



(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) 
1-0021166

(51)⁷ **A61K 31/40, 47/48, 47/40, 9/08, 9/19,**
A61P 3/06

(13) **B**

(21) 1-2012-03069

(22) 06.04.2011

(86) PCT/US2011/031388 06.04.2011

(87) WO2011/130079 20.10.2011

(30) 12/762,025 16.04.2010 US

(45) 25.06.2019 375

(43) 25.06.2013 303

(73) CUMBERLAND PHARMACEUTICALS, INC. (US)

2525 West End Ave., Ste. 950, Nashville, TN 37203, United States of America

(72) PAVLIV, Leo (US), VILA, Andrew (US)

(74) Công ty TNHH Tâm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) **DƯỢC PHẨM DÙNG NGOÀI ĐƯỜNG TIÊU HÓA CHỨA ATORVASTATIN,
PHƯƠNG PHÁP BÀO CHẾ DƯỢC PHẨM, HẠT ĐÔNG KHÔ CHỨA
ATORVASTATIN VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ HẠT ĐÔNG KHÔ NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến dược phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa ở dạng dung dịch nước về cơ bản chứa lượng hữu hiệu của atorvastatin hoặc muối dược dụng của nó được tạo phức với lượng hữu hiệu của chất tạo phức dược dụng là hydroxy-propyl- β -cyclodextrin và phương pháp bào chế dược phẩm này. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phương pháp điều chế hạt đông khô chứa atorvastatin dược dụng và chất tạo phức dược dụng, và hạt đông khô thu được từ phương pháp này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến được phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa ở dạng dung dịch nước về cơ bản chứa lượng hữu hiệu của atorvastatin hoặc muối được dụng của nó được tạo phức với lượng hữu hiệu của chất tạo phức được dụng là hydroxy-propyl- β -xyclodextrin và phương pháp bào chế được phẩm này. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phương pháp điều chế hạt đông khô chứa atorvastatin được dụng và chất tạo phức được dụng, và hạt đông khô thu được từ phương pháp này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong một vài thập kỷ gần đây, cholesterol trong máu cao là yếu tố rủi ro chính đối với bệnh tim mạch vành (coronary heart disease - CHD), và nhiều nghiên cứu đã cho thấy rằng nguy cơ của hiện tượng CHD có thể được giảm bằng cách điều trị để giảm lipit. Trước năm 1987, biện pháp giảm lipit bị hạn chế về cơ bản ở sự cải biến chế độ dinh dưỡng thành chế độ dinh dưỡng có cholesterol và chất béo no thấp, chất chelat hóa axit mật (cholestyramin và colestipol), axit nicotinic (niacin), các fibrat và probucol. Không may là, tất cả các cách điều trị này đều có hiệu lực hoặc khả năng dung nạp hạn chế, hoặc cả hai. Với việc đưa lovastatin (MEVACOR®; xem patent Mỹ số 4.231.938) – chất ức chế HMG-CoA reductaza đầu tiên có sẵn cho đơn thuốc vào năm 1987 – các bác sĩ lần đầu tiên có khả năng thu được sự giảm cholesterol trong huyết tương tương đối lớn với rất ít tác dụng phụ.

Chất ức chế HMG CoA reductaza, thường được biết dưới tên statin, được chia thành hai nhóm: có nguồn gốc từ lên men và tổng hợp. Ngoài sản phẩm lovastatin tự nhiên, đã có một vài chất ức chế HMG-CoA reductaza bán tổng hợp và tổng hợp hoàn toàn đã được phê chuẩn để sử dụng trong kê đơn, bao gồm simvastatin (ZOCOR®; xem patent Mỹ số 4.444.784), muối natri pravastatin (PRAVACHOL®; xem patent Mỹ số 4.346.227), muối natri fluvastatin (LESCOL®; xem patent Mỹ số 5.354.772), muối canxi atorvastatin (LIPITOR®; xem patent Mỹ số 5.273.995) và muối natri cerivastatin (BAYCOL®; xem patent Mỹ số 5.177.080). Các chất ức chế HMG-CoA

reductaza khác nữa đang được phát triển, ví dụ, pitavastatin còn được gọi là NK-104 (xem WO 97/23200); và rosuvastatin còn được biết là ZD-4522 (CRESTOR®; xem patent Mỹ số 5.260.440, và *Drugs of the Future*, 1999, 24(5), các trang từ 511 đến 513). Công thức cấu trúc của các chất ức chế này và các chất ức chế HMG-CoA reductaza bổ sung, được mô tả ở trang 87 của M. Yalpani, “Cholesterol Lowering Drugs”, *Chemistry & Industry*, các trang từ 85 đến 89 (05/02/1996). Các chất ức chế HMG-CoA reductaza được mô tả ở trên thuộc lớp cấu trúc của các hợp chất chứa gốc mà có thể tồn tại dưới dạng vòng 3-hydroxy lacton hoặc dưới dạng axit mở dihydroxy được mở ở vòng tương ứng, và thường được gọi là các “statin”.

Patent Mỹ số 5.356.896 mô tả được phẩm dạng liều chứa hợp chất ức chế HMG-CoA reductaza, ví dụ, natri fluvastatin, mà được làm ổn định chống lại sự phân hủy có liên quan đến độ pH bởi môi trường làm ổn định kiềm có khả năng truyền độ pH ít nhất bằng 8 cho dung dịch hoặc hệ phân tán dạng nước của chế phẩm. Patent số 5.356.896 nêu rằng hoạt chất và môi trường kiềm phải được cho kết hợp tiếp xúc kỹ lưỡng, tốt hơn nếu bằng quy trình điều chế dựa trên nước hoặc dung môi khác, nhờ đó “hoạt chất và môi trường kiềm được trộn lẫn cùng nhau trong điều kiện có mặt lượng nhỏ nước, chẳng hạn, để tạo ra các hạt chứa hoạt chất và hợp chất kiềm trong hỗn hợp được trộn nhuộm”. Các hạt thu được được làm khô và sau đó được trộn lẫn với chất độn và các tá dược còn lại, mà dự trữ để bao gồm “pha bên ngoài” của các hạt này, để tạo ra chế phẩm thích hợp để bao nang, tạo viên nén hoặc các dạng tương tự.

Theo phương án khác được mô tả trong patent số 5.356.896, quy trình dựa trên dung môi được sử dụng để hỗ trợ quá trình làm khô tiếp theo trong tầng sôi, nhờ đó hoạt chất của thuốc và môi trường kiềm được tạo hạt ướt bởi kỹ thuật đã biết, tức là, được trộn lẫn ở trạng thái được làm ẩm, cùng với lượng nguyên liệu chất độn và các hạt thu được, sau khi làm khô, được kết hợp với chất độn bất kỳ còn lại và các chất phụ gia khác, ví dụ, chất kết dính, chất làm trơn, và do đó có thể được tạo viên nén, bao nang, hoặc theo cách khác được tạo dạng thành dạng liều.

Patent số 5.356.896 mô tả rằng để đạt được thời hạn sử dụng kéo dài của các chế phẩm, điều quan trọng là “các hạt được điều chế bằng cách nghiền thành bột hoặc tạo hạt ướt hoặc quy trình gốc nước khác về cơ bản được làm khô hoàn toàn, tức là, sự tồn thất trọng lượng khi làm khô (L.O.D.) không lớn hơn 3%, và tốt hơn là không lớn

hơn 2%”. Patent số 5.356.896 cũng mô tả rằng bước làm khô thường được tiến hành bằng cách làm khô bằng khay hoặc trong tầng sôi, tốt hơn là sự làm khô tầng sôi thường được thực hiện ở nhiệt độ của vào khoảng 50°C và độ ẩm tương đối dưới 50%. Patent số 3,356,896 còn mô tả quy trình điều chế khác đối với các kỹ thuật nghiền thành bột hoặc tạo hạt ướt đã được mô tả ở trên, trong đó hoạt chất của thuốc và môi trường làm ổn định kiềm có thể được đông khô, tức là, được đông khô, từ dung dịch dạng nước như là một bước *in situ* của quy trình sản xuất thuốc.

Hầu hết các statin đều tương đối không tan và được xem xét bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này là không thể ổn định trong dung dịch, và do đó lớp thuốc này được sản xuất ở dạng rắn. Tuy nhiên, có một số bệnh nhân không thể ăn vào bụng, tiêu hóa, hoặc theo cách khác hấp thu thuốc qua đường miệng và có nhu cầu dùng thuốc theo đường tĩnh mạch. Các dấu hiệu lâm sàng chỉ ra rằng các statin, thông qua cơ chế kháng viêm và có thể là các cơ chế khác nữa, có khả năng giảm tỷ lệ mắc phải cơn đau tim, đột quỵ, cũng như các tình trạng bệnh khác do chứng viêm gây ra.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất chế phẩm ổn định chứa statin mà có thể được dùng theo đường tĩnh mạch.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm statin dạng rắn mà có thể được hoàn nguyên trong dung dịch dạng nước thích hợp để tiêm vào động vật có vú.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất các hạt đông khô của statin và chất tạo phức hoặc chất hòa tan.

Mục đích khác là đề xuất phương pháp điều chế các hạt đông khô của statin và chất tạo phức hoặc chất hòa tan.

Sáng chế còn mô tả phương pháp điều trị bệnh cho người bằng statin sử dụng các chế phẩm và phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Các mục đích này và các mục đích khác đạt được bởi sáng chế, mà có liên quan một phần đến statin không tan trong nước được tạo phức với lượng đủ của chất tạo phức được dùng trong dung dịch có độ pH nằm trong khoảng từ 7 đến 9 để tạo ra nồng độ statin đã được hòa tan ít nhất khoảng 3,32mg/ml. Sáng chế còn đề cập đến được phẩm chứa lượng hữu hiệu của statin được tạo phức như được mô tả ở trên.

Theo các phương án nhất định, nồng độ statin được hòa tan nằm trong khoảng từ 1mg/ml đến 25mg/ml. Theo các phương án được ưu tiên nhất định, nồng độ statin được hòa tan nằm trong khoảng từ 5mg/ml đến 15mg/ml. Theo các phương án được ưu tiên nhất định, nồng độ statin được hòa tan khoảng 10mg/ml.

Theo một số phương án, statin có thể được chọn từ nhóm bao gồm lovastatin, simvastatin, mevastatin, atorvastatin, cerivastatin và rivastatin.

Theo một số phương án, chất tạo phức là xyclodextrin. Theo các phương án được ưu tiên nhất định, chất tạo phức là hydroxy-propyl- β -cyclodextrin.

Theo một số phương án, statin đã được tạo phức được làm đông khô.

Sáng chế một phần còn đề cập đến các hạt chất rắn chứa statin không tan trong nước mà có thể được hòa tan dễ dàng trong dung dịch dạng nước thích hợp để tiêm vào động vật có vú, các hạt này là các hạt được đông khô chứa statin được dụng và lượng đủ của chất tạo phức được dụng.

Sáng chế một phần còn đề cập đến các hạt đông khô chứa statin không tan trong nước và lượng hữu hiệu của chất tạo phức để tạo ra độ ổn định trong nước đối với statin này và để tạo ra độ ổn định đối với chế phẩm khi được hoàn nguyên trong môi trường dạng nước.

Theo các phương án nhất định, các hạt đông khô được điều chế bằng cách trước tiên bổ sung statin không tan trong nước vào chất tạo phức, sau đó hỗn hợp được phối trộn. Theo một số phương án, chế phẩm sau đó được đông khô để thu được các hạt đông khô.

Theo các phương án được ưu tiên nhất định của sáng chế, các hạt đông khô chứa statin không tan trong nước và chất tạo phức là ổn định. Thuật ngữ “ổn định” có nghĩa là về cơ bản không quan sát thấy sự phân rã của các hạt đông khô (sản phẩm) sau khi bảo quản trong 1 tháng ở nhiệt độ 40°C. Theo các phương án được ưu tiên, thuật ngữ “ổn định” liên quan đến các hạt đông khô chứa statin không tan trong nước và chất tạo phức nghĩa là quan sát thấy sự phân rã ít hơn khoảng 0,1% sau khi bảo quản trong 1 tháng ở nhiệt độ 40°C.

Theo một số phương án của sáng chế, độ pH được điều chỉnh đến giá trị nằm trong khoảng từ 7 đến 9 bằng cách sử dụng chất đệm hoặc chất kiềm hóa được dụng,

với các chất kiềm hóa và chất đệm thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở NaOH, KOH, triethylamin, meglumin, L-Arginin, đệm natri phosphat (natri phosphat ba lần, natri phosphat hai lần, natri phosphat một lần hoặc axit o-phosphoric), natri bicarbonat và hỗn hợp gồm bất kỳ một trong số các hợp chất nêu trên. Theo một phương án của sáng chế, các hạt đông khô chứa một trong số các statin sau: lovastatin, simvastatin, pravastatin, mevastatin, fluvastatin, atorvastatin, rosuvastatin, cerivastatin và rivastatin. Các hạt đông khô theo các phương án nhất định có thể chứa xyclodextrin làm chất tạo phức và theo các phương án được ưu tiên nhất định, xyclodextrin là hydroxy-propyl- β -cyclodextrin.

Sáng chế một phần còn đề cập đến phương pháp điều chế các hạt đông khô chứa statin được dung và chất tạo phức được dung, trong đó statin được bổ sung vào hỗn hợp gồm chất tạo phức và dung môi thích hợp, sau đó hỗn hợp được phối trộn. Theo các phương án nhất định, độ pH sau đó được điều chỉnh bằng cách sử dụng chất đệm được dung đến độ pH nằm trong khoảng từ 7 đến 9. Hỗn hợp sau đó có thể được làm đông khô để thu được các hạt đông khô. Statin được dung tốt hơn là không tan trong nước và có thể được chọn, ví dụ, từ nhóm bao gồm lovastatin, simvastatin, mevastatin, atorvastatin, cerivastatin và rivastatin. Theo các phương án nhất định, chất tạo phức là xyclodextrin.

Mặc dù theo các phương án được ưu tiên nhất định, sáng chế bao gồm việc sử dụng statin không tan trong nước, theo các phương án khác của sáng chế, statin có thể không tan trong nước hoặc tan trong nước. Các ví dụ về statin tan trong nước thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, risuvastatin, fluvastatin và pravastatin.

Do đó, theo các phương án nhất định, sáng chế đề cập đến chế phẩm ổn định của statin hòa tan và các phương pháp bào chế chúng. Theo các phương án này, (các) statin hòa tan được làm ổn định thông qua bước đông khô như được mô tả trong bản mô tả này.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp bào chế được phẩm ổn định chứa các hạt đông khô của statin, trong đó statin được tạo phức với lượng hữu hiệu của chất tạo phức được dung trong dung dịch dạng nước và độ pH được điều chỉnh đến giá trị nằm trong khoảng từ 7 đến 9 trước khi làm đông khô.

Theo các phương án nhất định, các hạt đông khô được hoàn nguyên trong lượng hữu hiệu của dung dịch được dụng để tiêm vào bệnh nhân là người. Theo các phương án nhất định khác, các hạt đông khô đã được hoàn nguyên được tiêm vào bệnh nhân là người.

Sáng chế một phần còn mô tả phương pháp điều trị bệnh bao gồm các bước: (a) điều chế các hạt đông khô bằng cách bổ sung statin vào hỗn hợp gồm chất tạo phức và dung môi thích hợp và làm đông khô hỗn hợp để thu được các hạt đông khô; (b) hoàn nguyên các hạt đông khô trong dung dịch được dụng để tiêm; và (c) sử dụng lượng thích hợp của dung dịch này để cung cấp lượng hữu hiệu của statin cho bệnh nhân là người cần điều trị. Theo các phương án nhất định, statin được sử dụng với lượng hữu hiệu để giảm mức lipit của bệnh nhân và/hoặc để tạo ra tác dụng kháng viêm (hữu hiệu để điều trị bệnh) mong muốn hoặc tác dụng điều trị bệnh khác.

Theo một số phương án, sau khi statin được bổ sung vào hỗn hợp gồm chất tạo phức và dung môi, hỗn hợp này được cuộn xoáy và nghiền siêu âm và độ pH của hỗn hợp được điều chỉnh đến giá trị nằm trong khoảng từ 7 đến 9 bằng cách sử dụng chất đệm được dụng.

Theo các phương án nhất định, statin được chọn từ nhóm bao gồm lovastatin, simvastatin, pravastatin, mevastatin, fluvastatin, atorvastatin, rosuvastatin, cerivastatin và rivastatin và chất tạo phức là xyclodextrin.

Theo các phương án nhất định của sáng chế, chất tạo phức bao gồm ít nhất khoảng 13,5% của chế phẩm.

Theo các phương án nhất định của sáng chế, nồng độ statin được hòa tan ít nhất khoảng 3,3mg/ml.

Như được đề cập ở trên, sáng chế còn đề cập đến được phẩm chứa ít nhất hợp chất theo sáng chế có công thức (I) cùng với tá dược và/hoặc chất mang không độc thường được sử dụng trong lĩnh vực dược phẩm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

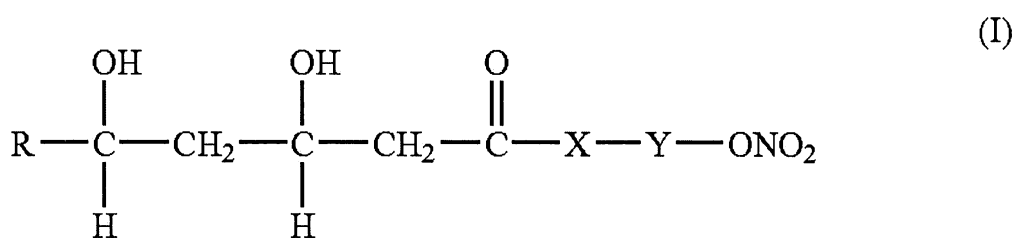
Fig.1 thể hiện phép phân tích hồi quy tuyến tính lượng HP β -CD tối thiểu cần để hòa tan AS-Ca.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế một phần đề cập đến dược phẩm chứa lượng hữu hiệu của statin được dụng được tạo phức với lượng đủ của chất tạo phức được dụng và phương pháp bào chế chúng.

Sáng chế một phần còn đề cập đến các chế phẩm chứa statin không tan trong nước mà được tạo phức với lượng đủ của chất tạo phức được dụng để làm cho statin không tan trong nước tan trong môi trường dạng nước, chế phẩm này còn được đông khô để tạo ra chế phẩm ổn định của statin không tan trong nước mà có thể được hòa tan trong môi trường dạng nước.

Statin không tan trong nước thích hợp để sử dụng trong sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, lovastatin, simvastatin, mevastatin, atorvastatin, cerivastatin và rivastatin, muối được dụng của nó, và phức chất được dụng của nó. Thuật ngữ “không tan trong nước” như được sử dụng trong bản mô tả này, có nghĩa là khoảng xác định USP từ hòa tan rất ít đến không tan (độ hòa tan không nhiều hơn (NMT) 1:1000). Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến chế phẩm chứa các hợp chất của chất ức chế HMG-CoA reductaza khác có công thức I ở đây, bao gồm cả erythro raxemat và chất đồng phân cấu tạo của nó (tức là, chất đồng phân 3R,5S và 3S,5R, tốt hơn là chất đồng phân 3R,5S).



Các hợp chất này được bộc lộ, ví dụ, trong các patent, đơn xin cấp patent đã được công bố và các tài liệu công bố sau đây, nội dung của tất cả các tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn: patent Mỹ số 4.739.073 và EP-A-114.027 (R=indolyl và chất dẫn xuất của nó); EP-A-367.895 (R=pyrimidinyl và chất dẫn xuất của nó); patent Mỹ số 5.001.255 (R=indenyl và chất dẫn xuất của nó); patent Mỹ số

4.613.610 (R=pyrazolyl và chất dẫn xuất của nó); patent Mỹ số 4.851.427 (R=pyrolyl và chất dẫn xuất của nó); patent Mỹ số 4.755.606 và 4.808.607 (R=imidazolyl và chất dẫn xuất của nó); patent Mỹ số 4.751.235 (R=indolizinyll và chất dẫn xuất của nó); patent Mỹ số 4.939.159 (R=azaindolyl và chất dẫn xuất của nó); patent Mỹ số 4.822.799 (R=pyrazolopyridinyl và chất dẫn xuất của nó); patent Mỹ số 4.804.679 (R=naphtyl và chất dẫn xuất của nó); patent Mỹ số 4.876.280 (R=xyclohexyl và chất dẫn xuất của nó); patent Mỹ số 4.829.081 (R=thienyl và chất dẫn xuất của nó); patent Mỹ số 4.927.851 (R=furyl và chất dẫn xuất của nó); patent Mỹ số 4.588.715 (R=phenylsilyl và chất dẫn xuất của nó); và F. G. Kathawala, Medicinal Research Reviews, Vol. 11 (2), các trang từ 121 đến 146 (1991), và F. G. Kathawala, Atherosclerosis Research - Review, June 1992, p. B73-B85.

Các hợp chất khác có công thức I được bộc lộ, ví dụ, trong EP-A-304.063 (R=quinolinyll và chất dẫn xuất của nó); EP-A-330.057 và patent Mỹ số 5.026.708 và 4.868.185 (R=pyrimidinyl và chất dẫn xuất của nó); EP-A-324.347 (R=pyridazinyl và chất dẫn xuất của nó); EP-A-300.278 (R=pyrolyl hoặc chất dẫn xuất của nó); và patent Mỹ số 5.013.749 (R=imidazolyl và chất dẫn xuất của nó), nội dung của các tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

“Các chất tạo phức” là các phân tử có phân tử lượng thấp mà có thể tạo thành phức chất thành phần lồng nhau và sau khoảng thời gian hóa rắn thích hợp, có thể hòa tan thuốc và có thể tạo ra thêm độ ổn định cho thuốc. Do đó, nhằm các mục đích của sáng chế, thuật ngữ “chất tạo phức” có nghĩa bao gồm chất mà tạo phức và/hoặc hòa tan statin không tan trong nước. Theo các phương án nhất định của sáng chế, chất tạo phức được dụng là dextrin. Các dextrin thích hợp khác bao gồm xyclodextrin như hydroxy-propyl- β -xyclodextrin và sulfobutyl-ete- β -xyclodextrin. Các xyclodextrin bổ sung có thể bao gồm alpha-xyclodextrin, beta-xyclodextrin, gama-xyclodextrin, etc beta-xyclodextrin bao gồm một hoặc nhiều gốc hydroxybutyl sulfonat và xyclodextrin như được mô tả trong patent Mỹ số 6.610.671 hoặc patent Mỹ số 6.566.347 (cả hai tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn).

Các chất tạo phức bổ sung bao gồm, nhưng không giới hạn ở, nhóm bao gồm phenol, các muối phenolic, các axit và các este thơm, các axit carboxylic và các muối và este của nó, các axit và các bazơ vô cơ và các axit amin và các este và các muối của

nó: metylparaben, propylparaben, kali metylparaben, paraben, axit ascorbic và các chất dẫn xuất của nó, metyl antranilat, axit salixylic, axit axetosalixylic, tocopherol, các axit hữu cơ, các axit carboxylic, các axit thơm, các este thơm, các muối axit của các axit amin, benzaldehyt, cinnamaldehyt, imidazol, mentol, thiophenol, axit m-aminobenzoic, axit anthranilic, axit picolinic và các alkyl este của nó, các toluidit, natri benzoat, natri metabisulphit, axit malic, axit isoascorbic, axit xitric, axit tarttric, natri sulphit, natri bisulphat, chất dẫn xuất tan trong nước và chất béo của tocopherol, các sulphit, các bisulphit và các hydro sulphit, propyl/galat, axit nordihydroguaiaretic, các axit phosphoric, các axit sorbic và benzoic, metylparaben, natri metylparaben, axit para-aminobenzoic và các este, các axit sorbic và benzoic, 2,6-di-t-butyl-alpha-dimethylamino-p-cresol, t-butylhydroquinon, di-t-amylhydroquinon, di-t-butylhydroquinon, butylhydroxytoluen (BHT), butylhydroxyanisol (BHA), pyrocatechol, pyrogallol, các este, các hợp chất đồng phân của nó, các muối được dùng của nó và hỗn hợp của các hợp chất bất kỳ một trong số các hợp chất nêu trên.

Theo các phương án nhất định của sáng chế, chất tạo phức chiếm ít nhất 13,5% chế phẩm.

Theo các phương án nhất định, statin và chất tạo phức được kết hợp bằng cách bổ sung statin vào hỗn hợp gồm chất tạo phức trong dung dịch dạng nước. Dung dịch dạng nước có thể là dung môi được dùng thích hợp, như nước để tiêm hoặc Na_2HPO_4 trong nước để tiêm. Sau khi tạo phức statin, độ pH có thể được điều chỉnh đến độ pH hơn 6,5. Theo các phương án nhất định, độ pH được biến đổi thành giá trị nằm trong khoảng từ 7 đến 9. Chất thích hợp để biến đổi độ pH bao gồm chất đệm natri phosphat (natri phosphat ba lần (Na_3PO_4) hoặc natri phosphat hai lần (Na_2HPO_4)), axit o-phosphoric, NaOH và L-Arginin (L-dArg).

Theo các phương án nhất định của sáng chế, hỗn hợp được phối trộn bằng nhiều cách khác nhau bao gồm cuộn xoáy và nghiền siêu âm. Bước phối trộn có thể được lặp lại nhiều hơn 1 lần. Có thể mong muốn điều chỉnh thể tích của dung dịch và/hoặc độ pH của nó giữa mỗi bước trộn.

Theo một phương án của sáng chế, hỗn hợp của statin và chất tạo phức được đông khô.

Độ ổn định của chế phẩm theo sáng chế được xác định bằng phương pháp thích hợp bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ về phương pháp thích hợp để thử nghiệm độ ổn định là sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao hoặc kỹ thuật phân tích thông thường khác.

Liều lượng hàng ngày của thành phần hoạt tính có thể được sử dụng dưới dạng liều đơn. Chế độ liều lượng và tần suất sử dụng để điều trị các bệnh đã nêu bằng hợp chất theo sáng chế và/hoặc bằng được phẩm theo sáng chế sẽ được chọn theo nhiều yếu tố khác nhau, bao gồm, ví dụ, độ tuổi, thể trọng, giới tính và tình trạng sức khỏe của bệnh nhân cũng như mức độ trầm trọng của bệnh, đặc điểm dược lý, thời gian bán rã của thuốc, và việc điều trị bệnh đi kèm cuối cùng với các thuốc khác. Trong một số trường hợp, mức độ liều lượng dưới hoặc lớn hơn khoảng đã nêu ở trên và/hoặc thường xuyên hơn có thể là thích hợp, và điều này về mặt logic sẽ phụ thuộc vào sự đánh giá của bác sĩ và sẽ phụ thuộc vào tình trạng bệnh.

Khi thành phần hoạt tính là atorvastatin, tổng liều lượng hàng ngày tốt hơn có thể là lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 80mg, nhưng có thể thấp hơn hoặc cao hơn nếu cần. Liều lượng bắt đầu của atorvastatin được ưu tiên là 10 hoặc 20mg một lần một ngày, mặc dù nếu cần giảm LDL-C nhiều, có thể bắt đầu ở 40mg một lần một ngày. Liều lượng bắt đầu của atorvastatin cho trẻ em là 10mg một lần một ngày với liều tối đa 20mg một lần một ngày. Đối với chất ức chế HMG CoA reductaza khác với atorvastatin, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết cách tính toán liều lượng chuyển đổi dựa trên liều lượng được ưu tiên đối với atorvastatin. Ngoài ra, bảng chuyển đổi đối với sự tính toán này có sẵn một cách dễ dàng đối với nhiều statin đã biết.

Hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng qua đường miệng, ngoài đường tiêu hóa, qua trực tràng hoặc tại chỗ, bằng cách xông hít hoặc sol khí, trong các chế phẩm cuối cùng chứa chất mang, tá dược và chất dẫn thuốc được dụng không độc thông thường nếu mong muốn. Việc sử dụng tại chỗ cũng có thể bao gồm việc dùng qua da như miếng dán qua da hoặc các thiết bị điện chuyển ion. Thuật ngữ “ngoài đường tiêu hóa” như được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm tiêm dưới da, kỹ thuật tiêm hoặc truyền trong tĩnh mạch, trong cơ, trong xương ức.

Chế phẩm có thể tiêm được, ví dụ, hỗn dịch dầu hoặc dạng nước tiêm được vô trùng có thể được phối trộn theo kỹ thuật đã biết bằng cách sử dụng chất thấm ướt hoặc chất phân tán và chất tạo hỗn dịch thích hợp. Chế phẩm tiêm được vô trùng cũng có thể là dung dịch hoặc huyền phù tiêm được vô trùng trong chất pha loãng hoặc dung môi không độc chấp nhận được ngoài đường tiêu hóa. Trong số các chất dẫn thuốc và dung môi chấp nhận được là nước, dung dịch Ringer và natri clorua đẳng trương. Ngoài ra, dầu không bay hơi, vô trùng thường được sử dụng làm dung môi hoặc môi trường tạo huyền phù. Nhằm mục đích này, dầu nhớt không bay hơi bất kỳ có thể được sử dụng bao gồm mono hoặc diglyxerit tổng hợp, ngoài ra, các axit béo như axit oleic có thể được sử dụng trong việc bào chế dung dịch tiêm được.

Dạng liều lượng lỏng để sử dụng qua đường miệng có thể bao gồm nhũ tương, dung dịch, huyền phù, sirô và cồn ngọt được chứa chất pha loãng trợ thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này, như nước. Chế phẩm này cũng có thể bao gồm các tá dược, như các chất thấm ướt, các chất nhũ hóa và tạo hỗn dịch, và chất làm ngọt, chất tạo hương và các chất tương tự.

Các chất dẫn xuất nitro statin mới hơn, ngoài khả năng giảm lipid, còn có các tác dụng kháng viêm, chống tiểu cầu và chống huyết khối so với statin tự nhiên. Hơn nữa, chúng cũng có thể có hiệu quả trong các bệnh lý khác như hội chứng mạch vành cấp, đột quỵ, bệnh mạch máu ngoại vi như thiếu máu cục bộ ngoại vi, tất cả các rối loạn có liên quan đến sự rối loạn chức năng nội mô như biến chứng mạch ở các bệnh nhân bị đái tháo đường và chứng xơ vữa động mạch, bệnh thoái hóa thần kinh như bệnh Alzheimer (AD) và bệnh Parkinson (PD), bệnh tự miễn như đa xơ cứng.

Theo các phương án khác của các phương pháp điều trị được mô tả trong bản mô tả này, dược phẩm chứa statin được sử dụng cho bệnh nhân thông qua phương pháp tiêm. Theo các phương án này, dược phẩm chứa statin là dược phẩm thích hợp để sử dụng cho bệnh nhân thông qua phương pháp tiêm. Các phương pháp tiêm thích hợp bao gồm, tiêm trong tĩnh mạch, truyền trong động mạch, tiêm trong cơ, tiêm qua da và tiêm dưới da.

Các chất mang thích hợp để sử dụng trong tĩnh mạch bao gồm nước muối sinh lý hoặc dung dịch đệm phosphat (PBS), và dung dịch chứa các chất hòa tan, như glucoza, polyetylen glycol, và polypropylen glycol và các hỗn hợp của chúng.

Dược phẩm có thể chứa chất dẫn thuốc dạng nước. Chất dẫn thuốc dạng nước bao gồm, theo cách ví dụ và không giới hạn, dung dịch tiêm natri clorua, dung dịch tiêm Ringers, dung dịch tiêm dextroza đẳng trương, dung dịch nước vô trùng, dextroza, và dung dịch tiêm Ringers được lactat hóa. Chất dẫn thuốc ngoài đường tiêu hóa không chứa nước bao gồm, theo cách ví dụ và không giới hạn, dầu không bay hơi có nguồn gốc thực vật, dầu hạt bông, dầu ngô, dầu vừng và dầu lạc. Các chất kháng khuẩn với nồng độ kim hãm vi khuẩn hoặc kim hãm nấm phải được bổ sung vào chế phẩm ngoài đường tiêu hóa được đóng gói trong đồ chứa đa liều bao gồm các phenol hoặc các cresol, chế phẩm thủy ngân, rượu benzylic, clobutanol, este của axit metyl và propyl p hydroxybenzoic, thimerosal, benzalkoni clorua và benzetoni clorua. Các chất đẳng trương bao gồm, theo cách ví dụ và không giới hạn, natri clorua và dextroza. Các chất đệm bao gồm phosphat và xitrat. Các chất chống oxy hóa bao gồm natri bisulfat. Các chất gây tê cục bộ bao gồm procain hydroclorua. Các chất tạo huyền phù và các chất phân tán bao gồm natri carboxymetylxenluloza, hydroxypropyl metylxenluloza và polyvinylpyrrolidon. Các chất nhũ hóa bao gồm Polysorbat 80 (TWEEN® 80). Chất càng hóa hoặc chelat hóa của ion kim loại bao gồm EDTA. Chất mang dược dụng còn bao gồm, theo cách ví dụ và không giới hạn, rượu etylic, polyetylen glycol và propylen glycol cho chất dẫn thuốc có thể trộn lẫn được với nước và natri hydroxit, axit clohydric, axit xitric hoặc axit lactic để điều chỉnh độ pH.

Thông thường, liều lượng hữu hiệu để điều trị bệnh được bào chế để chứa nồng độ ít nhất nằm trong khoảng từ 0,1% trọng lượng đến khoảng 90% trọng lượng hoặc lớn hơn, như lớn hơn 1% trọng lượng của statin. Theo các phương án nhất định, nồng độ statin được hòa tan của chế phẩm sẽ ít nhất khoảng 3,3mg/ml.

Tất cả các con số biểu thị liều lượng của các thành phần, các điều kiện phản ứng và v.v. được sử dụng trong bản mô tả này và các điểm yêu cầu bảo hộ cần được hiểu là được cải biến trong tất cả các trường hợp bởi thuật ngữ “khoảng”. Do đó, trừ khi có chỉ dẫn khác, các thông số bằng số nêu trong bản mô tả này và các điểm yêu cầu bảo hộ đính kèm là các phép tính xấp xỉ mà có thể thay đổi tùy thuộc vào các tính chất mong muốn được tìm kiếm để thu được bởi sáng chế. Ở mức độ thấp nhất, và không nhằm làm hạn chế ứng dụng của các phương án tương đương với phạm vi của

các điểm yêu cầu bảo hộ, mỗi thông số bằng số cần được hiểu theo con số của các chữ số có nghĩa và phép làm tròn thông thường.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề cập đến phương pháp giảm nguy cơ MI, đột quy, quy trình tái phân bố mạch, bệnh viêm họng ở các bệnh nhân không bị CHD nhưng có các yếu tố đa rủi ro, giảm nguy cơ MI và đột quy ở các bệnh nhân mắc bệnh đái tháo đường typ 2 không bị CHD, nhưng có các yếu tố đa rủi ro, giảm nguy cơ MI không gây chết, đột quy gây chết và không gây chết, quy trình tái phân bố mạch, sự nhập viện vì bệnh suy tim xung huyết (congestive heart failure - CHF) và bệnh viêm họng ở các bệnh nhân bị CHD, giảm cholesterol tổng, LDL-cholesterol, apolipoprotein-B, và triglyxerit cao ở các bệnh nhân mắc chứng tăng lipit-huyết nguyên phát (chứng loạn lipit huyết dị hợp tử di truyền và không di truyền và chứng loạn lipit huyết hỗn hợp), giảm mức triglyxerit cao ở các bệnh nhân mắc chứng tăng triglyxerit huyết và chứng loạn betalipoprotein huyết nguyên phát, giảm cholesterol tổng và LDL-cholesterol ở các bệnh nhân mắc chứng tăng cholesterol huyết đồng hợp tử di truyền, giảm mức C tổng, LDL-C, và apo B cao ở con trai và con gái sau khi bắt đầu có kinh nguyệt, độ tuổi từ 10 đến 17, mắc chứng tăng cholesterol huyết dị hợp tử di truyền sau khi không thành công trong thử nghiệm thích hợp về trị liệu bằng chế độ ăn uống, chứng loạn lipit huyết hỗn hợp; và chứng tăng lipit huyết dị hợp tử di truyền, chứng tăng cholesterol huyết đồng hợp tử di truyền dưới dạng phụ thêm vào các điều trị giảm lipit khác (ví dụ, tách máu LDL) hoặc nếu các điều trị như vậy không có sẵn.

Cụ thể, thuốc không phải statin để sử dụng trong thực hành sáng chế là bất kỳ một trong số các chất chủ vận thụ thể PPAR, bao gồm các chất chủ vận chọn lọc đối với một kiểu phụ thụ thể PPAR cũng như các chất chủ vận có hoạt tính đối với hai kiểu phụ thụ thể hoặc nhiều hơn. Cụ thể hơn, thuốc không phải statin là chất chủ vận PPAR alpha như các chất dẫn xuất của axit fibric; chất chủ vận PPAR gama; và chất chủ vận PPAR alpha/gama kép, tức là, chất chủ vận có hoạt tính kép đối với cả kiểu phụ thụ thể alpha và gama.

Khi statin và hợp chất không phải statin được đề cập là liên kết cạnh tranh với enzym hoặc enzym isoform (tức là, isozym), nó có nghĩa là cả statin và hợp chất không phải statin đều liên kết với cùng enzym hoặc isozym này. Tương tác thuốc được động học bất lợi được dự định có nghĩa là tương tác *in vivo* giữa statin và thuốc không

phải statin được đồng sử dụng ở động vật có vú, cụ thể là người, mà làm tăng mức huyết thanh của statin axit mở có hoạt tính lớn hơn mức khi statin được sử dụng một mình, tức là, không có thuốc không phải statin được đồng sử dụng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau minh họa các khía cạnh khác nhau của sáng chế. Các ví dụ này không được hiểu là giới hạn yêu cầu bảo hộ theo cách bất kỳ.

Các ví dụ từ 1 đến 3

Các ví dụ từ 1 đến 3 so sánh các phương pháp hòa tan để đánh giá ảnh hưởng của pH, nồng độ đậm, và các phương pháp phối trộn khác nhau. Trong ví dụ 1, các mẫu được điều chế trong natri phosphat hai lần (Na_2HPO_4) 100mM ở độ pH = 5,5, 6,5, 7,5, và 8,5. Các mẫu chỉ được cuộn xoáy. Trong ví dụ 2, các mẫu được điều chế trong Na_2HPO_4 100mM ở độ pH = 5,5, 6,5, 7,5, và 8,5 và sau đó cả hai đều được cuộn xoáy và nghiền siêu âm. Trong ví dụ 3, các mẫu được điều chế trong Na_2HPO_4 25 hoặc 50mM ở độ pH = 7,5 hoặc 8,5.

Ví dụ 1

10mg atorvastatin canxi trihydrat (“AS-Ca”) được bổ sung vào khoảng 0,9ml dung dịch chứa 0,8ml hydroxy-propyl- β -cyclodextrin nồng độ 34,7% (“HP β -CD”) và 0,1ml Na_2HPO_4 nồng độ 1M trong nước siêu tinh khiết và sau đó được cuộn xoáy ở tốc độ tối đa trong thời gian 5 phút. Sau đó, độ pH của mẫu được điều chỉnh đến độ pH = 5,5, 6,5, 7,5, hoặc 8,5 bằng axit o-phosphoric nồng độ 0,85% hoặc NaOH nồng độ 0,1M. Mỗi mẫu được cuộn xoáy, và sau đó nước siêu tinh khiết được bổ sung vào vừa đủ đến 1,0ml, sau đó mẫu được lọc qua thiết bị lọc nylon 0,45 μm , và được phân tích bằng HPLC (xem bảng 1).

Ví dụ 2

Các chế phẩm của ví dụ 2 được điều chế theo cùng cách như cách điều chế chế phẩm của ví dụ 1, chỉ khác là sau khi cuộn xoáy, các chế phẩm của ví dụ 2 còn được nghiền siêu âm. Các mẫu được phân tích bằng HPLC (xem bảng 1).

Ví dụ 3

10mg AS-Ca được bổ sung vào khoảng 0,9ml dung dịch chứa 0,8ml HP β -CD nồng độ 34,7% và 0,025 hoặc 0,050ml Na_2HPO_4 nồng độ 1M trong nước siêu tinh

khiết và sau đó được cuộn xoáy trong thời gian 5 phút. Độ pH của mẫu được điều chỉnh đến 7,5 hoặc 8,5 bằng cách sử dụng NaOH nồng độ 0,1M, và sau đó nước siêu tinh khiết được bổ sung vừa đủ đến 1ml, sau đó mẫu được cuộn xoáy trong thời gian 5 phút, lọc và sau đó phân tích bằng HPLC (xem bảng 1).

Bảng 1

Ví dụ	Độ pH của mẫu	Nồng độ Na_2HPO_4 (mM)	Phương pháp trộn	Atorvastatin được hòa tan (mg/ml)
1	5,5	100	Cuộn xoáy	3,32
	6,5	100	Cuộn xoáy	8,42
	7,5	100	Cuộn xoáy	8,89
	8,5	100	Cuộn xoáy	7,97
2	5,5	100	Nghiền siêu âm	3,27
	6,5	100	Nghiền siêu âm	9,21
	7,5	100	Nghiền siêu âm	9,06
	8,5	100	Nghiền siêu âm	9,26
3	7,5	25	Cuộn xoáy	8,34
	7,5	50	Cuộn xoáy	8,58
	8,5	25	Cuộn xoáy	9,26
	8,5	50	Cuộn xoáy	9,65

Kết quả: Độ hòa tan của AS-Ca được cải thiện rõ rệt bằng cách điều chỉnh độ pH đến 6,5 và lớn hơn.

Các ví dụ 4 -5

Độ hòa tan của AS-Ca trong các chế phẩm sử dụng các phương pháp điều chỉnh độ pH khác nhau được so sánh trong các ví dụ 4 và 5 để đánh giá hiệu quả tạo phức. Trong ví dụ 4, độ pH được điều chỉnh đến 9 bằng cách sử dụng NaOH và sau đó axit phosphoric được bổ sung để giảm độ pH về độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,5. Trong ví dụ 5, độ pH được điều chỉnh đến pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,5 bằng axit o-phosphoric nồng độ 0,85% hoặc NaOH nồng độ 0,1M.

Ví dụ 4

Hỗn hợp của 20mg/ml AS-Ca được điều chế bằng cách bổ sung 20mg AS-Ca vào khoảng 0,8ml hỗn hợp của HP β -CD nồng độ 27,78%, Na_2HPO_4 nồng độ 50mM, và nước siêu tinh khiết và sau đó axit phosphoric và/hoặc NaOH được bổ sung đến vừa đủ 1ml. Sau đó, hỗn hợp gồm 20mg/ml AS-Ca được cuộn xoáy trong thời gian 5 phút và được nghiền siêu âm trong thời gian 15 phút.

Độ pH của mẫu được điều chỉnh đến độ pH = 9,0 bằng cách sử dụng NaOH nồng độ 0,1M sau đó độ pH được điều chỉnh tiếp đến độ pH = 7,0, 7,5, 8,0, hoặc 8,5 bằng axit o-phosphoric nồng độ 0,85%. Mỗi mẫu được cuộn xoáy, được bổ sung vừa đủ đến 1,0ml bằng nước siêu tinh khiết, lọc và sau đó phân tích bằng HPLC.

Ví dụ 5

Hỗn hợp của 20mg/ml AS-Ca được điều chế bằng cách bổ sung 20mg AS-Ca vào khoảng 0,8ml hỗn hợp của HP β -CD nồng độ 27,78%, Na₂HPO₄ 50mM, và nước siêu tinh khiết và sau đó axit phosphoric và/hoặc NaOH được bổ sung đến vừa đủ 1ml. Hỗn hợp gồm 20mg/ml AS-Ca sau đó được cuộn xoáy trong thời gian 5 phút và được nghiền siêu âm trong thời gian 15 phút.

Độ pH của mẫu được điều chỉnh đến độ pH = 7,0, 7,5, 8,0, hoặc 8,5 bằng axit o-phosphoric nồng độ 0,85% hoặc NaOH nồng độ 0,1M. Mỗi mẫu được cuộn xoáy, được bổ sung vừa đủ đến 1,0ml bằng nước siêu tinh khiết, lọc và sau đó phân tích bằng HPLC.

Kết quả: Kết quả được đưa ra trong bảng 2 dưới đây.

Bảng 2

Ví dụ	Độ pH của mẫu	Nồng độ Atorvastatin mg/ml
4	7,0	18,45
	7,5	17,90
	8,0	19,62
	8,5	18,51
5	7,0	16,93
	7,5	17,83
	8,0	18,97
	8,5	19,44

Ví dụ 6

Mối tương quan giữa AS-Ca và HP β -CD được kiểm tra bằng cách đánh giá hiệu quả tạo phức của các nồng độ HP β -CD khác nhau. Dung dịch gốc của HP β -CD trước tiên được điều chế ở nồng độ 34,7% và được pha loãng liên tiếp đến HP β -CD nồng độ 0,5375%.

Các mẫu được điều chế bằng cách bổ sung 20mg AS-Ca vào 0,8ml dung dịch pha loãng HP β -CD (nồng độ cuối cùng trong 1ml nằm trong khoảng từ HP β -CD

27,78% đến 0,5375%) và 0,05ml Na_2HPO_4 nồng độ 1M. Mỗi mẫu được điều chỉnh đến độ pH = 9,0 bằng NaOH nồng độ 0,1M và sau đó các mẫu được cuộn xoáy trong thời gian 5 phút và sau đó được nghiền siêu âm trong thời gian 15 phút. Độ pH sau đó được điều chỉnh đến 7,5 hoặc 8,5 bằng axit o-phosphoric nồng độ 0,85%. Các mẫu lại được cuộn xoáy và nghiền siêu âm, sau đó lọc và phân tích bằng HPLC (xem bảng 3).

Kết quả: Độ hòa tan của AS-Ca tăng tuyến tính với nồng độ HP β -CD. Phân tích hồi quy tuyến tính cho thấy rằng lượng HP β -CD tối thiểu cần để hòa tan AS-Ca ở 10mg/ml là 14,4% ở độ pH = 7,5 và 13,5% ở độ pH = 8,5 (xem Fig.1).

Bảng 3

pH 7,5		pH 8,5	
HP β -CD (%)	Atorvastatin (mg/ml)	HP β -CD (%)	Nồng độ của Atorvastatin (mg/ml)
27,78	19,48	27,78	19,72
13,89	10,01	13,89	12,42
6,94	5,13	6,94	5,54
3,47	1,38	3,47	1,58
1,74	0,43	1,74	0,52
0,87	0,34	0,87	0,215

Ví dụ 7

Nghiên cứu độ ổn định sơ bộ và phân rã cường bức cho thấy rằng AS-Ca được hòa tan bằng HP β -CD không thể hiện độ ổn định tốt. Do đó, đánh giá việc đông khô bằng cách sử dụng máy kết đông nhiều tầng để xác định xem độ ổn định có thể được cải thiện bằng phương pháp này hay không.

100mg AS-Ca được bổ sung vào khoảng 9ml dung dịch chứa 5,333ml HP β -CD nồng độ 37,5% và 0,5ml Na_2HPO_4 nồng độ 1M. Mẫu được cuộn xoáy trong thời gian 5 phút và sau đó được nghiền siêu âm trong thời gian 15 phút. Sau đó, độ pH được điều chỉnh đến 9,0 sử dụng NaOH nồng độ 0,1M, sau đó mẫu lại được cuộn xoáy và nghiền siêu âm.

Tiếp theo, độ pH của mẫu được điều chỉnh đến độ pH = 8,5 bằng cách sử dụng axit o-phosphoric nồng độ 0,85% sau đó cuộn xoáy và nghiền siêu âm. Mẫu được làm

vừa đủ đến 10ml bằng NaOH và axit phosphoric nồng độ 1% đến độ pH = 8,47, lọc và sau đó phân tích bằng HPLC. Chế phẩm cuối cùng chứa 10mg/ml AS-Ca²⁺, HPβ-CD 20%, Na₂HPO₄ 50mM, được làm vừa đủ bằng NaOH nồng độ 0,1M và axit phosphoric nồng độ 1% ở độ pH = 8,47.

Kết quả: AS-Ca đã được hòa tan bằng HPβ-CD được đông khô và sau đó được đặt ổn định ở nhiệt độ 40°C trong 1 tháng cạnh dung dịch đối chứng của cùng hỗn hợp. AS-Ca được đông khô phân rã ~3,5% và AS-Ca trong dung dịch phân rã ~15,5%. Do đó, mẫu không ổn định trong dung dịch và khi được đông khô bằng cách sử dụng máy kết đông nhiều tầng.

Ví dụ 8

Atorvastatin được điều chế như được mô tả trong ví dụ 6, chỉ khác là nó được điều chế ở 20mg/ml trong HPβ-CD nồng độ 30% trong natri phosphat nồng độ 100mM được điều chỉnh đến độ pH cuối cùng bằng 8,5. Sau đó, mẫu được pha loãng 1:1 vào dung dịch sucroza nồng độ 8% và được chuyển vào lọ dung tích 5 ml. Lọ được nắp bằng nút đông khô.

Các mẫu được đông khô ở nhiệt độ -40°C trên máy kết đông kiểu tầng sau đó là giữ trong 60 phút. Sau bước làm đông lạnh, bình ngưng được điều chỉnh đến -85°C và được giữ ở nhiệt độ này trong suốt chu trình. Áp suất vào khoảng 20 mtorr. Sau đó, nhiệt độ tầng được điều chỉnh đến -20°C, -10°C và 0°C và được giữ trong 180 phút ở mỗi nhiệt độ đó trong khi duy trì chân không. Tiếp theo, nhiệt độ được nâng đến 10°C và sau đó đến 20°C (240 phút đối với mỗi bước). Sau đó, nhiệt độ được điều chỉnh đến 40°C và được giữ cho đến khi chân không được giải phóng và lọ được lấy ra và được quan sát bằng mắt thường.

Kết quả: Khi AS-Ca được hòa tan bằng HPβ-CD và sau đó được đông khô bằng cách sử dụng máy kết đông kiểu tầng, không quan sát thấy sự phân rã (ít hơn 0,1%) sau khi bảo quản trong 1 tháng ở nhiệt độ 40°C. Mặc dù không bị ràng buộc bởi lý thuyết, nhưng độ ổn định được tăng cường dường như là do sự loại bỏ nhanh của nước và mức độ ẩm dư thấp thu được bởi các điều kiện của chu kỳ đông khô.

Các ví dụ 9 và 10

Trong các ví dụ 9 và 10, sulfobutyl-ete- β -cyclodextrin (“SBE- β -CD”) được đánh giá dưới dạng phương án thay thế có thể có đối với HP β -CD bằng sự tạo phức AS-Ca với SBE- β -CD. Ảnh hưởng của muối natri phosphat so với nước siêu tinh khiết đến việc hòa tan AS-Ca bằng SBE- β -CD ở độ pH khác nhau cũng được đánh giá.

Ví dụ 9

Trong ví dụ 9, sự tạo phức AS-Ca với SBE- β -CD diễn ra trong đệm natri phosphat với các giá trị độ pH khác nhau. 20mg/ml AS-Ca được bổ sung vào 27,78% SBE- β -CD trong NaH_2PO_4 nồng độ 50-100mM (các mẫu độ pH = 2,13) hoặc Na_2HPO_4 (các mẫu độ pH = 7,07, 8,75, và 11,75). Sau đó, mỗi mẫu được cuộn xoáy và nghiền siêu âm, sau đó độ pH được điều chỉnh đến 2,13 và 7,07 bằng cách sử dụng axit o-phosphoric nồng độ 0,85% hoặc 8,75 và 11,50 bằng NaOH nồng độ 0,1M. Sau đó, các mẫu được cuộn xoáy, nghiền siêu âm, làm vừa đủ đến 1,0ml bằng nước siêu tinh khiết, và sau đó lọc và phân tích bằng HPLC (xem bảng 4 dưới đây).

Kết quả: Độ hòa tan của AS-Ca thấp hơn khoảng 10 lần khi được tạo phức với SBE- β -CD so với khi được tạo phức với HP β -CD.

Bảng 4

Độ pH của mẫu	Atorvastatin (mg/ml)
2,13	0,228
7,07	1,993
8,75	1,267
11,75	1,927

Ví dụ 10

Trong ví dụ 10, sự tạo phức AS-Ca với SBE- β -CD là trong nước siêu tinh khiết để nghiên cứu tác động của muối đệm phosphat đến khả năng của SBE- β -CD để tạo phức AS-Ca. Dựa trên phát hiện độ hòa tan của ví dụ 8, chế phẩm được thử nghiệm ở độ pH trung tính và bazơ.

độ pH trung tính: 20mg/ml AS-Ca được bổ sung vào SBE- β -CD nồng độ 27,78% trong nước siêu tinh khiết. Mẫu được cuộn xoáy và nghiền siêu âm, sau đó độ

pH được xác định là 7,09. Sau đó, mẫu được làm vừa đủ đến 1,0ml bằng nước siêu tinh khiết, lọc và phân tích bằng HPLC (xem bảng 5).

độ pH bazơ: 20mg/ml AS-Ca được bổ sung vào SBE- β -CD nồng độ 27,78% trong khoảng 0,8ml nước siêu tinh khiết. Mẫu được xử lý như được mô tả ở trên, ngoại trừ độ pH được điều chỉnh đến 11,0 bằng cách sử dụng NaOH nồng độ 0,1M và làm vừa đủ đến 1,0 ml.

Kết quả: Độ đậm phosphat đường như không có ảnh hưởng đáng kể đến độ hòa tan của atorvastatin được kết hợp với SBE- β -CD.

Bảng 5

pH của mẫu	Atorvastatin (mg/ml)
7,09	1,392
11,0	1,927

Ví dụ 11

Các chế phẩm AS-Ca bổ sung được điều chế bằng cách sử dụng các cyclodextrin khác, bao gồm γ -cyclodextrin và hydroxyl-propyl- γ -cyclodextrin. Độ hòa tan được phát hiện là nhỏ hơn độ hòa tan đạt được bằng SBE- β -CD hoặc HP β -CD.

Ví dụ 12

Trong ví dụ 12, AS-Ca được hòa tan bằng đồng dung môi để đánh giá độ hòa tan đồng dung môi/gốc nước dưới dạng hàm của độ pH. Cụ thể, sự phụ thuộc của độ pH vào chế phẩm đồng dung môi propylen glycol và etanol được kiểm tra.

10mg AS-Ca được bổ sung vào khoảng 0,9ml dung dịch chứa 4,0ml propylen glycol và 1,0ml etanol trong nước siêu tinh khiết. Mẫu được cuộn xoáy và nghiền siêu âm như được mô tả ở trên, sau đó được điều chỉnh đến độ pH = 9,0 bằng NaOH nồng độ 0,1M. Các mẫu lại được cuộn xoáy và nghiền siêu âm và sau đó độ pH được điều chỉnh đến độ pH = 7,0, 7,5, 8,0, hoặc 8,5 bằng axit o-phosphoric nồng độ 0,85% hoặc được để ở độ pH = 9,0. Các mẫu được cuộn xoáy, nghiền siêu âm, mẫu được làm vừa đủ đến 1,0ml bằng nước siêu tinh khiết, lọc và sau đó phân tích bằng HPLC (xem bảng 6).

Kết quả: Không có sự khác nhau về độ hòa tan khi độ pH thay đổi từ 7,0 đến 9,0. Tuy nhiên, khi các mẫu được pha loãng theo tỷ lệ 1:1 vào nước, thì mẫu được điều chỉnh đến độ pH = 7,5 và 8,0 sẽ kết tủa. Do đó, độ pH > 8,0 được ưu tiên khi sản phẩm được pha loãng trong chất dẫn thuốc dạng nước.

Bảng 6

pH của mẫu	Atorvastatin (mg/ml)
9,00	9,280
8,50	9,506
8,00	8,641
7,50	9,361
7,00	8,876

Ví dụ 13

Ví dụ 13 kiểm tra lượng dung môi cần để hòa tan AS-Ca bằng cách đánh giá độ hòa tan đồng dung môi/gốc nước dưới dạng hàm của tỷ lệ đồng dung môi.

10mg atorvastatin canxi được bổ sung vào khoảng 0,9ml dung dịch chứa các tỷ lệ dung môi sau trong nước siêu tinh khiết:

- 40/10, 4,0ml propylen glycol và 1,0ml etanol
- 30/10, 3,0ml propylen glycol và 1,0ml etanol
- 20/10, 2,0ml propylen glycol và 1,0ml etanol
- 40/5, 4,0ml propylen glycol và 0,5ml etanol
- 40/0, 4,0ml propylen glycol và 0,0ml etanol

Mỗi mẫu được cuộn xoáy trong thời gian 5 phút và sau đó được nghiền siêu âm trong thời gian 15 phút. Các mẫu trước tiên được điều chỉnh đến độ pH = 9,0 bằng NaOH nồng độ 0,1M, cuộn xoáy, và sau đó nghiền siêu âm. Độ pH của mẫu được điều chỉnh đến độ pH = 8,5 bằng axit o-phosphoric nồng độ 0,85% và các mẫu lại được cuộn xoáy và nghiền siêu âm. Các mẫu được làm vừa đủ đến 1,0ml bằng nước siêu tinh khiết, lọc, và sau đó phân tích bằng HPLC (xem bảng 7).

Kết quả: Độ hòa tan tốt nhất đạt được với 40% propylen glycol (theo thể tích) và 10% etanol (theo thể tích). Nghiên cứu sự phân rã cường bức cho thấy rằng bất cứ

trường hợp nào ít hơn 40% propylen glycol và 10% etanol đều tạo ra sự kết tủa atorvastatin khi được pha loãng với nước muối thông thường.

Bảng 7

Mẫu	PG/EtOH	Nồng độ mg/ml
A	40/10	21,27
B	30/10	17,87
C	20/10	16,80
D	40/5	18,11
E	40/0	16,06

Ví dụ 14

Nghiên cứu sự phân rã cường bức cũng cho thấy sự phân rã đáng kể với chất dẫn thuốc đồng dung môi/gốc nước. Do đó, đồng dung môi không phải dạng nước được kiểm tra.

10mg AS-Ca được bổ sung vào 1,0ml propylen glycol và etanol (4/1). Các mẫu được cuộn xoáy và sau đó độ pH của mẫu được điều chỉnh đến độ pH = 11,0 bằng NaOH nồng độ 0,1M. Sau đó, các mẫu được lọc và được phân tích bằng HPLC.

Kết quả: Mẫu hòa tan hoàn toàn (9,34mg/ml). Khi dung dịch được pha loãng 1:3 trong nước muối, sẽ kết tủa.

Ví dụ 15

Phân tích sự phân rã cường bức cho thấy rằng AS-Ca tương đối ổn định ở độ pH cao. Do đó, độ pH được điều chỉnh bằng L-Arginin (L-Arg), NaOH hoặc đệm natri phosphat (natri phosphat ba lần (Na_3PO_4) hoặc Na_2HPO_4).

20mg AS-Ca được bổ sung vào khoảng 0,8ml dung dịch từ 1 đến 5 dưới đây, sau đó cuộn xoáy và nghiền siêu âm. Độ pH của mẫu được điều chỉnh đến độ pH bazơ sau đó được làm vừa đủ đến thể tích 1ml bằng nước siêu tinh khiết, cuộn xoáy, nghiền siêu âm, lọc và phân tích HPLC.

Dung dịch 1: 20mg AS-Ca được bổ sung vào nước chứa L-Arg 16,54mM (tỷ lệ mol atorvastatin:L-Arg là 1:1). Độ pH được điều chỉnh đến 10,98 bằng L-Arg 10%. Nồng độ AS-Ca thu được là 0,46mg/ml.

Dung dịch 2: 20mg AS-Ca được bổ sung vào nước và độ pH được điều chỉnh đến 11,68 bằng NaOH nồng độ 0,1M. Nồng độ AS-Ca thu được là 0,222mg/ml.

Dung dịch 3: 20mg AS-Ca được bổ sung vào nước chứa Na_3PO_4 nồng độ 0,1M. Độ pH được xác định là 11,75. Nồng độ AS-Ca thu được là 0,46mg/ml.

Dung dịch 4: 20mg AS-Ca được bổ sung vào nước chứa Na_3PO_4 nồng độ 0,1M và L-Arg nồng độ 16,54mM. Độ pH được xác định là pH = 10,79. Nồng độ AS-Ca thu được là 3,17mg/ml.

Dung dịch 5: 20mg AS-Ca được bổ sung vào nước chứa Na_2HPO_4 nồng độ 0,1M và L-Arg nồng độ 16,54mM. Độ pH được xác định là 10,79. Nồng độ AS-Ca thu được là 3,43mg/ml.

Kết quả: Độ hòa tan của AS-Ca trong dung dịch bazơ không có HP β -CD thay đổi từ ~0,2 đến 3,5mg/ml. Sử dụng L-Arg nồng độ 16,54mM với Na_3PO_4 nồng độ 0,1M hoặc Na_2HPO_4 tạo ra nồng độ AS-Ca > 3mg/ml. Do đó, việc sử dụng hỗn hợp gồm L-Arg với Na_3PO_4 hoặc Na_2HPO_4 cũng tạo ra độ hòa tan đầy đủ đối với chế phẩm của AS-Ca trong dung dịch.

Các ví dụ từ 16 đến 19

Độ hòa tan của axit tự do của atorvastatin (“AS”) được kiểm tra dưới dạng thay thế đối với kiểu canxi trihydrat.

Ví dụ 16

Độ hòa tan của AS với sự tạo phức được đánh giá bằng cách kiểm tra độ hòa tan của AS-Ca trong HP β -CD nồng độ 27,78% hoặc SBE- β -CD trong Na_2HPO_4 nồng độ 50mM được điều chỉnh đến độ pH = 10,35 và 10,65 sử dụng NaOH nồng độ 0,1M, một cách tương ứng. Cùng các phương pháp hòa tan được sử dụng giống như ví dụ 4.

Kết quả: Độ hòa tan AS là 13,3mg/ml với HP β -CD và 1,96mg/ml với sự tạo phức SBE- β -CD.

Ví dụ 17

Trong ví dụ 17, sự hòa tan của AS với đồng dung môi được đánh giá bằng cách kiểm tra xem AS có thể được hòa tan trong đồng dung môi không phải dạng nước ở độ

pH cao và sau đó được pha loãng vào nước muối, mà không kết tủa hay không. Số liệu trước đây (ví dụ 13) cho thấy rằng AS-Ca sẽ kết tủa khi được điều chế trong các đồng dung môi không phải dạng nước và sau đó được pha loãng trong nước muối.

20mg AS (20mg) được bổ sung vào khoảng 0,9ml đồng dung môi propylen glycol và etanol (tỷ lệ 4/1). Độ pH được xác định là 6,64. Độ pH được điều chỉnh đến độ pH = 11,0 bằng NaOH nồng độ 0,1M, được làm vừa đủ đến 1ml bằng nước siêu tinh khiết. Sau đó, mẫu được cuộn xoáy, lọc, sau đó phân tích bằng HPLC.

Kết quả: Mẫu phân rã một cách nhanh chóng (khoảng 50% trong thời gian 2 giờ). Diện tích đỉnh được quan sát giữa atorvastatin và các đỉnh phân rã của nó. Nồng độ AS được ước tính là khoảng 20mg/ml.

Ví dụ 18

Trong ví dụ 18, độ hòa tan AS trong 100% propylen glycol hoặc 100% etanol là tương tự với dung môi propylen glycol/etanol (4/1) sử dụng cùng phương pháp hòa tan được mô tả ở trên. Axit tự do của atorvastatin hòa tan hoàn toàn trong 100% propylen glycol hoặc 100% etanol tương tự với dung môi propylen glycol/etanol (4/1). Cả hai dung dịch đều kết tủa khi được pha loãng 1:1 bằng nước muối và được phát hiện là không ổn định.

Ví dụ 19

Trong ví dụ 19, độ hòa tan của AS được kiểm tra bằng cách điều chỉnh đến độ pH cao bằng L-Arginin (L-Arg), NaOH, hoặc đệm natri phosphat ((Na_3PO_4) hoặc Na_2HPO_4).

20mg AS được bổ sung vào khoảng 0,8ml dung dịch dưới đây sau đó cuộn xoáy và nghiền siêu âm. Độ pH của mẫu được điều chỉnh đến độ pH bazơ, sau đó được làm vừa đủ đến thể tích bằng 1ml bằng nước siêu tinh khiết. Sau đó, mẫu được cuộn xoáy, nghiền siêu âm, lọc và phân tích HPLC được tiến hành.

Mẫu 1: 20mg AS được bổ sung vào dung dịch chứa L-Arg nồng độ 16,54mM. Độ pH được xác định là 10,35, sau đó được điều chỉnh đến 10,71 bằng L-Arg. Nồng độ AS-Ca thu được là 1,91mg/ml.

Mẫu 2: 20mg AS được bổ sung vào nước siêu tinh khiết và độ pH được điều chỉnh đến 11,15 bằng NaOH nồng độ 0,1M. Nồng độ AS thu được là 0,06mg/ml.

Mẫu 3: 20mg AS được bổ sung vào L-Arg nồng độ 16,54mM và Na_3PO_4 nồng độ 0,1M. Độ pH được xác định là 11,42. Nồng độ AS thu được là 0,44mg/ml.

Mẫu 4: 20mg AS được bổ sung vào Na_3PO_4 nồng độ 0,05M. Độ pH được xác định là 11,55. Nồng độ AS thu được là <LOQ (giới hạn định lượng).

Kết quả: Độ hòa tan của AS trong dung dịch bazơ sử dụng Na_3PO_4 , NaOH, hoặc Na_3PO_4 và L-Arg là <1,0mg/ml. Độ hòa tan AS là 1,91mg/ml khi sử dụng L-Arg một mình. Do đó, việc sử dụng L-Arg ở độ pH cao tạo ra độ hòa tan đầy đủ.

Kết luận

Chế phẩm không phải dạng nước bao gồm propylen glycol/etanol (4/1) ở độ pH = 11,0 được thấy là giảm sự phân rã quan sát được. Tuy nhiên, chế phẩm đó kết tủa khi được pha loãng theo tỷ lệ 1:1 trong nước muối thông thường. Để cải thiện độ ổn định, các chế phẩm được đông khô trước của AS-Ca với HP β -CD được kiểm tra. Độ ổn định ban đầu của chế phẩm này cho thấy độ ổn định được cải thiện trong quá trình để mẫu trong dung dịch.

Sẽ rõ ràng với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này rằng các cải biến và thích ứng thích hợp khác đối với các phương pháp và ứng dụng đã được mô tả trong bản mô tả này là thích hợp và có thể được tạo ra mà không trệtch khỏi phạm vi của sáng chế hoặc phương án bất kỳ của nó. Mặc dù sáng chế được mô tả liên quan đến một số phương án nhất định, nhưng không dự định giới hạn sáng chế ở các dạng cụ thể đã nêu, mà trái lại, dự định rằng các thay thế, cải biến và các dạng tương đương có thể được bao gồm trong mục đích và phạm vi của sáng chế như được xác định bởi các điểm yêu cầu bảo hộ sau đây.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dược phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa, trong đó dược phẩm này là dung dịch dạng nước chứa lượng hữu hiệu của atorvastatin hoặc muối dược dụng của nó được tạo phức với lượng hữu hiệu của chất tạo phức dược dụng là hydroxy-propyl- β -cyclodextrin để làm cho atorvastatin hòa tan trong nước, chất điều chỉnh độ pH được chọn từ nhóm bao gồm chất kiềm hóa, chất đệm và hỗn hợp gồm chất kiềm hóa và chất đệm, và chất chống oxy hóa tùy ý trong dung dịch dạng nước có độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 11 để tạo ra atorvastatin ở dạng hòa tan mà không kết tủa ở nồng độ atorvastatin nằm trong khoảng từ 8,42mg/ml đến 25mg/ml.
2. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó atorvastatin đã tạo phức được làm đông khô.
3. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó chất tạo phức chiếm ít nhất 3,47% dược phẩm này.
4. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó atorvastatin được hòa tan ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng từ 8,42 đến 15mg/ml.
5. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó atorvastatin được hòa tan ở nồng độ bằng 10mg/ml.
6. Phương pháp điều chế hạt đông khô chứa atorvastatin dược dụng và chất tạo phức dược dụng bao gồm các bước:
 - (a) bổ sung muối canxi atorvastatin vào dung môi thích hợp chứa chất tạo phức là hydroxy-propyl- β -cyclodextrin với lượng hữu hiệu để làm cho atorvastatin hòa tan trong nước và chất đệm thích hợp, chất kiềm hóa, hoặc hỗn hợp gồm chất kiềm hóa và chất đệm để tạo ra độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 9 để tạo ra atorvastatin ở dạng hòa tan mà không kết tủa ở nồng độ atorvastatin nằm trong khoảng từ 8,42mg/ml đến 25mg/ml, và chất chống oxy hóa tùy ý;
 - (b) phối trộn; và
 - (c) làm đông khô hỗn hợp để thu được các hạt đông khô thích hợp để hoàn nguyên để dùng ngoài đường tiêu hóa.
7. Phương pháp bào chế dược phẩm chứa atorvastatin dược dụng và chất tạo phức dược dụng bao gồm các bước:

(a) bổ sung atorvastatin hoặc muối được dụng của nó vào dung môi thích hợp chứa chất tạo phức là hydroxy-propyl- β -cyclodextrin với lượng hữu hiệu để làm cho atorvastatin hòa tan trong nước và chất chống oxy hóa tùy ý;

(b) phối trộn;

(c) điều chỉnh độ pH bằng cách sử dụng chất đệm được dụng đến độ pH nằm trong khoảng từ 7 đến 9;

(d) làm đông khô hỗn hợp để thu được các hạt đông khô; và

(e) hoàn nguyên hạt đông khô trong lượng hữu hiệu của dung dịch được dụng để tiêm vào bệnh nhân là người.

8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó chất tạo phức chiếm ít nhất 3,47% được phẩm này.

9. Phương pháp theo điểm 7, trong đó nồng độ atorvastatin thu được ít nhất là 3,32mg/ml.

10. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó atorvastatin hoặc muối được dụng của nó là muối canxi atorvastatin.

11. Phương pháp theo điểm 7, trong đó atorvastatin hoặc muối được dụng của nó là muối canxi atorvastatin.

12. Hạt đông khô để hoàn nguyên, được điều chế từ hỗn hợp chứa muối canxi atorvastatin, chất điều chỉnh độ pH được chọn từ nhóm bao gồm chất kiềm hóa, chất đệm và hỗn hợp gồm chất kiềm hóa và chất đệm để tạo ra độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 11, lượng hữu hiệu của chất tạo phức được dụng là hydroxy-propyl- β -cyclodextrin để làm cho atorvastatin hòa tan trong nước khi các hạt đông khô được hoàn nguyên trong dung dịch được dụng để tiêm, và chất chống oxy hóa tùy ý để tạo ra atorvastatin ở dạng hòa tan mà không kết tủa ở nồng độ atorvastatin nằm trong khoảng từ 8,42mg/ml đến 25mg/ml.

13. Hạt đông khô để hoàn nguyên theo điểm 12, trong đó hạt đông khô này về cơ bản không phân rã sau khi bảo quản trong 1 tháng ở nhiệt độ 40°C.

14. Hạt đông khô để hoàn nguyên theo điểm 12, trong đó hạt đông khô này phân rã ít hơn 0,1% sau khi bảo quản trong 1 tháng ở nhiệt độ 40°C.

15. Hạt đông khô để hoàn nguyên theo điểm 12, trong đó hạt đông khô này có thể được hoàn nguyên đến nồng độ atorvastatin nằm trong khoảng từ 3,32mg/ml đến 25mg/ml.
16. Hạt đông khô để hoàn nguyên theo điểm 15, trong đó hạt đông khô này có thể được hoàn nguyên đến nồng độ atorvastatin nằm trong khoảng từ 8,42 đến 15mg/ml.
17. Hạt đông khô để hoàn nguyên theo điểm 16, trong đó hạt đông khô này có thể được hoàn nguyên đến nồng độ atorvastatin bằng 10mg/ml.

Fig.1

