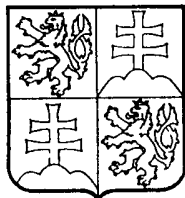


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(21) 02566-90.C

(13) A3

5(51) A 61 K 31/41

(22) 25.05.90

(32) 25.05.89

(31) 89/35694

(33) US

(40) 15.10.91

(71) E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY, Wilmington; Delaware, US

(72) Herbranson Dale E., Newark, Delaware, US
Speicher Earl R., Buffalo Grove, Illinois, US
Rosenberg Leonard S., Flemington, New Jersey, US

(54) Injektovatelný, vodný farmaceutický přípravek pro léčení
a ošetřování konvulzivních stavů

(57) Je popsán farmaceutický přípravek 3-(hydroxymethyl)-5,5-difenylhydantoin-disodného fosfátového esteru, proléčivo 5,5-difenylhydantoinu (phenytoinu) běžně používaného jako léčivo pro léčení a ošetřování epilepsie a jiných typů konvulzivních stavů. Bylo zjištěno, že degradace proléčiva na phenytoin může být řízena úpravou pH přípravku. Udržování pH v rozmezí 8,3 až 9,4 vede ke vzniku difenylglycinamidu jako primárního degradantu a minimalizuje degradaci na phenytoin.

5,5-Difenylhydantoin, phenytoin, je běžně dostupné léčivo pro léčení a ošetřování epilepsie a jiných typů konvulzivních stavů. Přestože phenytoin je široce pro léčení těchto stavů používán, má extrémně nízkou rozpustnost a následkem toho nízkou biovyužitelnost. Phenytoin je vysoko tající, slabě kyselé léčivo vykazující nízkou rozpustnost ve vodě. Tyto vlastnosti vedou k nepravidelné absorpci po orálním podání jak volné kyseliny tak volné sole. Viz publikace S.A.Varia a kol., Journal of Pharmaceutical Sciences 73(8):1068-1090, srpen 1984. Pro parenterální použití je phenytoin formulován ve vodném alkalickém mediu o pH 12, obsahujícím 40 % propylenglykolu a 10 % ethanolu. Parenterální dávková forma může být bolestivá, protože intravenózní injekce je rychlá a volná kyselina se na místech intramuskulární injekce sráží. Parenterální nouzové použití phenytoinu, zejména v případech kontroly záchvatu u pacientů se zraněním hlavy, může vyžadovat intramuskulární podání léčiva. Aby bylo klinicky přijatelné, mělo by intramuskulární podání léčiva minimálně poškozovat místo injekce. Intramuskulární podání phenytoinu sodného je uváděno jako bolestivé, což je vyvoláno pravděpodobně srážením phenytoinu. Je také možno pozorovat tvorbu modřin, hematomů a nekroz v místě injekce u koček a králíků.

Patent 4260769 vydaný 7.4.1981 a uvedený článek S.A.Varia a kol. v Journal of Pharmaceutical Sciences, popisuje různá proléčiva phenytoinu s více žádoucími fyziologickými vlastnostmi. Zejména patent 4260769 a uvedený článek popisuje phenytoinové proléčivo 3-(hydroxymethyl)-5,5-difenylhydantoin disodný fosfátový ester, který vykazuje fyzikálně-chemické vlast-

nosti takové, že je vhodný jako proléčivo phenytoinu pro parenterální použití. S.A.Varia a V.J.Stella na str. 1087 až 1090 v Journal of Pharmaceutical Sciences uvádí, že sloučenina nepoškozuje jakoukoli tkáň po subkutánním nebo intramuskulárním podání a tak, je vhodným kandidátem jako proléčivo pro intramuskulární podání phenytoinu. Nicméně toto proléčivo má sklon degradovat s následujícím srážením phenytoinu. Běžné metody použité k omezení momentu srážení zahrnují modifikaci přípravku obsahem činidel, která by mohla rozpouštět větší množství degradovaného produktu. Tato činidla zahrnují alkohol, propylenglykol, L-arginin, desoxycholát sodný, polysorbát-80 a různé kombinace těchto sloučenin.

Bylo zjištěno, že proléčivo, 3-(hydroxymethyl)-5,5-difenylhydantoin-disodný fosfátový ester, je stabilní ve vodném systému, jestliže je udržován při pH asi 8,3 až 9,4 za tvorby difenylglycinamidu jako primárního degradantu s minimálním množstvím phenytoinu. Výhodný farmaceutický prostředek by mohl obsahovat 35 až 130 mg/ml proléčiva a 0,05 až 0,2M pufr.

Stabilita proléčiva je vždy omezena srážením produktu. Toto srážení je vztaženo na degradaci proléčiva na phenytoin a následné srážení phenytoinu.

Výhodný farmaceutický prostředek může obsahovat:

proléčivo	35 až 130 mg/ml
alkohol	USP 0 až 25 %
propylenglykol	0 až 25 %
L-arginin	0 až 0,2 M
desoxycholát sodný	0 až 0,1 M
polysorbate-80	0 až 1,5 %
tromethamin	0,05 až 0,2 M

ve vodě pro injekce s pH upraveným od 8 do 10 kyselinou chlorovodíkovou nebo hydroxidem sodným.

Rozsah pH, ve kterém je stabilita nejvyšší, byl zjištěn od asi 8,3 do 9,4. V tomto rozsahu pH je omezen výběr pufrů, účinných pro udržení pH od asi 8 do 10. Spolu s tromethaminem, tris-(hydroxymethyl)aminomethanem jsou dalšími pufrů, které mohou být použity bicine, N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonová kyselina; tricine, N-/tris(hydroxymethyl)methyl/glycin; hydrogenuhličitan sodný; glycylglycin; Hepes, N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina; Hepps, N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-3-propansulfonová kyselina; fosforečnan sodný a Taps, 3/((tris(hydroxymethyl)methyl/amino)propansulfonová kyselina. Výhodné jsou Tromethamin, bicine nebo tricine. Vhodnými smáčecími činidly k polysorbátu-80 jsou dále polyoxamer 188 a estery polyoxyethylen- mastných kyselin. Zvláště výhodné složení prostředku bude obsahovat 75 mg/ml proléčiva; 0,1 M tromethaminu a bude mít pH v rozmezí od asi 8,3 do 9.

Následující tabulky ilustrují stabilitu přípravku phenytoinového proléčiva, obsahujícího 75,7 mg/ml proléčiva, 0,1 M tromethaminu, pH upraveno na 9,1 kyselinou chlorovodíkovou.

Tabulka 1

Hmotnostní bilance formaldehydu v degradovaném proléčivu

šarže	stáří (H ₂ O)	tepl.	pH	původní obsah	průběžný obsah	procenta DIZ	procenta jako proléčivo FORM	procenta získaná
2131	27	t.m.	8,9	98,22	93,75	0,196	5,553	101,30
2140	27	t.m.	8,9	96,42	92,13	0,172	5,042	100,96
2183	24	t.m.	8,8	98,06	94,30	0,130	4,450	100,84
2183	24	t.m.	8,8	98,06	94,30	0,135	4,314	100,70
2211	23	t.m.	8,3	104,52	103,38	0,033	1,509	100,38
2224	23	t.m.	8,9	103,75	97,24	0,155	4,349	98,07
2293	16	t.m.	8,5	100,91	99,11	0,055	1,747	100,00
2295	16	t.m.	8,3	101,49	99,04	0,040	1,303	98,91
2327	9	40	8,9	100,42	93,74	0,382	7,393	101,59
2327	8	40	8,9	101,41	94,88	0,342	7,450	101,24
2358	7	40	8,9	98,70	94,34	0,251	6,653	102,58
2360	7	40	8,9	99,63	94,61	0,245	5,364	100,59

DIZ = 5,5-difeny1-4-imidazolidinon

FORM = formaldehyd

Tabulka 2

šarže	stáří (HO)	tepl.	pH	původní obsah	průběžný obsah	degradační produkty (procenta jako prolečivo)					procenta zůstatková
						PHEN	DPG	BZP	DIZ	UNK	FORM
2131	27	t.m.	8,8	98,22	93,75	0,211	0,295	0,001	0,196	5,046	5,553
2140	27	t.m.	8,8	96,42	92,13	0,189	0,245	0,004	0,172	4,604	5,042
2181	24	t.m.	8,8	98,06	94,30	0,131	0,053	0,002	0,130	4,264	4,450
2181	24	t.m.	8,8	98,06	95,57	0,130	0,049	0,003	0,135	4,132	4,314
2211	23	t.m.	8,3	104,52	103,38	0,016	0,011	0,0003	0,030	0,482	1,509
2224	23	t.m.	8,9	103,75	97,24	0,106	0,047	0,0015	0,015	4,195	4,349
2293	16	t.m.	8,5	100,91	99,11	0,053	0,000	0,0005	0,055	1,594	1,747
2295	16	t.m.	8,3	101,49	99,04	0,059	0,000	0,0006	0,040	1,243	1,303
2327	9	40	8,8	100,42	93,74	1,485	1,147	0,013	0,382	5,248	7,893
2327	8	40	8,8	101,41	94,88	1,071	0,745	0,014	0,342	5,619	7,450
2358	7	40	8,8	98,70	94,34	0,769	0,404	0,006	0,251	5,474	6,653
2360	7	40	8,8	99,63	94,61	0,800	0,419	0,005	0,246	4,140	5,364

získaný průměr 100,71

PHEN = phenytoin

BZP = benzoofenon

UNKN = neznámá, vypočteno následovně:

DPG = difenylglycin

DIZ = 5,5-difenyl-4-indazolinon

UNKN = FORM-PHEN-DPG-BZP

FORM = formaldehyd

poznámka: neznámá (UNKN) byla identifikována jako difenylglycinamid

Původně se předpokládalo, že se phenytoinové proléčivo rozkládá jednoduchým dvoustupňovým způsobem za vzniku phenytoinu. Nicméně bylo zjištěno, že phenytoin není samotným rozkladným produktem a může tvořit pouze malou část degradovaného proléčiva. Postup degradace byl určen tak, že z phenytoinového proléčiva popsáním způsobem vzniká formaldehyd, 5,5-difenyl-1,4-imidazolidinon (DIZ), difenylglycinamid, difenylglycin, benzofenon a phenytoin.

Celý postup degradace je znázorněn ve schematu V. Mnoho uvedených stupňů zahrnuje spotřebu hydroxyly což indikuje, že pH zpracovaného přípravku by mělo s časem klesat. To bylo také pozorováno při běžném stabilitním testu tohoto přípravku. Proto je žádoucí přídavek pufru bránící významnému snížení původní hodnoty pH během použitelnosti přípravku. Malé změny ve způsobu degradace se objevují s poklesem pH. Je zřejmé, že s klesající hodnotou pH se stupeň tvorby phenytoinu zvyšuje a snižuje se stupeň tvorby DIZ. To znamená, že předpokládané otevření hydantoinového kruhu fosfátem se jeví jako stupeň omezující rychlost v primárním schematu rozkladu phenytoinového proléčiva. Nicméně se tvorba phenytoinu zvyšuje a jeho rozpustnost se snižuje s klesajícím pH a tím omezuje použitelnost produktu vzhledem k nasycení vodného roztoku a případnému vysrážení phenytoinu. Výběr pH konečného přípravku umožňuje takový postup degradace, který vede k difenylglycinamidu jako primárnímu degradačním produktu, přičemž ~~zde~~ je minimalizována tvorba phenytoinu a doba použitelnosti přípravku je maximalizována.

Bylo analyzováno několik vzorků při teplotě místnosti a při 40 °C a byla provedena hmotnostní bilance. Analýza phenytoinového proléčiva, formaldehydu, 2,2-difenylglycinu, 5,5-difenylhydantoinu, 5,5-difenyl-4-imidazolidinonu a benzofenonu a stanovení jejich koncentrací bylo provedeno za použití isokratické HPLC metody. Byly vypočteny molární ekvivalenty a porovnána hmotnostní bilance.

Tabulka III

Nová hmotnostní bilance 75 mg/ml proléčiva za použití metody II

číslo	stáří (HO)	tepl.	pH	9653 počáteční %	degradační produkty (procenta proléčiva)			získáno %	
					PHEN	DPG	DIZ		
2131	30	t.m.	8,8	93,06	0,141	0,243	0,174	5,144	98,76
2140	30	t.m.	8,8	94,79	0,148	0,247	0,182	5,240	100,51
2183	27	t.m.	8,8	98,40	no	0,116	0,137	3,021	101,57
2211	25	t.m.	8,3	98,64	0,097	0,041	0,027	1,254	100,06
2224	24	t.m.	8,8	94,85	0,104	0,110	0,163	3,810	99,04
2293	18	t.m.	8,5	98,70	no	0,80	no	1,631	100,41
2295	18	t.m.	8,3	98,53	no	0,032	0,034	1,163	99,76
2327	10	40	8,8	92,11	1,491	1,224	0,437	5,000	100,33
2358	9	40	8,3	93,21	1,110	0,757	0,329	4,153	99,56
2360	9	40	8,3	92,34	1,157	0,766	0,323	4,115	98,70

průměrně získáno 99,89

PHEN = phenytoin, DPG = difenylglycin, DIZ = 5,5-difenyl-4-imidazolidinon,

DPGA = difenylglycinamid (neznámá v tabulce II), no = nedektováno nic

Statistické vyhodnocení a porovnání

Metoda I -gradientová metoda

Bylo provedeno několik chromatografických záznamů každé sloučeniny za účelem zjištění linearity. Plochy píků a výšky píků byly vyneseny proti příslušným koncentracím a byly zaznamenány kalibrační křivky. Všechny křivky standardů měly obvykle korelační koeficient $> 0,99$. Výšky píků nebo plochy byly v rozmezí 4 % lineární regresní křivky a tím byly v rozmezí předem stanovených vyhovujících požadavků. Relativní standardní odchylky byly menší než 1,7 % při hodnocení ploch píků a menší než 2,2 % při hodnocení výšek píků. Tyto výsledky potvrzují, že výsledky jsou přesné.

Stejná ředění standardů byla použita pro stanovení limitu detekce a kvantitativního stanovení.

U všech standardů byla provedena chromatografie. Plochy píků byly stanoveny data-systémem a byla potvrzena linearita. Údaje z nástríků standardů byly pořízeny před a po nástríku vzorků a vyhodnocena byla účinnost a vhodnost systému HPLC.

Limity kvantitativního stanovení byly experimentálně stanoveny a jsou uvedeny níže.

	<u>plocha píku</u>	<u>výška píku</u>
difenylglycin	8,3 $\mu\text{g/ml}$	27,7 $\mu\text{g/ml}$
difenylhydantoin	0,5 $\mu\text{g/ml}$	3,0 $\mu\text{g/ml}$
difenyl-4-imidazolidinon	8,9 $\mu\text{g/ml}$	1,5 $\mu\text{g/ml}$
benzofenon	0,05 $\mu\text{g/ml}$	0,05 $\mu\text{g/ml}$

Limity detekce byly stanoveny experimentálně a jsou uvedeny níže.

	<u>plocha nebo výška píku</u>
difenylglycin	1,0 $\mu\text{g/ml}$
difenylhydantoin	0,3 $\mu\text{g/ml}$
difenyl-4-imidazolidinon	0,5 $\mu\text{g/ml}$
benzofenon	0,01 $\mu\text{g/ml}$

Směsná kalibrační křivka zahrnující 2,2-difenylglycin, 5,5-difenylhydantoin a 5,5-difenyl-4-imidazolidinon byla provedena zaznamenáním několikanásobnou chromatografií, s cílem ověření shodnosti s individuálními kalibračními křivkami. Plochy píků a jejich výšky byly vyneseny proti příslušným koncentracím a zaznamenány křivky. Strmosti a y-úseky byly porovnány s jednotlivými standardy za účelem srovnání jejich identity. Byly chromatografovány opakované nástřiky kombinovaných standardních roztoků. Relativní standardní odchylky byly menší než 1,7 % při vyhodnocení z ploch píků a menší než 2,0 % při vyhodnocení z výšek píků, s výjimkou difenylglycinu, kde odchylka při vyhodnocení z výšek píků činila 3,09 %. Výsledky potvrdily, že postup používající kombinovanou kalibrační křivku je přesný.

Hmotnostní bilance

Několik vzorků bylo uchováno různou dobu při teplotě místnosti a při 40 °C a byly analyzovány s cílem zjištění hmotnostní bilance. Původní a průběžně stanovená účinnost společně

s koncentracemi formaldehydu byly stanovovány pro určení hmotnostní bilance. Koncentrace ~~formaldehydu~~ difenylhydantoinu, difenylglycinu, difenyl-4-imidazolidinonu a benzofenonu byly stanoveny chromatograficky za použití metody I. Z těchto údajů byla stanovena hmotnostní bilance. Původní a průběžně stanovované hodnoty účinnosti byly převedeny na původní a průběžné hodnoty phenytoinového proléčiva. Koncentrace formaldehydu, difenylglycinu, difenylhydantoinu, difenyl-4-imidazolidinonu a benzofenonu byly převedeny na molární ekvivalenty. Počet mol neznámé složky B (která byla později identifikována jako difenylglycin), byla vypočtena pomocí rovnice 1 za použití hodnot počtu mol formaldehydu, difenylglycinu, difenylhydantoinu a benzofenonu.

$$\begin{aligned} \text{Mol neznámé složky } B^x &= \text{formaldehyd (mol)} - \text{difenylglycin (mol)} - \text{(I)} \\ &\quad \text{difenylhydantoin (mol)} - \text{benzofenon (mol)} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{moly stanovené} &= \text{průběžně stanovené moly} + \text{neznámá } B^x \text{ (mol)} + \\ &\quad \text{difenylglycin (mol)} + \text{difenylhydantoin (mol)} \\ &\quad + \text{difenyl-4-imidazolidinon (mol)} + \text{benzofenon (mol)} \end{aligned} \quad \text{(II)}$$

$$\% \text{ ziskání} = \frac{\text{stanovené moly}}{\text{počáteční moly}} \times 100 \quad \text{(III)}$$

^xNeznámá B byla identifikována jako difenylglycinamid

% ziskání ze 12 analyzovaných vzorků činila 98,0 až 102,6% čímž byla ověřena hmotnostní bilance (tabulka I).

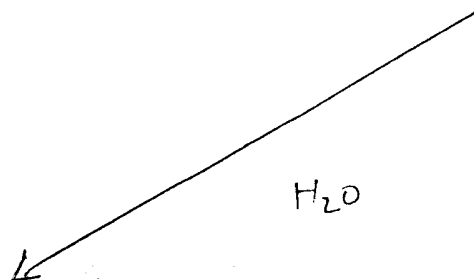
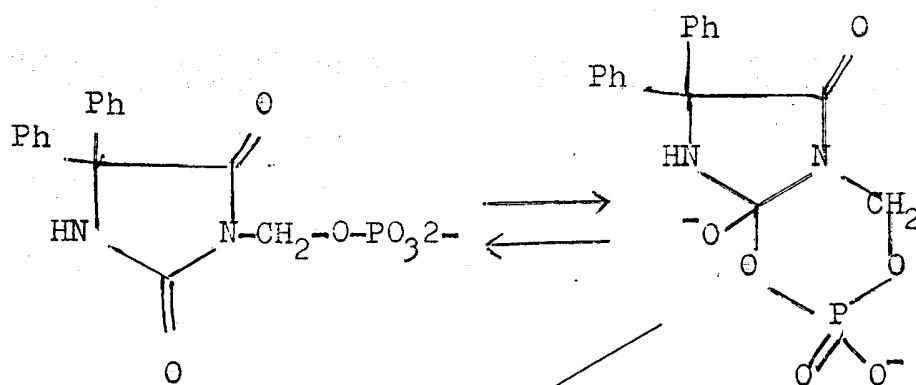
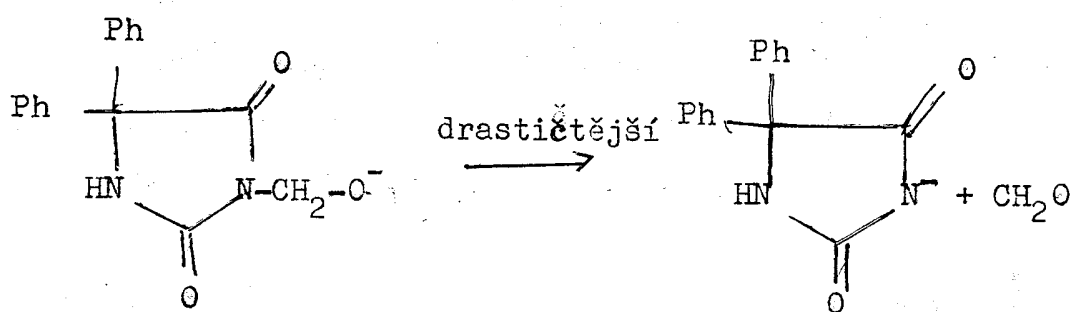
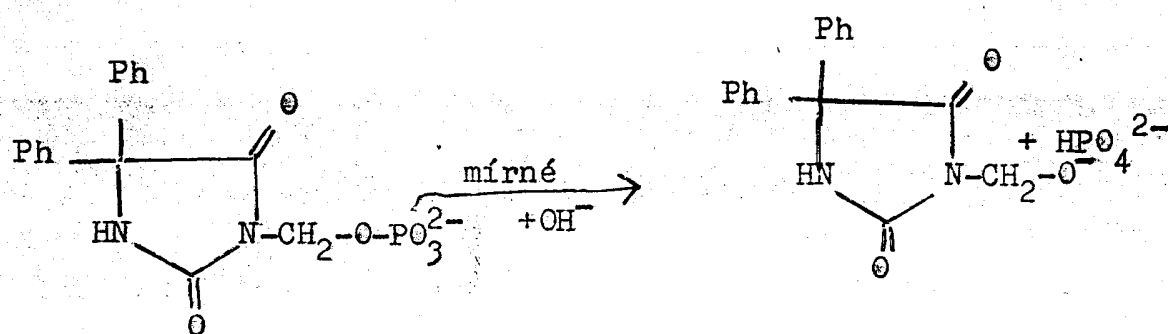
Metoda II -Isokratická metoda

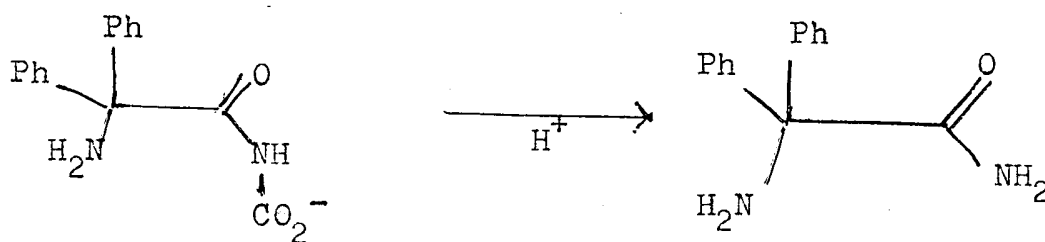
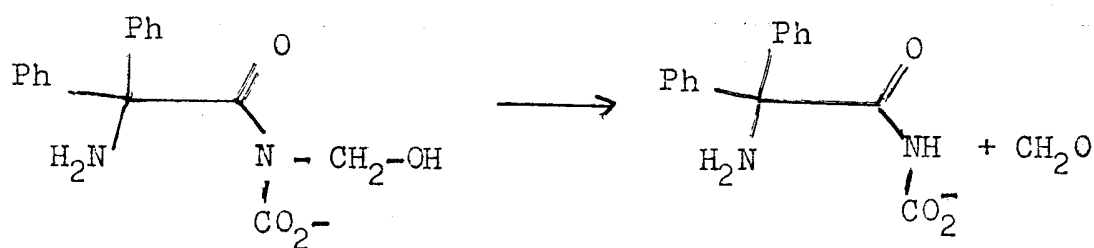
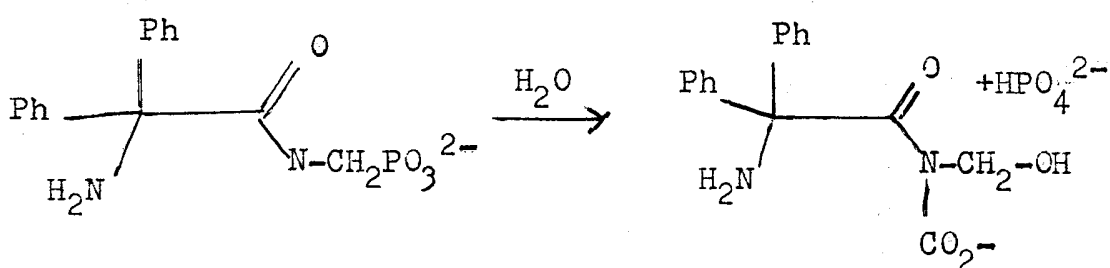
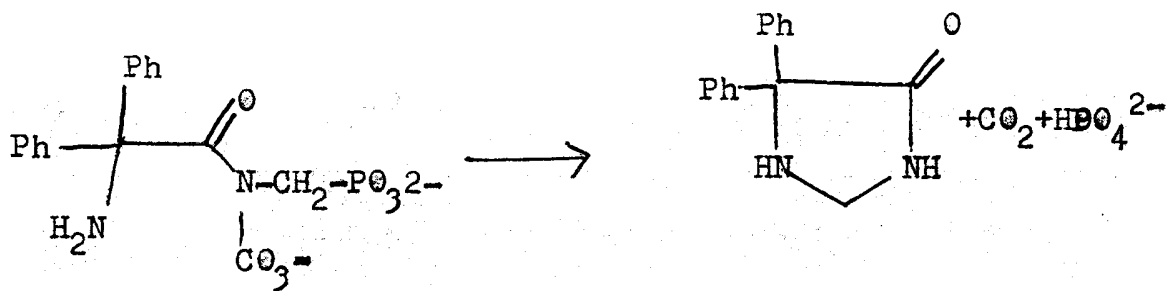
Linearita

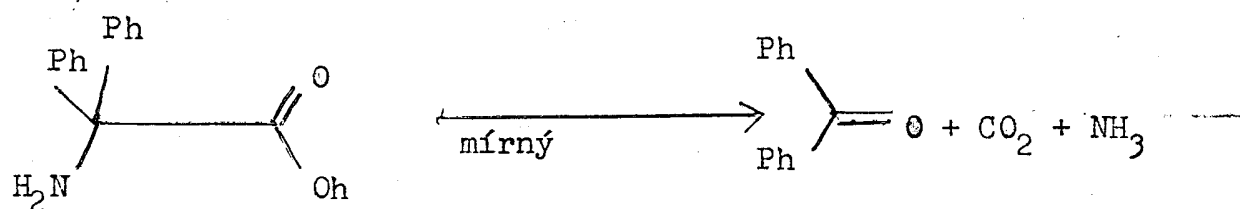
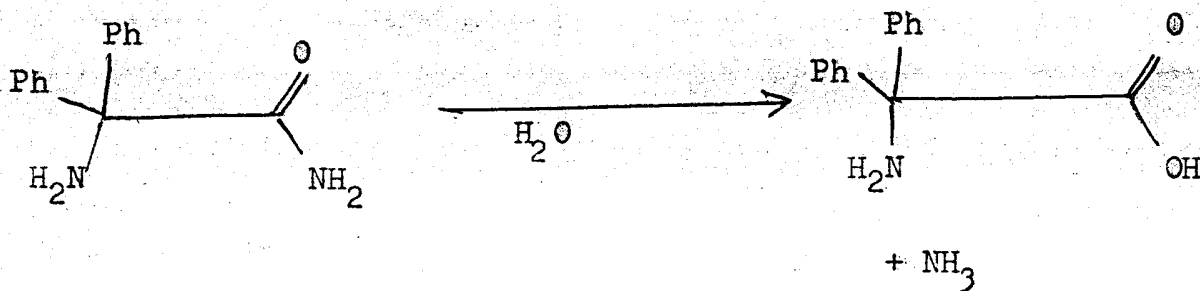
Na stanovení linearit isokratické metody byly provedeny standardní křivky. Ve všech případech měly lineární regresní křivky pro difenylglycin, 5,5-difenyl-4-imidazolidinon a phenytoin korelační koeficienty větší než 0,999. Difenylglycinamid byl potvrzen a identifikován jako produkt degradace dříve označovaný jako neznámá složka B. Jelikož standard difenylglycinamidu není dostupný, ke stanovení jeho koncentrace ve vzorku byl použit difenylglycin.

Přesnost isokratické metody byla stanovena pouze analýzami několika šarží rozloženého proléčiva a porovnáním výsledků s výsledky gradientové metody (viz tabulka II a III). Výsledky vykazují velmi příznivé srovnání pro všechny degradační produkty. Hlavní rozdíl je vidět v hodnotách difenylglycinamidu (dříve ve označovaném jako neznámá složka B). Jelikož byl stanoven za použití difenylglycinu jako standardu na místo diferenčního způsobu (rovnice 1), byl pozorován slabý pokles. Tyto výsledky ukazují, že kvantifikace diferenčním způsobem je ovlivňována variacemi při stanovení obsahu formaldehydu.

Schema V







P A T E N T O V E N Á R O K Y

1. Injektovatelný, vodný farmaceutický přípravek pro léčení a ošetřování konvulzivních stavů, vyznačující se tím, že obsahuje účinné množství 3-(hydroxymethyl)-5,5-difenylhydantoin-disodného fosfátového esteru (proléčivo phenytoinu) pro léčení takových konvulzivních stavů, přičemž tento přípravek obsahuje asi 35 mg až asi 180 mg proléčiva/ml roztoku a 0,05 až 0,2 M pufru; přípravek má pH v rozmezí od asi 8,3 do 9,4, proléčivo degraduje ve vodném roztoku za vzniku difenylglycinamidu jako primárního degradantu s minimálním množstvím phenytoinu, pH rozsah působí proti degradaci čímž se maximalizuje doba životnosti proléčiva ve vodném přípravku.
2. Přípravek podle bodu 1, vyznačující se tím, že pufr je zvolen ze skupiny zahrnující tromethamin, bicine a tricine.
3. Přípravek podle bodu 2, vyznačující se tím, že pufr je tromethamin.
4. Přípravek podle bodu 3, vyznačující se tím, že proléčivo je přítomno v množství 75 mg/ml.
5. Přípravek podle bodu 1, vyznačující se tím, že pH je asi 8,3 až 9.

Číslo	033518
došlo	23. VII. 90
ÚŘAD PRO VYNALEZY A OBJEVY	PŘÍL.

6. Způsob léčení nebo ošetřování konvulzivních stavů u savců, vyznačující se tím, že se savci v případě potřeby podá subkutánně nebo intramuskulárně antikonvulzivní množství stabilního farmaceutického přípravku proléčiva 3-(hydroxymethyl)-5,5-difenylyhydantoin-disodného fosfátového esteru, přičemž tento přípravek obsahuje od asi 35 do 130 mg/ml proléčiva a od asi 0,05 do 2 M pufru účinného pro udržení pH v rozmezí asi 8,3 až 9,4.

Zastupuje:

**PATENTSERVIS
PRAHA**

Radicev