се и се подлага на обработка в автоклав при 121°C в продължение на 20 минути.

Изследване на токсичността при мишки:

Токсичността на водната композиция на Амфотерицин В (без натриев хлорид), получена в Примери XIII и XIV се изследва върху мишки заедно с водна композиция на Амфотерицин В, съдържаща натриев хлорид, както е описано в Пример III. Наблюденията са отразени в Таблица 10 по-долу:

Таблица 10

Изследване на акутната токсичност при мишки

LD ₅₀ (интравенозно) на водна композиция на Амфотерицин В (с натриев хлорид) от Пример III	-	>80 мг/кг телесно тегло
LD ₅₀ (интравенозно) на водна композиция на Амфотерицин В (без натриев хлорид) от Пример XIII и XIV	-	40 мг/кг телесно тегло

Леталната доза LD₅₀ при мишки на водната композиция на Амфотерицин В, получена без натриев хлорид, съгласно Пример XIII и XIV след единично инжектиране е 40 мг/кг телесно тегло, в сравнение с > 80 мг/кг при водна композиция на Амфотерицин В, получена с натриев хлорид,

съгласно Пример III. Това доказва, че натриевият хлорид е необходим при производство водни композиции на Амфотерицин В с ниска токсичност.

Предимства на изобретението:

Предимствата на настоящото изобретение са както следва:

- i) Водната композиция на Амфотерицин В е получена без използването на диметилсулфоксид, за който е известно, че е хепатотоксичен.
- ii) Поради ниската разтворимост на парентерално приемливи органични разтворители (0.1 мг/мл в метанол) необходими са големи количества органичен разтворител, което прави метода по дълъг, времеемък и икономически нецелесъобразен. Методът от настоящото изобретение не изисква разтваряне на Амфотерицин В в никакъв органичен разтворител.
- iii) Методите от състоянието на техниката изискват специализирани техники за филтруване като филтруване с тангенциален поток или екструзия. По метода от настоящото изобретение се използват конвенционално филтруване.
- iv) Продуктът, получен по метода на настоящото изобретение е стабилен при стерилизация в автоклав, което го прави подходящ за интравенозна употреба.

Настоящото изобретение е просто за изпълнение, ефективно по отношение на цената и е едно подобрение на методите от състоянието на техниката. Най-важният признак на метода в това изобретение е високата чистота на получения продукт, без риска от задържане на каквито и да са следи от отровни разтворители, тъй като такива разтворители не се използват в него.

ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Метод за производство на ниско токсичен, парентерален, воден състав, съдържащ Амфотерицин В, натриев хлорид и фосфолипиди и свободен от диметилсулфоксид, включващ етапи на:
 - vi) Разтваряне на един или повече фосфолипиди в един или повече парентерално приемливи органични разтворители и след това отделяне на разтворителите чрез изпаряване при понижено налягане, при което се образува сух филм от единичен или смесени фосфолипиди;
 - vii) Суспендиране на Амфотерицин В в парентерално приемлива водна фаза, свободна от натриев хлорид, или суспендиране на микронизиран Амфотерицин В, в парентерално приемлива водна фаза, която може да съдържа натриев хлорид;
 - viii) Прибавяне на водната фаза, съдържаща Амфотерицин В, приготвена в етап ii) към посочения филм от фосфолипиди, получени на етап i) и смесването им до получаване на суспензия на посочения Амфотерицин В, заедно с посочените фосфолипиди в посочената водна фаза;
 - ix) Коригиране на рН на посочената суспензия, полечена в етап iii) до 6.0 – 8.0 и след това хомогенизирането и, докато стане филтруваема през 2μ филтър от стъклени млакна; и
 - x) Прибавяне на достатъчно количество воден разтвор на натриев хлорид в края на етап iv), така че съдържанието на натриев хлорид в крайния продукт е поне 0.1%w/v.

2. Метод, както е посочен в претенция 1, допълнително включващ:
 - vi) Филтруване на посочената хомогенизирана суспензия, получена в края на етап v) през 2μ филтър от стъклени влакна и напълването на филтрата в ампули в среда от азот, запечатване на ампулите и стерилизация на посочените ампули чрез обработка в автоклав, при което се получава краен продукт, подходящ за парентерално прилагане.

3. Метод съгласно претенция 1 или претенция 2, характеризиращ се това, че фосфолипидите са избрани от яйчен фосфатидилхолин (EPC) или смес от димиристоилфосфатидилхолин (DMPC) и димиристоилфосфатидилглицерол натриева сол (DMPG).
4. Метод съгласно която и да е от претенции от 1 до 3, характеризиращ се с това, че посоченият органичен разтворител е избран от групата, състояща се от алкохолни разтворители, хлорирани въглеводороди или техни смеси.
5. Метод съгласно претенция 4, характеризиращ се с това, че органичният разтворител е избран от групата, състояща се от метанол, етанол, изопропилов алкохол, хлороформ, тетрачлорметан или метилен хлорид.
6. Метод съгласно претенция 4, характеризиращ се с това, че органичният разтворител е етанол.
7. Метод съгласно която и да е от претенции от 1 до 6, характеризиращ се с това, че съдържанието на Амфотерицин В е от около 0.1% до 1% w/v от композицията.
8. Метод съгласно претенция 7, характеризиращ се с това, че съдържанието на Амфотерицин В е 0.5% w/v от композицията.
9. Метод съгласно която и да е от претенции от 1 до 8, характеризиращ се с това, че натриевият хлорид е между 0.1% до 0.9% w/v от композицията.

10. Метод съгласно претенция 9, характеризиращ се с това, че натриевият хлорид е между 0.4% до 0.9% w/v от композицията.
11. Метод съгласно която и да е от претенции от 1 до 10, характеризиращ се с това, че съдържанието на фосфолипиди е от 0.1% до 1% w/v от композицията.
12. Метод съгласно която и да е от претенции от 1 до 11, характеризиращ се с това, че съдържанието на фосфолипиди е от 0.4% до 0.6% w/v от композицията.
13. Метод съгласно която и да е от претенции от 1 до 12, характеризиращ се с това, че тегловното отношение на Амфотерицин В към фосфолипидите е от около 1 : 0.8 до около 1 : 1.2.
14. Метод съгласно която и да е от претенции от 1 до 13, характеризиращ се с това, че фосфолипидите са димиристоилфосфатидилхолин (DMPC) и димиристоилфосфатидилглицерол (DMPG) тегловното отношение DMPC : DMPG е от около 7 : 1 до около 7 : 15.
15. Метод съгласно претенция 14, характеризиращ се с това, че тегловното отношение DMPC : DMPG е от около 7 : 3.
16. Метод съгласно която и да е от претенции от 1 до 15, характеризиращ се с това, че се използва немикронизиран Амфотерицин В и парентерално приемливата водна фаза, използвана в етап ii) от претенция 1 е вода или фосфатен буфер.

17. Метод съгласно която и да е от претенции от 1 до 15, характеризиращ се с това, че се използва микронизиран Амфотерицин В и парентерално приемливата водна фаза, използвана в етап ii) от претенция 1 е вода, фосфатен буфер, физиологичен разтвор или фосватен буфер-физиологичен разтвор.
18. Метод съгласно която и да е от претенции от 1 до 17, характеризиращ се с това, че рН на посочената водна фаза, използване за суспендиране на Амфотерицин В в етап ii) е коригирана до 6.0 – 8.0.
19. Метод съгласно която и да е от претенции от 1 до 18, характеризиращ се с това, че стерилизацията на хомогенизираната филтрувана суспензия се осъществява чрез стандартна обработка в автоклав.
20. Метод съгласно която и да е от претенции от 1 до 19, характеризиращ се с това, че температурата на стерилизация е 110°C.
21. Метод съгласно която и да е от претенции от 1 до 18 и 20, характеризиращ се с това, че стерилизацията се осъществява чрез специализирани методи на обработка в автоклав, при които продължителността на нагряването и охлаждането е намалена чрез използване на цикли за бързо нагряване и бързо охлаждане.
22. Метод съгласно която и да е от претенции от 1 до 15 и 17 до 21, характеризиращ се с това, че Амфотерицин В е микронизиран и натриевият хлорид може да се прибави по време на който и да е етап от ii) до iv), така че съдържанието на натриев хлорид в крайния продукт е поне 0.1% w/v.

23. Метод съгласно която и да е от претенции от 1 до 22, характеризиращ се с това, че крайният продукт водна композиция е напълно свободен от всякакви хлорирани въглеводороди.
24. Нискотоксичен, парентерален, воден състав, съдържащ Амфотерицин В, натриев хлорид и фосфолипиди и свободен от диметилсулфоксид, получен по метода, съгласно която и да е от претенции от 1 до 24.
25. Нискотоксичен, парентерален, воден състав, съдържащ Амфотерицин В, натриев хлорид и фосфолипиди, получен по метода, съгласно претенция 24 и получен, както е описано в който и да е от Примери от I до XII.
26. Метод за получаване на нискотоксичен, парентерален, воден състав, съдържащ Амфотерицин В, натриев хлорид и фосфолипиди и свободен от диметилсулфоксид съгласно претенция 1 и получен, както е описано в който и да е от Примери от I до XII.