

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **16.03.2001**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **01.03.2001**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2001/217**

(33) Země priority: **IN**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17.12.2003**  
(Věstník č. 12/2003)

(86) PCT číslo: **PCT/IN01/00040**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO02/069983**

(21) Číslo dokumentu:

**2003 - 2264**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>:

**A 61 K 31/715**

**A 61 K 47/14**

**A 61 K 9/127**

(71) Přihlašovatel:

**BHARAT SERUMS & VACCINES LTD., Thane, IN;**

(72) Původce:

**Pai Srikanth, Thane, IN;**

**Rivankar Sangeeta, Thane, IN;**

(74) Zástupce:

**Dvořáková Martina Mgr., Mendlovo nám. 1a, Brno,  
60300;**

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Vodná kompozice Amphotericinu B**

(57) Anotace:

Jsou popsány vodné kompozice s nízkou toxicitou pro parentální podání bez dimetysulfoxidu obsahující Amphotericin B. Kompozice kromě Amphotericinu B v podstatě sestávají z fosfolipidů a chloridu sodného. Kompozice jsou sterilizovány autoklávováním. Byl popsán způsob přípravy těchto kompozic bez použití rozpouštědel rozpouštějících Amphotericin B. Kompozice jsou určeny pro léčbu invazních plísňových infekcí.

Vodná kompozice Amphotericinu B.

### Oblast techniky

Vynález se týká vodnou kompozicí Amphotericinu B s nízkou toxicitou. Vynález se zejména týká vodné kompozice Amphotericinu B s nízkou toxicitou obsahující fosfolipidy vhodné pro parenterální podání.

### Dosavadní stav techniky

Amphotericin B patří mezi polyenové fungicidy, léky na bázi antibiotik vhodné pro léčbu invazních plísňových infekcí. Nicméně, vykazuje vysokou nefrotoxicitu.

Toxicita Amphotericinu B je snižována různými běžně užívanými postupy, jako jsou (a) uzavření léku do lipozomů a (b) přeměna léku na komplex léku s lipidem (HDLC).

#### Příprava lipozomálního Amphotericinu B

V US patentu č. 4 973 465 (1990) byla popsána příprava HDLC, v níž jsou použity steroly jako cholesterol, buď samostatně nebo v kombinaci s přírodními fosfolipidy, fosfatidylcholinem.

V US patentu č. 5 616 334 (1997) byla popsán postup přípravy lipozomálního Amphotericinu B, který zahrnuje počáteční vytvoření multi-lamelárních měchýřků (MLV) a potom smíchání MLV měchýřků se sonikovanou směsí Amphotericinu B ve vodě. Tento postup nezahrnuje použití žádných rozpouštědel. Nicméně, tento postup speciálně poskytuje lipozomální Amphotericin B, který je toxičtější než HDLC Amphotericin B. Tento postup zahrnuje opakované protlačování prázdných lipozomů přes vrstvené polykarbonátové filtry za účelem roztržení lipozomů podle velikosti, a to desetkrát. Také zahrnuje odstranění nezačleněného Amphotericinu B pomocí centrifugace po naplnění lipozomů lékem.

Tento US patent také popisuje postup přípravy HDLC v „systému lék-lipidy s nízkou toxicitou“. V tomto patentu byl popsán postup pro přípravu lipidového komplexu Amphotericinu B. Tento postup je běžně prováděn následovně:

**Příprava HDLC:** Nejdříve je lék Amphotericin B rozpuštěn v rozpouštědle, jako je například dimetylsulfoxid (DMSO) nebo metanol. Lipidy, vhodněji dimyristoylfosfatidylcholin (DMPC) a dimyristoylfosfatidylglycerol (DMPG) v molárním poměru 7 : 3 jsou rozpuštěny v rozpouštědlech, jako jsou: metanol, etanol, chlorované uhlovodíky. Roztok léku a roztok lipidů se smíchají. Rozpouštědla jsou odpařena za sníženého tlaku, což vede ke vzniku tenkého filmu

lipidů s lékem. Tento film je hydratován pomocí vodného roztoku, jako je voda, solný roztok, solný, fosfátový pufr nebo glycinový pufr, aby vznikly HDLC.

V jedné variantě tohoto postupu je vzniklý suchý film lipid-lék resuspendován v rozpouštědle, jako je například dichlormethan a znovu odpařen za sníženého tlaku před tím, než je film hydratován.

V další obměně tohoto postupu je suchý film lipid-lék dehydratován, aby vytvořil vločky; tyto vločky jsou potom hydratovány pomocí vodného roztoku.

V dalším postupu je vodný roztok jako: solný roztok, pufr nebo voda, přidán k roztoku obsahujícímu lék a lipid, a potom je rozpouštědlo odpařeno, aby vznikl HDLC. V tomto postupu není požadováno vytvoření tenkého filmu fosfolipidů.

V alternativním postupu na vytvoření HDLC komplexů popsaném v tomto US patentu jsou lipidové částice (nebo lipozómy) obsahující bioaktivní složky, jako je Amphotericin B, formovány nejdříve vytvořením multilamelárních měchýřků (MLV) obsahujících 6 až 50 molárních procent bioaktivního činidla. Potom jsou MLV vystaveny zahřívacímu cyklu, přibližně od 25 °C až 60 °C, nejlépe 60 °C. Takový cyklus vytváří více uspořádaný a méně toxický lipidový komplex Amphotericinu B.

V tomto US patentu byl popsán další alternativní postup přípravy lipidového komplexu s Amphotericinem B. V tomto postupu jsou lipidy smíchány s 0,9% roztokem chloridu sodného a homogenizovány pomocí homogenizátoru. Amphotericin B je rozpuštěn v dimethylsulfoxidu (DMSO) a přidán k roztoku lipidů v průběhu homogenizace a tento proces pokračuje dále asi 30 minut, dokud není velikost částic zmenšena na méně než  $10^{-2}$  mm (10 mikronů), výhodněji na přibližně  $10^{-2}$  mm (10 mikronů). Výsledné lipidové částice jsou vybírány podle velikosti s použitím tangenciální průtokové filtrace. Nevýhodou tohoto postupu je, že použité rozpouštědlo DMSO má vysoký teplotu varu a tudíž se špatně odstraňuje z produktu. Navíc v konečném produktu zůstávají stopová množství DMSO. Není žádoucí, aby v kompozici určené pro intravenózní aplikaci zůstávaly stopy takového rozpouštědla, jelikož bylo toto rozpouštědlo prokázáno jako hepatotoxické (The journal of Infectious diseases 1991: 164, str. 418-421).

HDLC patří mezi vhodné přípravky pro snížení toxicity Amphotericinu B, ale postupy popsané v US patentu č. 5 616 334 (1997) vyžadují použití velkých množství organických rozpouštědel, protože Amphotericin B je málo rozpustný ve většině běžně užívaných, pro parenterální použití přijatelných organických rozpouštědel. Tudíž postup zahrnuje odstranění velkých množství organických rozpouštědel odpařováním. Alternativně jsou pro rozpouštění Amphotericinu B používána také aprotická rozpouštědla, jako jsou dimethylsulfoxid, dimetylformamid. Tato aprotická rozpouštědla mají vysokou teplotu varu a stopy těchto

rozpouštědel zůstávají v konečné kompozici. Jelikož jsou tato aprotická rozpouštědla hepatotoxická, nedoporučuje se jejich použití v procesu výroby.

Stále je tedy třeba zdokonalit postup pro velkokapacitní výrobu kompozic Amphotericinu B snížením použitého množství rozpouštědel. Tím dojde také ke snížení výrobních nákladů.

Hlavním cílem vynálezu je vývoj vodné kompozice s nízkou toxicitou obsahující Amphotericin B a fosfolipidy s ohledem na jednoduchost a snížení nákladů na výrobu. Dalším rozšířením hlavního cíle vynálezu je vývoj vodné kompozice pro parenterální podání s nízkou toxicitou obsahující Amphotericin B a fosfolipidy a neobsahující stopy DMSO a/nebo chlorovaných uhlovodíků.

#### Podstata vynálezu

Vynález poskytuje parenterální vodné kompozice s nízkou toxicitou obsahující Amphotericin B, chlorid sodný a fosfolipidy, která neobsahuje dimetylsulfoxid.

Dále se vynález zabývá způsobem výroby parenterální vodné kompozice s nízkou toxicitou obsahující Amphotericin B, chlorid sodný a fosfolipidy, která neobsahuje dimetylsulfoxid, sestávajícím z těchto kroků:

(i) rozpuštění jednoho nebo více fosfolipidů v jednom nebo více organických rozpouštědlech vybraných ze skupiny rozpouštědel použitelných pro parenterální podání, jako jsou: metanol, etanol, izopropylalkohol, trichlormethan (chloroform), tetrachlormethan a dichlormethan, a potom odstranění rozpouštědel vypařováním za sníženého tlaku, aby došlo k vytvoření suchého filmu jednoho nebo smíchaných fosfolipidů;

(ii) rozmíchání Amphotericinu B ve vodné fázi přijatelné pro parenterální podání, která neobsahuje chlorid sodný nebo rozmíchání mikronizovaného Amphotericinu B ve vodné fázi přijatelné pro parenterální podání, která může obsahovat chlorid sodný;

(iii) přidání vodné fáze obsahující suspendovaný Amphotericin B, vytvořený v závěru kroku (ii) k uvedenému filmu fosfolipidů, který byl získán v závěru kroku (i) a smíchání těchto dvou, aby vznikla suspenze Amphotericinu B spolu s fosfolipidy v uvedené vodné fázi;

(iv) upravení pH uvedené suspenze získané na konci kroku (iii) na hodnotu 6,0 až 8,0 a homogenizování, dokud nepůjde suspenzi filtrovat přes filtr ze skleněných vláken s velikostí pórů  $2 \times 10^{-3}$  mm ( $2 \mu$ );

(v) přidání dostatečného množství roztoku chloridu sodného ve vodě na konci kroku (iv) tak, aby obsah chloridu sodného ve finálním produktu byl alespoň 0,1 hmotn./obj.%;

(vi) filtrování uvedené homogenizované suspenze získané v závěru kroku (v) přes filtr ze skleněných vláken s velikostí pórů  $2 \times 10^{-3}$  mm ( $2 \mu$ ) a naplnění filtrátu do ampulek v dusíkové

atmosféře, utěsnění ampulek a sterilizace utěsněných ampulek autoklávováním, aby se získal konečný produkt vhodný pro parenterální podání.

Vynález se také zabývá vodnou kompozicí Amphotericinu B s nízkou toxicitou obsahující alespoň 0,1 hmotn./obj.% chloridu sodného a fosfolipidů, jak zde byla popsána a vyrobena způsobem podle vynálezu tak, jak zde byl popsán.

Obsah Amphotericinu B v kompozici podle vynálezu se pohybuje v rozmezí od 0,1 hmotn./obj.% do 1,0 hmotn./obj.% kompozice, výhodněji je obsah Amphotericinu B 0,5 hmotn./obj.% kompozice.

Celkový obsah fosfolipidů se pohybuje v rozmezí od 0,1 hmotn./obj.% do 1,0 hmotn./obj.% kompozice. Výhodný obsah je od 0,4 hmotn./obj.% do 0,6 hmotn./obj. %.

Hmotnostní poměr Amphotericin B ku fosfolipidům je od 1:0,5 do 1:1,5. Výhodný hmotnostní poměr se pohybuje od 1:0,8 do 1:1,2.

V tomto postupu jsou fosfolipidy vybrány z vaječného fosfatidylcholinu, nebo směsi dimyristoylfosfatidylcholinu (DMPC) a sodné soli dimyristoylfosfatidylglycerolu (DMPG). Pokud je použita směs dvou fosfolipidů DMPC a DMPG, potom je hmotnostní poměr fosfolipidů DMPC : DMPG mezi 7:1 a 7:15, výhodněji je to 7:3.

Rozpouštědla použitá pro rozpouštění fosfolipidů jsou vybrána z alkoholových rozpouštědel, jako jsou: etanol, metanol, izopropylalkohol s přídavkem nebo bez přídavku chlorovaných uhlovodíků, jako jsou: trichlormethan, dichlormethan, tetrachlormethan. Pro rozpouštění fosfolipidů mohou být použita samostatně alkoholová rozpouštědla nebo chlorované uhlovodíky samostatně. Případně lze také pro rozpouštění fosfolipidů použít kombinaci alkoholových rozpouštědel a chlorovaných uhlovodíků. Pokud nejsou vybrány chlorované uhlovodíky, neobsahuje kompozice tyto chlorované uhlovodíky. Výhodným rozpouštědlem pro rozpouštění fosfolipidů je etanol.

Mikronizovaný Amphotericin B použitý kdekoli v rámci vynálezu je mikronizován s použitím vzduchového proudového mlýnu na velikost částic menší než  $10^{-2}$  mm (10 mikronů).

pH vodné fáze použité pro dispergování Amphotericinu B je upraveno na hodnoty 6,0 až 8,0 s použitím zředěného roztoku hydroxidu sodného vždy, pokud není pufrovací roztok použit v kompozici.

Vodná fáze použitá pro suspendování Amphotericinu B je prostředkem/nositelem přijatelným pro parenterální podání, jako je voda nebo fosfátový pufr. Pokud je použit mikronizovaný Amphotericin B, může být vodnou fází použitou pro suspendování Amphotericinu B solný roztok, solný, fosfátový pufr (PBS), voda nebo fosfátový pufr.

Po homogenizaci a před filtrací je přidán chlorid sodný jako roztok ve vodě. Nicméně, pokud je použit mikronizovaný Amphotericin B může být chlorid sodný přidán v kterémkoliv z kroků (ii) až (iv) výroby, které byly uvedeny výše.

Koncentrace chloridu sodného se pohybuje v rozmezí 0,1 hmotn./obj.% až 0,9 hmotn./obj.% kompozice, výhodněji 0,4 hmotn./obj.% až 0,9 hmotn./obj.% kompozice.

Homogenizace je prováděna ve vysokotlakém homogenizátoru při alespoň 34,5 MPa až lze produkt filtrovat přes filtr ze skleněných vláken o velikosti pórů  $2 \times 10^{-3}$  mm (2 mikrony).

V dalším provedení vynálezu je lipidová suspenze Amphotericinu B před homogenizací sonikována v lázni sonikátoru, aby byla získána rovnoměrná suspenze po upravení pH na 6,0 až 8,0. Zředěný roztok hydroxidu sodného se použije k úpravě pH pokaždé, pokud není pufovací roztok použit v kompozici.

Homogenizovaná lipidová suspenze Amphotericinu B je filtrována přes filtr ze skleněných vláken o velikosti pórů  $2 \times 10^{-3}$  mm (2 mikrony) podle obvyklých filtračních postupů pod tlakem, buď s použitím filtrovaného dusíku nebo filtrovaného, stlačeného vzduchu.

Po filtraci je homogenizovaná suspenze naplněna do ampulek pod atmosférou dusíku a je sterilizována běžným autoklávováním při 110 °C až 121 °C, s výhodou při 121 °C po 20 minut. nebo při 110 °C po dobu 40 minut. Sterilizaci lze také provést specializovaným postupem autoklávování, při němž je doba cyklu zahřívání a chlazení zkrácena pomocí systému s rychlým zahřátím a rychlým ochlazením.

V dřívějších postupech přípravy HDLC komplexů, jak byly popsány v US patentech č. 4 973 465 (1990) a č. 5 616 334 (1997), je Amphotericin B rozpuštěn ve velkém množství organických rozpouštědel. V jednom z příkladů v US patentu č. 5 616 334 (1997), je použit 1 l metanolu pro přípravu 1 ampule s 20 ml lipidového komplexu Amphotericinu B, který odpovídá 100 mg Amphotericinu B. V jiném příkladě, kde byla snaha o snížení objemu rozpouštědla, bylo použito 5 ml DMSO na 100 mg Amphotericinu B, ale DMSO není doporučován jako rozpouštědlo pro intravenózní injekční aplikaci, jelikož byla u DMSO prokázána hepatotoxicita.

Ve způsobu podle vynálezu není Amphotericin B rozpuštěn vůbec v žádném rozpouštědle, zatímco tradiční postup používá DMSO pro rozpuštění Amphotericinu B.

V postupu podle vynálezu, pokud byl Amphotericin B rozpuštěný ve vodné fázi obsahující chlorid sodný přidán k lipidovému filmu a homogenizován, byl pozorován vznik shluků a homogenizovaný produkt nešel filtrovat přes filtr ze skleněných vláken o velikosti pórů  $2 \times 10^{-3}$  mm (2 mikrony) podle běžných filtračních postupů.

Po rozsáhlém provádění pokusů bylo zjištěno, že pokud byla vodná fáze určená pro suspendování Amphotericinu B připravena bez přídavku jakéhokoliv chloridu sodného,

probíhala homogenizace hladce bez tvorby agregátů v suspenzi a homogenizovaný objem bylo možno filtrovat.

Nicméně posléze bylo zjištěno, že přítomnost chloridu sodného v kompozici je nezbytná pro snížení toxicity. Vodné kompozice Amphotericinu B obsahující různé hodnoty koncentrací chloridu sodného v dávce 80 mg/kg tělesné hmotnosti byly vpraveny injekčně myším, ve skupinách po 8. Vodné kompozice Amphotericinu B bez jakéhokoliv chloridu sodného, které byly připraveny podle popisu ve zde uvedených příkladech, byly injekčně podány samostatně. Před každou injekcí byl objemový ekvivalent odpovídající dávce 80 mg/kg tělesné hmotnosti zředěn na 0,5 ml přidáním 5% dextróзовé injekce, aby byl roztok osmotický/izotonický. Procentuální úmrtnost byla zaznamenána po uplynutí 72 hodin a je ukázána v tabulce 1.

**Tabulka 1**

| Koncentrace chloridu sodného ve vodné kompozici Amphotericinu B | Připravena podle příkladu | Procentuální úmrtnost myší při dávce 80 mg/kg |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------|
| 0,9 hmotn./obj. %                                               | III                       | Nula                                          |
| 0,7 hmotn./obj. %                                               | IV                        | Nula                                          |
| 0,4 hmotn./obj. %                                               | V                         | Nula                                          |
| 0,1 hmotn./obj. %                                               | VI                        | 50%                                           |
| nula                                                            | XIII                      | 87,5%                                         |

Z tabulky 1 vyplývá, že minimální koncentrace chloridu sodného 0,1% je nezbytná pro snížení toxicity. Proto během hydratace filmu fosfolipidů byla pro dosažení hladké homogenizace použita vodná fáze bez obsahu jakéhokoliv chloridu sodného a také pro zabezpečí snadné filtrace přes filtr ze skleněných vláken o velikosti pórů  $2 \times 10^{-3}$  mm (2 mikrony). Chlorid sodný byl přidán do roztoku až po homogenizaci. Přídavek chloridu sodného do kompozice podle vynálezu je nezbytný pro snížení toxicity Amphotericinu B. Přestože s přídavkem 0,1 hmotn./obj. % chloridu sodného byla  $LD_{50}$  80 mg/kg, toto  $LD_{50}$  je o hodně vyšší než u běžných přípravků Amphotericinu B obsahujících dezoxycholát sodný, u nichž se udává kolem hodnoty 4 mg/kg.

Po řadě dalších pokusů jsme zjistili, že zmenšení průměrné velikosti částic Amphotericinu B pod  $10^{-2}$  mm (10 mikronů) pomocí mikronizace pomohlo při překonání problému agregace/shlukování během homogenizace. Analýza velikosti částic Amphotericinu B před a po

mikronizaci byla prováděna na detektoru velikosti částic Sympatic HELIOS. Mikronizace Amphotericinu B pomohla také při překonání problému filtrace, který byl spojen s přítomností chloridu sodného v homogenizované vodné suspenzi obsahující ne-mikronizovaný Amphotericin B a fosfolipid.

Filtrace homogenizovaného objemu připraveného s použitím mikronizovaného Amphotericinu B je snadná a lze použít běžně používané filtry; v dřívějších postupech užívaných v oboru, jako např. v US patentu č. 5 616 334 (1997), se provádí filtrace HDLC komplikovanou cestou nebo přímo přes membránový filtr, jako je polykarbonátový filtr.

V jednom provedení podle vynálezu je možné překonat problém shlukování a filtrace při použití ne-mikronizovaného Amphotericinu B vynecháním přídavku chloridu sodného do vodné fáze. Nicméně, bylo zjištěno, že přídavek chloridu sodného alespoň v minimální koncentraci 0,1 hmotn./obj.% je nezbytný pro snížení toxicity vodné kompozice Amphotericinu B. Pokud je v kompozici obsažen chlorid sodný, vyřeší se problém shlukování a filtrace tím, že se s přidáním chloridu sodného počká až po kroku homogenizace.

Proto v prvním provedení podle vynálezu, ve způsobu přípravy sterilní vodné kompozice Amphotericinu B s nízkou toxicitou obsahující alespoň 0,1 hmotn./obj.% chloridu sodného, je jako vodná fáze pro rozptýlení ne-mikronizovaného Amphotericinu B použita voda nebo fosfátový pufr, které neobsahují chlorid sodný. Chlorid sodný je přidán přesně po homogenizaci vodné suspenze obsahující ne-mikronizovaný Amphotericin B a fosfolipidy.

V druhém provedení podle vynálezu byl problém agregace/shlukování a filtrace suspenze fosfolipidu a vodné fáze obsahující Amphotericin B vyřešen použitím mikronizovaného Amphotericinu B.

V kombinaci těchto dvou provedení vynálezu, pokud je použitý Amphotericin B mikronizován a suspendován ve vodné fázi neobsahující chlorid sodný, je chlorid sodný přidán do vodné fáze před, během nebo po kroku homogenizace.

#### Příklady provedení vynálezu

Vynález bude nyní představen pomocí příkladů. Příklady jsou pouze ilustrativní a v žádném případě neomezují rozsah vynálezu.

Jsou popsány čtyři skupiny příkladů tak, jak je uvedeno v tabulce 2.



Tabulka 2

| Skupina | Číslo příkladů   | Amphotericin B            | Vodná fáze použitá pro rozptýlení Amphotericinu B | Přídavek soli               | Provedení vynálezu  |
|---------|------------------|---------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------|---------------------|
| A       | I-II             | Ne-mikronizovaný          | Neobsahuje sůl                                    | Po kroku homogenizace       | První               |
| B       | III-VI}          | Mikronizovaný             | Obsahuje sůl                                      | -----                       | Druhý               |
|         | VIII-IX}<br>VII* | Mikronizovaný             | Obsahuje sůl                                      | -----                       | Druhý               |
| C       | X-XII            | Mikronizovaný             | Neobsahuje sůl                                    | Během/po kroku homogenizace | První & Druhý       |
| D       | XIII             | Mikronizovaný             | Neobsahuje sůl                                    | -----                       | Nepatří do vynálezu |
|         | -----<br>XIV     | -----<br>Ne-mikronizovaný |                                                   |                             |                     |

\* Rozpouštědlem použitým pro rozpouštění fosfolipidů je pouze etanol.

Všechny suroviny použité v těchto příkladech patřily do parenterální třídy. Bylo použito běžné vybavení. Celé zpracování probíhalo v prostředí s řízenými podmínkami, které je požadováno pro výrobu sterilních produktů.

Amphotericin B použitý v příkladech patřil do parenterální třídy získané od Alharma, která vyhovuje USP specifikacím. Mikronizovaný Amphotericin B, pokud byl použit v těchto příkladech, byl vždy připraven mikronizací Amphotericinu B s použitím vzduchového proudového mlýnu na velikost částic menší než  $10^{-2}$  mm (10 mikronů).

Fosfolipidy DMPC a DMPG použité v příkladech patřily do parenterální třídy a byly získány od firmy Avanti Polar Lipids.

Fosfolipid vaječný fosfatidylcholin použitý v příkladech patřil do parenterální třídy a byl získán od firmy Lipoids.

Organická rozpouštědla použitá v příkladech měla kvalitu AR (analytické činidlo).

Fosfátový pufr použitý v příkladech byl připraven přesně podle Indian Pharmacopoeia.

Solný, fosfátový pufr pH 7,4 se solí, použitý v příkladech, byl připraven rozpuštěním 1,19 g hydrogenfosforečnanu disodného ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 0,095 g dihydrogenfosforečnanu draselného ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) a 4 g chloridu sodného ( $\text{NaCl}$ ) ve 400 ml vody. Voda byla přidána na konečný objem 500 ml.

SKUPINA A : Příklady I & II

Složky použité v těchto příkladech jsou uvedeny v tabulce 3:

Tabulka 3

|    |                                | Příklad I | Příklad II |
|----|--------------------------------|-----------|------------|
| a) | Amphotericin B                 | 1,00 g    | 1,00 g     |
| b) | DMPC                           | 0,68 g    | 0,68 g     |
| c) | DMPG                           | 0,30 g    | 0,30 g     |
| d) | Etanol                         | 200 ml    | 200 ml     |
| e) | Trichlormethan                 | 10 ml     | 10 ml      |
| f) | pH – při dispergování          | 6,95**    | 7,2        |
|    | před homogenizací              | 6,80**    | 7,2        |
| g) | Chlorid sodný                  | 1,80 g    | 1,80 g     |
| h) | Deionizovaná voda (q.s.to)     | 200 ml    | --         |
| i) | Fosfátový pufr pH 7,2 (q.s.to) | --        | 200 ml     |

\* nezůstává v konečném produktu

\* upraveno použitím 0,1 M roztoku hydroxidu sodného

Postup:

V příkladu I byl Amphotericin B rozsuspendován ve 150 ml vody za míchání a za probublávání dusíkem. Pomocí 0,1 M roztoku hydroxidu sodného bylo pH upraveno na 6,95.

V příkladu II byl Amphotericin B rozsuspendován ve 150 ml fosfátového pufru s pH 7,2 za míchání a za probublávání dusíkem.

Fosfolipidy DMPC a DMPG byly rozpuštěny v chloroformu v baňce v rotační odparce. Po úplném rozpuštění fosfolipidů byl přidán etanol a směs se smíchala otáčením baňky při malé rychlosti při promývání dusíkem. Tento alkoholový roztok byl rotačně odpařen za sníženého tlaku až do sucha. Dusík byl vháněn 30 minut po odstranění rozpouštědel.

Suchý film lipidů byl hydratován v baňce do rotační odparky s vodnou suspenzí Amphotericinu B, která byla připravena podle popisu, za plynulého otáčení baňky a za stálého promývání dusíkem. Pro úpravu pH lipidové suspenze Amphotericinu B získané v příkladu I na hodnotu přibližně 6,80 byl použit roztok hydroxidu sodného. Obsah baňky byl sonikován v lázni sonikátoru po dobu 1 hodiny. Objem byl upraven na 180 ml přidáním vody v příkladu I a pomocí fosfátového pufru pH 7,2 v příkladu II.

Lipidová suspenze Amphotericinu B byla homogenizována pomocí APV vysokotlakého homogenizátoru až šlo homogenizovaný produkt filtrovat přes filtr ze skleněných vláken s velikostí pórů  $2 \times 10^{-3}$  mm ( $2\mu$ ).

V příkladu I byl chlorid sodný rozpuštěn ve vodě a zředěn vodou na 20 ml. V příkladu II byl chlorid sodný rozpuštěn a zředěn na 20 ml fosfátovým pufrem pH 7,2. Tento roztok chloridu sodného byl přidán k homogenizované suspenzi Amphotericinu B s lipidem za míchání o malé rychlosti a za promývání dusíkem. Tento produkt byl přenesen zpět do homogenizátoru a byl znovu podroben cyklu po dobu 5 minut bez použití tlaku. Potom byl filtrován přes filtr ze skleněných vláken s velikostí pórů  $2 \times 10^{-3}$  mm ( $2\mu$ ) a pod atmosférou dusíku naplněn do skleněných nádob, nádoby byly utěsněny a autoklávovány 40 minut při 110 °C. V příkladu II bylo autoklávování provedeno po dobu 40 minut při 110 °C pomocí cyklu rychlého zahřátí a rychlého ochlazení.

#### SKUPINA B :

##### 1) Příklady III až VI

Složky použité v těchto příkladech jsou uvedeny v tabulce 4 a postup je uveden dále, množství přidaného chloridu sodného se měnilo od 1,8 g po 0,2 g.

**Tabulka 4**

|    |                                         | Příklady |        |        |        |
|----|-----------------------------------------|----------|--------|--------|--------|
|    |                                         | III      | IV     | V      | VI     |
| a) | Amphotericin B mikronizovaný            | 1,00 g   | 1,00 g | 1,00 g | 1,00 g |
| b) | DMPC                                    | 0,68 g   | 0,68 g | 0,68 g | 0,68 g |
| c) | DMPG                                    | 0,30 g   | 0,30 g | 0,30 g | 0,30 g |
| d) | Chlorid sodný                           | 1,80 g   | 1,40 g | 0,80 g | 0,20 g |
| e) | Etanol*                                 | 200 ml   | 200 ml | 200 ml | 200 ml |
| f) | Chloroform*                             | 10 ml    | 10 ml  | 10 ml  | 10 ml  |
| g) | PH – při dispergování před homogenizací | 7,20**   | 7,15** | 7,05** | 7,20** |
|    |                                         | 7,00**   | 7,10** | 7,15** | 7,00** |
| h) | Deionizovaná voda (q.s.to)              | 200 ml   | 200 ml | 200 ml | 200 ml |

\* nezůstává v konečném produktu

\*\* upraveno použitím 0,1 M roztoku hydroxidu sodného

Postup :

Fosfolipidy DMPC a DMPG byly rozpuštěny v trichlormethanu v baňce v rotační odparce. Po úplném rozpuštění fosfolipidů byl přidán etanol a směs se nechala míchat v baňce při malé rychlosti za promývání dusíkem. Tento alkoholový roztok byl za sníženého tlaku rotačně odpařen až do sucha. Dusíkem byl promýván 30 minut po odstranění rozpouštědel.

Chlorid sodný byl rozpuštěn ve 175 ml vody. Dusík byl probubláván do tohoto roztoku 15 min. Mikronizovaný Amphotericin B byl potom rozsuspendován v roztoku chloridu sodného za míchání a za probublávání dusíkem. Přidáním 0,1 M hydroxidu sodného bylo pH upraveno na hodnoty uvedené v Tabulce 4 pro každý příklad.

Suchý film lipidů byl hydratován v rotační baňce vodnou suspenzí Amphotericinu B, která byla připravena podle uvedeného popisu, baňka se neustále otáčela a byla neustále promývána dusíkem. V tabulce 4 je uvedeno upravené pH takto získaného lipidového komplexu Amphotericinu B. Obsah baňky byl sonikován v lázni sonikátoru po dobu 1 hodiny.

Objem byl vodou doplněn na 200 ml.

Lipidová suspenze Amphotericinu B byla homogenizována pomocí vysokotlakého homogenizačního mlýnu až šlo produkt filtrovat přes filtr ze skleněných vláken s velikostí pórů  $2 \times 10^{-3}$  mm ( $2\mu$ ).

Homogenizovaná lipidová suspenze Amphotericinu B byla filtrována přes filtr ze skleněných vláken s velikostí pórů  $2 \times 10^{-3}$  mm ( $2\mu$ ) a naplněna do skleněných nádob v dusíkové atmosféře, nádoby byly uzavřeny a autoklávovány 40 minut při 110 °C pomocí cyklu rychlého zahřátí a rychlého ochlazení.

Stanovení toxicity u myši pro produkty příkladů III, IV a V při dávce 80 mg/kg tělesné hmotnosti neukázala žádnou úmrtnost, zatímco produkt podle příkladu VI vykázal 50% úmrtnost.

SKUPINA B pokračování :

## 2) Příklady VII až IX

Složky použité v těchto příkladech jsou uvedeny v tabulce 5 a postup je uveden dále.

Tabulka 5

| Příklady |                                   |        |        |        |
|----------|-----------------------------------|--------|--------|--------|
|          |                                   | VII    | VIII   | IX     |
| a)       | Amphotericin B<br>(mikronizovaný) | 1,00 g | 1,00 g | 1,00 g |
| b)       | DMPC                              | 0,68 g | --     | 0,68 g |
| c)       | DMPG                              | 0,30 g | --     | 0,30 g |

|    |                               |        |        |        |
|----|-------------------------------|--------|--------|--------|
| d) | vaječný fosfatidylcholin      | --     | 0,90 g | --     |
| e) | Chlorid sodný                 | 1,80 g | 1,80 g | ***    |
| f) | Etanol                        | 300 ml | 200 ml | 200 ml |
| g) | Trichlormethan                | --     | 15 ml  | 10 ml  |
| h) | PH – při dispergování         | 7,15** | 7,15** | 7,40   |
|    | Před homogenizací             | 7,05** | 6,95** | 7,40   |
| i) | Deionizovaná voda<br>(q.s.to) | 200 ml | 200 ml | --     |
| j) | Fosfátový pufr (q.s.to)       | --     | --     | 200 ml |

\* nezůstává v konečném produktu

\*\* upraveno použitím 0,1 M roztoku hydroxidu sodného

\*\*\* 2 g od PBS

Postup :

V příkladu VII byly fosfolipidy DMPC a DMPG rozpuštěny v etanolu v baňce do rotační odparky při pomalém otáčení za promývání dusíkem.

V příkladu VIII byl fosfolipid vaječný fosfatidylcholin rozpuštěn v trichlormethanu v baňce do rotační odparky a v příkladu IX byly fosfolipidy DMPC & DMPG rozpuštěny v trichlormethanu v baňce do rotační odparky. Po úplném rozpuštění fosfolipidů v trichlormethanu byl přidán etanol a směs se nechala míchat pomalým otáčením baňky za promývání dusíkem.

V těchto příkladech byl získaný fosfolipidový roztok rotačně odpařen za sníženého tlaku až do sucha. Po úplném odstranění rozpouštědel byl dusíkem promýván ještě 30 minut.

V příkladech VII & VIII byl chlorid sodný rozpuštěn ve 175 ml vody. Dusík se nechal probublávat do tohoto roztoku po dobu 15 minut. Mikronizovaný Amphotericin B byl potom rozsuspendován v roztoku chloridu sodného za míchání a za probublávání dusíkem, pH bylo upraveno na přibližně 7,15 přidávkou 0,1 M roztoku hydroxidu sodného.

V příkladu IX byl mikronizovaný Amphotericin B rozsuspendován za míchání ve 175 ml solném fosfátovém pufru (PBS) pH 7,4. Dusík byl probubláván 15 minut. PBS přispívá zhruba 2 g chloridu sodného.

Suchý film lipidů byl hydratován v rotační baňce s vodnou suspenzí mikronizovaného Amphotericinu B připraveného podle tohoto postupu za stálého otáčení baňkou a za stálého promývání dusíkem. V příkladě VII bylo pH získané lipidové suspenze Amphotericinu B upraveno na 7,05 a v příkladě VIII na 6,95 přidávkou 0,1 M roztoku hydroxidu sodného.

Objem byl v příkladech VII & VIII doplněn vodou na 200 ml.

V příkladu IX byl objem doplněn PBS pH 7,4 na 200 ml.

Lipidová suspenze Amphotericinu B byla potom homogenizována s použitím APV vysokotlakého homogenizačního mlýnu až šlo produkt filtrovat přes filtr ze skleněných vláken s velikostí pórů  $2 \times 10^{-3}$  mm ( $2\mu$ ).

Homogenizovaná lipidová suspenze Amphotericinu B byla filtrována přes filtr ze skleněných vláken s velikostí pórů  $2 \times 10^{-3}$  mm ( $2\mu$ ) do skleněných nádob v dusíkové atmosféře, nádoby byly uzavřeny a autoklávovány 20 minut při 121 °C v příkladu IX a 40 minut při 110 °C v příkladech VII & VIII.

Sterilní vodná kompozice Amphotericinu B získaná v příkladu VII byla podrobena stanovení toxicity u myší a bylo provedeno určení stability/stálosti. Výsledky určení toxicity jsou uvedeny v tabulce 6 a výsledky určení stability/stálosti jsou uvedeny v tabulce 7.

#### Analýza velikosti částic:

Velikost částic vodné kompozice amphotericinu B získaného v příkladu VII byla určena na Modelu 770 AccuSizer v systému měření velikosti částic, Inc., USA. Velikost 95 % částic se nacházela pod hodnotou  $1,63 \times 10^{-3}$  mm ( $1,63 \mu$ ) a 90 % částic mělo velikost menší než  $1,28 \times 10^{-3}$  mm ( $1,28 \mu$ ).

#### Stanovení toxicity u myší:

Stanovení toxicity vodné kompozice Amphotericinu B získané v příkladu VII byla prováděna na myších spolu s běžným produktem Amphotericinu B, který obsahuje dezoxycholát sodný. Výsledky jsou následující.

Tabulka 6

#### Stanovení akutní toxicity u myší

|                                                   |                                |
|---------------------------------------------------|--------------------------------|
| LD <sub>50</sub> (intravenózně)                   |                                |
| Amphotericin B běžný produkt                      | - 3,5 mg/kg tělesné hmotnosti  |
| Amphotericin B vodná kompozice podle příkladu VII | - > 80 mg/kg tělesné hmotnosti |

Hodnota LD<sub>50</sub> vodné kompozice Amphotericinu B připravené v této laboratoři po jediné injekci byla u myši > 80 mg/kg. Tato hodnota byla víc než 20 krát vyšší než LD<sub>50</sub> po jediné injekci běžného produktu Amphotericinu B, který obsahuje dezoxycholát sodný.

Tabulka 7

Údaje pro stabilitu vodné kompozice Amphotericinu B  
podle příkladu VII při doporučeném způsobu skladování při teplotě 2 °C až 8 °C

| Doba      | Vzhled                                                                                             | Obsah Amphotericinu B |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Začátek   | Žlutě zbarvená suspenze s usazeninou při stání, která se při mírném protřepání rovnoměrně rozptýlí | 100,6%                |
| 6 měsíců  | Žlutě zbarvená suspenze s usazeninou při stání, která se při mírném protřepání rovnoměrně rozptýlí | 100,3%                |
| 1 rok     | Žlutě zbarvená suspenze s usazeninou při stání, která se při mírném protřepání rovnoměrně rozptýlí | 99,8%                 |
| 18 měsíců | Žlutě zbarvená suspenze s usazeninou při stání, která se při mírném protřepání rovnoměrně rozptýlí | 98,3%                 |
| 2 roky    | Žlutě zbarvená suspenze s usazeninou při stání, která se při mírném protřepání rovnoměrně rozptýlí | 96,5%                 |

Tento příklad jasně ukazuje, že parenterální vodná kompozice Amphotericinu B, která neobsahuje žádné stopy DMSO nebo chlorovaných uhlovodíků, pokud je připravena podle zdokonaleného postupu tohoto vynálezu, kde nejsou vůbec použita tato rozpouštědla, vyhovuje obecným požadavkům na dobře prodejný produkt ve formě suspenze pro injekční podání. Nová vodná kompozice připravená podle postupu v příkladu VII neobsahuje jakákoliv škodlivá rozpouštědla, jako jsou DMSO a chlorované uhlovodíky.

#### SKUPINA C: Příklady X až XII

Složky použité v těchto příkladech jsou uvedeny v tabulce 8 a postup je uveden dále.

Tabulka 8

| Příklady |                                   |        |        |        |
|----------|-----------------------------------|--------|--------|--------|
|          |                                   | X      | XI     | XII    |
| a)       | Amphotericin B<br>(mikronizovaný) | 1,00 g | 1,00 g | 1,00 g |

|    |                                            |        |        |        |
|----|--------------------------------------------|--------|--------|--------|
| b) | DMPC                                       | 0,68 g | 0,68 g | 0,68 g |
| c) | DMPG                                       | 0,30 g | 0,30 g | 0,30 g |
| d) | Chlorid sodný                              | 1,80 g | 1,80 g | 1,80 g |
| e) | Etanol                                     | 200 ml | 200 ml | 200 ml |
| f) | Trichlormethan                             | 10 ml  | 10 ml  | 10 ml  |
| g) | pH – při dispergování<br>před homogenizací | 7,15** | 7,30** | 7,20   |
|    |                                            | 6,90** | 7,00** | 7,20   |
| h) | Deionizovaná voda<br>(q.s.to)              | 200 ml | 200 ml | --     |
| i) | Fosfátový pufr o pH 7,2<br>(q.s.to)        | --     | --     | 200 ml |

\* Nezůstává v konečném produktu.

\*\* Upraveno použitím 0,1 M roztoku hydroxidu sodného.

#### Postup :

Fosfolipidy DMPC a DMPG byly rozpuštěny v trichlormethanu v baňce do rotační odparky. Etanol byl přidán po rozpuštění fosfolipidů a směs se nechala míchat pomalým otáčením baňky za promývání dusíkem. Tento alkoholový roztok byl za sníženého tlaku rotačně odpařen do sucha. Po úplném odstranění rozpouštědel byl promýván dusíkem ještě 30 minut.

Mikronizovaný Amphotericin B byl v příkladech X a XI rozsuspendován ve 150 ml vody a v příkladu XII ve 150 ml PBS pH 7,2 za míchání a za probublávání dusíkem. Přidáním 0,1 M hydroxidu sodného bylo pH upraveno na hodnoty uvedené v Tabulce 8 pro příklady X & XI.

Suchý film lipidů byl hydratován v baňce rotační odparky se suspenzí mikronizovaného Amphotericinu B připraveného podle uvedeného popisu s použitím rotační odparky s neustálým promýváním dusíkem. Pomocí roztoku 0,1 M hydroxidu sodného bylo upraveno pH získané lipidové suspenze Amphotericinu B tak, jak je uvedeno v Tabulce 8. V příkladech X a XI byl objem doplněn vodou na 180 ml, zatímco v příkladu XII byl objem doplněn na 180 ml PBS pH 7,2. V příkladu XI byl obsah baňky sonikován 1 hodinu v lázni sonikátoru.

V příkladech X & XII byla lipidová suspenze Amphotericinu B homogenizována pomocí APV vysokotlakého homogenizačního mlýnu až šlo produkt filtrovat přes filtr ze skleněných vláken s velikostí pórů  $2 \times 10^{-3}$  mm (2  $\mu$ ).

Chlorid sodný byl v příkladu X rozpuštěn ve vodě a zředěn vodou na objem 20 ml. V příkladu XII byl chlorid sodný rozpuštěn v PBS pH 7,2 a zředěn PBS pH 7,2 na 20 ml. Tento roztok chloridu sodného byl přidán k homogenizované lipidové suspenzi za pomalého míchání a



za promývání dusíkem. Tento produkt byl přenesen zpět do homogenizátoru a byl podroben znovu cyklu po dobu 5 minut bez použití tlaku.

V příkladu XI byla lipidová suspenze Amphotericinu B po sonikaci (vystavení ultrazvuku) ponechána projít třikrát homogenizací za zvýšeného tlaku v APV vysokotlakém homogenizátoru. Chlorid sodný byl rozpuštěn ve vodě a vodou zředěn na 20 ml. Tento roztok chloridu sodného byl za pomalého míchání přidán k lipidové suspenzi Amphotericinu B získané po třech homogenizačních cyklech. Tento produkt byl přenesen zpět do homogenizátoru a byl podroben znovu cyklu po dobu 5 minut bez zvýšení tlaku. Potom byl znovu homogenizován za zvýšeného tlaku až šlo produkt filtrovat přes filtr ze skleněných vláken s velikostí pórů  $2 \times 10^{-3}$  mm ( $2\mu$ ).

Produkt byl potom filtrován přes filtr ze skleněných vláken s velikostí pórů  $2 \times 10^{-3}$  mm ( $2\mu$ ). Přefiltrovaný produkt byl naplněn do skleněných nádob v dusíkové atmosféře, nádoby uzavřeny a autoklávovány 40 minut při  $110^\circ\text{C}$  pomocí cyklu rychlého zahřátí a rychlého ochlazení.

#### SKUPINA D: Příklady XIII až XIV

Složky použité v těchto příkladech jsou uvedeny v tabulce 9 a postup je uveden dále.

Tabulka 9

|    |                                   | Příklad XIII | Příklad XIV |
|----|-----------------------------------|--------------|-------------|
| a) | Amphotericin B (mikronizovaný)    | 1,00 g       | --          |
| b) | Amphotericin B (ne-mikronizovaný) | --           | 1,00 g      |
| c) | DMPC                              | 0,68 g       | 0,68 g      |
| d) | DMPG                              | 0,30 g       | 0,30 g      |
| e) | Etanol*                           | 200 ml       | 200 ml      |
| f) | Trichlormethan*                   | 10 ml        | 10 ml       |
| g) | Deionizovaná voda (q.s.to)        | 200 ml       | 200 ml      |
| h) | pH – při dispergování             | 7,25**       | 7,20**      |
|    | před homogenizací                 | 7,15**       | 7,10**      |

\* Nezůstává v konečném produktu.

\*\* Upraveno použitím 0,1 M roztoku hydroxidu sodného.

Postup :

Fosfolipidy DMPC a DMPG byly rozpuštěny v trichlormethanu v baňce do rotační odparky. Etanol byl přidán po úplném rozpuštění fosfolipidů a směs se nechala míchat pomalým otáčením baňky za promývání dusíkem. Tento alkoholový roztok byl za sníženého tlaku rotačně odpařen do sucha. Po úplném odstranění rozpouštědel byl promýván dusíkem ještě 30 minut.

V příkladu XIII byl mikronizovaný Amphotericin B rozsuspendován ve vodě za míchání a za probublávání dusíkem. V příkladu XIV byl nemikronizovaný Amphotericin B suspendován ve vodě za míchání a za probublávání dusíkem. V tabulce 9 je uvedeno pH upravené přidáním 0,1 M hydroxidu sodného.

Suchý film lipidů byl hydratován v baňce do rotační odparky se suspenzí Amphotericinu B připravenou podle uvedeného popisu s použitím rotačního odpařovače s neustálým promýváním dusíkem. V tabulce 9 je uvedeno pH upravené přidáním 0,1 M hydroxidu sodného. V příkladu XIV byl obsah baňky sonikován 1 hodinu. Objem byl doplněn vodou na 200 ml.

Lipidová suspenze Amphotericinu B byla homogenizována pomocí APV vysokotlakého homogenizačního mlýnu až šlo homogenizovaný produkt filtrovat přes filtr ze skleněných vláken s velikostí pórů  $2 \times 10^{-3}$  mm (2  $\mu$ ).

Homogenizovaná lipidová suspenze Amphotericinu B byla filtrována přes filtr ze skleněných vláken s velikostí pórů  $2 \times 10^{-3}$  mm (2  $\mu$ ). Přefiltrovaný produkt byl naplněn do skleněných nádob pod dusíkem, nádoby uzavřeny a autoklávovány. Autoklávování proběhlo 20 minut při 121 °C.

#### Stanovení toxicity u myší:

Stanovení toxicity vodné kompozice Amphotericinu B (bez chloridu sodného) získané v příkladech XIII a XIV byla prováděna na myších spolu s vodnou kompozicí Amphotericinu B, která obsahuje chlorid sodný, podle příkladu III. Výsledky jsou následující.

Tabulka 10

#### Stanovení akutní toxicity u myší

|                                                                                 |                                |
|---------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| LD <sub>50</sub> (intravenózně)                                                 |                                |
| Amphotericin B vodná kompozice (s chloridem sodným) podle příkladu III          | - > 80 mg/kg tělesné hmotnosti |
| Amphotericin B vodná kompozice (bez chloridu sodného) podle příkladů XIII & XIV | - 40 mg/kg tělesné hmotnosti   |

Hodnota LD<sub>50</sub> vodné kompozice Amphotericinu B připravené bez chloridu sodného podle příkladů XIII a XIV po podání jednotlivé injekce byla u myší 40 mg/kg tělesné hmotnosti ve srovnání s hodnotou >80 mg/kg pro vodnou kompozici Amphotericinu B připravenou

s chloridem sodným podle příkladu III. Toto dokazuje nezbytnost chloridu sodného pro vytvoření vodné kompozice Amphotericinu B s nízkou toxicitou.

Výhody vynálezu:

Výhody vynálezu jsou následující:

- i) Podle vynálezu byla vodná kompozice Amphotericinu B připravena bez použití DMSO, u něž byla prokázána hepatotoxicita.
- ii) V důsledku nízké rozpustnosti Amphotericinu B v organických rozpouštědlech přijatelných pro parenterální podání (0,1 mg/ml v metanolu) je potřeba velkých objemů organických rozpouštědel, z čehož pramení zdlouhavý a namáhavý proces výroby a špatné komerční využití. Způsob podle vynálezu nevyžaduje pro rozpouštění Amphotericinu B žádná organická rozpouštědla.
- iii) Postupy dosavadních technologií vyžadují speciální způsoby filtrace, jako je tangenciální průtoková filtrace nebo protlačování. Ve způsobu podle vynálezu jsou použity běžné filtrační postupy.
- iv) Produkt připravený způsobem podle vynálezu je stabilní při sterilizaci autoklávováním, a proto je vhodný pro intravenózní použití.

Způsob podle vynálezu je jednoduchý a účinný a představuje zdokonalení dosavadního stavu techniky. Nejdůležitějšími rysy způsobu podle vynálezu je větší čistota získaného produktu bez rizika zůstatku stop škodlivých rozpouštědel, jelikož tato rozpouštědla nejsou ve způsobu výroby vůbec použita.

patentové nároky určené pro další řízení

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob přípravy vodné kompozice s nízkou toxicitou pro parenterální podání bez dimetysulfoxidu obsahující Amphotericin B, chlorid sodný a fosfolipidy, **vyznačující se tím, že**
  - i) se rozpustí jeden nebo více fosfolipidů v jednom nebo více parenterálně přijatelných organických rozpouštědlech, načež se rozpouštědla odstraní odpařením za sníženého tlaku za vzniku suchého filmu jednoho nebo smíchaných fosfolipidů;
  - ii) rozsuspenduje se Amphotericinu B ve vodné fázi přijatelné pro parenterální podání, která neobsahuje chlorid sodný nebo se rozsuspenduje mikronizovaný Amphotericin B ve vodné fázi přijatelné pro parenterální podání, která může obsahovat chlorid sodný;
  - iii) načež se přidá vodná fáze, která je výsledkem kroku (ii), obsahující rozsuspendovaný Amphotericin B k filmu fosfolipidů, který je výsledkem kroku (i), za současného míchání vznikne suspenze Amphotericinu B s fosfolipidy ve vodné fázi;
  - iv) poté se upraví pH suspenze, která je výsledkem kroku (iii), na 6,0 až 8,0 a následně se homogenizuje až lze suspenzi filtrovat přes filtr ze skleněných vláken s velikostí pórů  $2 \times 10^{-3}$  mm ( $2 \mu$ );
  - v) načež se přidá dostatečné množství roztoku chloridu sodného ve vodě na konci kroku (iv) tak, aby obsah chloridu sodného v konečném produktu byl alespoň 0,1 hmotn./obj %.
2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** se dále homogenizovaná suspenze, která je výsledkem kroku (v), filtruje přes filtr ze skleněných vláken s velikostí pórů  $2 \times 10^{-3}$  mm ( $2 \mu$ ) a filtrát se naplní do ampulek pod atmosférou dusíku, ampulky se uzavřou a sterilizují autoklávováním, což dá konečný produkt vhodný pro parenterální podání.

3. Způsob podle nároku 1 nebo nároku 2, **vyznačující se tím, že** fosfolipidy jsou vybrány z vaječného fosfatidylcholinu nebo směsi dimyristoylfosfatidylcholinu a sodné soli dimyristoylfosfatidylglycerolu.
4. Způsob podle kteréhokoli z předcházejících nároků, **vyznačující se tím, že** organické rozpouštědlo je vybráno z alkoholových rozpouštědel, chlorovaných uhlovodíků a jejich směsí.
5. Způsob podle nároku 4, **vyznačující se tím, že** organické rozpouštědlo je vybráno z methanolu, ethanolu, isopropylalkoholu, trichlormethanu, tertrachlormethanu a dichlormethanu.
6. Způsob podle nároku 4, **vyznačující se tím, že** organické rozpouštědlo je ethanol.
7. Způsob podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačující se tím, že** obsah Amphotericinu B je od 0,1 hmotn./obj.% až 1 hmotn./obj.% kompozice.
8. Způsob podle nároku 7, **vyznačující se tím, že** obsah Amphotericinu B je 0,5 hmotn./obj.% kompozice.
9. Způsob podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačující se tím, že** obsah chloridu sodného je mezi 0,1 hmotn./obj.% až 0,9 hmotn./obj.% kompozice.
10. Způsob podle nároku 9, **vyznačující se tím, že** obsah chloridu sodného je mezi 0,4 hmotn./obj.% až 0,9 hmotn./obj.% kompozice.
11. Způsob podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačující se tím, že** obsah fosfolipidů je od 0,1 hmotn./obj.% až 1 hmotn./obj.% kompozice.
12. Způsob podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačující se tím, že** obsah fosfolipidů je od 0,4 hmotn./obj.% až 0,6 hmotn./obj.% kompozice.

13. Způsob podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačující se tím, že** hmotnostní poměr Amphotericinu B ku fosfolipidům je od 1 : 0,8 do 1 : 1,2.
14. Způsob podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačující se tím, že** fosfolipidy jsou dimyristoylfosfatidylcholin a dimyristoylfosfatidylglycerol, přičemž jejich hmotnostní poměr je od 7 : 1 do 7 : 15.
15. Způsob podle nároku 14, **vyznačující se tím, že** hmotnostní poměr dimyristoylfosfatidylcholinu a dimyristoylfosfatidylglycerolu je 7 : 3.
16. Způsob podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačující se tím, že** se použije nemikronizovaný Amphotericin B a parenterálně přijatelnou vodnou fází, která se použije v kroku (ii) podle nároku 1 je voda nebo fosfátový pufr.
17. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 15, **vyznačující se tím, že** se použije mikronizovaný Amphotericin B a parenterálně přijatelnou vodnou fází, která se použije v kroku (ii) podle nároku 1 je voda nebo fosfátový pufr, solný roztok nebo solný, fosfátový pufr.
18. Způsob podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačující se tím, že** pH vodné fáze, která se použije k rozsuspendování Amphotericinu B v kroku (ii) se upraví na 6,0 až 8,0.
19. Způsob podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačující se tím, že** sterilizace zhomogenizované, zfiltrované suspenze se provede běžným autoklávováním.
20. Způsob podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačující se tím, že** teplota sterilizace je 110 °C.
21. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 18 a 20, **vyznačující se tím, že** se sterilizace provede speciálním způsobem autoklávování při němž je značně zkrácen čas zahřívání a ochlazování pomocí cyklu rychlého zahřátí a ochlazení.

22. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 15 a 17 až 21, **vyznačující se tím, že** pokud se použije mikronizovaný Amphotericin B je chlorid sodný přidán v kterémkoliv z kroků (ii) až (iv) tak, že obsah chloridu sodného ve konečném produktu je alespoň 0,1 hmotn./obj.%.
23. Způsob podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačující se tím, že** konečný produkt vodné kompozice je zcela bez jakéhokoliv chlorovaného uhlovodíku
24. Vodná kompozice s nízkou toxicitou pro parenterální podání bez dimetysulfoxidu **vyznačující se tím, že** obsahuje Amphotericin B, chlorid sodný a fosfolipidy, přičemž ji lze připravit způsobem podle kteréhokoliv z předcházejících nároků.
25. Vodná kompozice s nízkou toxicitou pro parenterální podání bez dimetysulfoxidu obsahující Amphotericin B, chlorid sodný a fosfolipidy podle nárok 24 **vyznačující se tím, že** v podstatě je, jak popsána v kterémkoliv z příkladů I až XII.
26. Způsob přípravy vodné kompozice s nízkou toxicitou pro parenterální podání bez dimetysulfoxidu obsahující Amphotericin B, chlorid sodný a fosfolipidy podle nároku 1 **vyznačující se tím, že** v podstatě je, jak popsána v kterémkoliv z příkladů I až XII.

## Anotace

Název vynálezu: Vodná kompozice Amphotericinu B.

Jsou popsány vodné kompozice s nízkou toxicitou pro parenterální podání bez dimetysulfoxidu obsahující Amphotericin B. Kompozice ~~je~~ kromě Amphotericinu B v podstatě sestávají z fosfolipidů a chloridu sodného. Kompozice jsou sterilizovány autoklávováním. Byl popsán způsob přípravy těchto kompozic bez použití rozpouštědel rozpouštějících Amphotericin B. Kompozice jsou určeny pro léčbu invazních plísňových infekcí.

Trj