



Brevetto europeo No. 2926805

Domanda di brevetto europeo No. 14162727.3

Data di deposito: 31 marzo 2014

Classificazione Internazionale: A61K9/00, A61K47/02, A61K9/19, A61K31/519, A61P9/10, A61P25/00

5 Titolo: "COMPOSIZIONI FARMACEUTICHE SOLIDE COMPRENDENTI DERIVATI DELLA BIOPTERINA E
USI DI TALI COMPOSIZIONI"

Richiedente: Vasopharm GmbH
Friedrich-Bergius-Ring 15
97076 Würzburg

10 Germania

Inventori: Tegtmeier, Frank
Schinzel, Reinhard
Scheurer, Peter

15 **Descrizione**

CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda composizioni farmaceutiche solide comprendenti derivati della biopterina così come metodi per ottenere tali composizioni farmaceutiche solide. L'invenzione riguarda anche composizioni farmaceutiche solide dell'invenzione per trattare malattie.

20 **SFONDO DELL'INVENZIONE**

Le biopterine e loro derivati sono molecole di interesse farmaceutico. Per esempio, la tetraidrobiopterina (BH₄, sapropterina) è stata approvata recentemente per il trattamento dell'iperfenilalaninemia (HPA) in pazienti adulti e pediatrici di 4 e più anni di età con fenilchetonuria (PKU). A questo scopo, la tetraidrobiopterina è formulata nel farmaco commerciale (venduto con il nome Kuvan) come compressa dissolvibile con mannitolo (E421), idrogenofosfato di calcio, anidro, crosprovidone di tipo A, acido ascorbico (E300), stearilfumarato di sodio e riboflavina (E101). Si veda in questo

25



contesto anche WO2006/055511 che riguarda una formulazione solida stabile di tetraidrobiopterina, procedimenti per produrla, e metodi di trattamento utilizzando tali formulazioni.

Altri composti di biopterina terapeuticamente promettenti sono 4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina e 4-ammino-7,8-diidro-L-biopterina. È stato mostrato che entrambi i composti esibiscono proprietà differenti da quelle di altri inibitori di NO, rendendo il composto potenzialmente più adatto rispetto agli analoghi "classici" dell'arginina (Werner et al., (1996). Biochemical Journal 320, 93-6, o brevetto US 5,922,713 che descrive un metodo per realizzare l'inibizione della ossido nitrico sintasi e la riduzione del livello di ossido nitrico mediante l'uso di una composizione comprendente un composto di pterina). È stato mostrato che entrambi i composti sono efficaci nel TBI sperimentale (si vedano, per esempio, WO2004/084906 che riguarda l'uso di derivati di pteridina per il trattamento di pressione intracranica, ischemia secondaria e disturbi associati ad un livello aumentato di specie reattive dell'ossigeno citotossiche, brevetto US 8,222,828, brevetto europeo 0 906 913, o Terpolilli et al., J Neurotrauma. 2009; 26(11):1963-75 che riguarda lo studio dell'efficacia terapeutica di un inibitore della ossido nitrico sintasi basato su tetraidrobiopterina nel danno cerebrale traumatico sperimentale). Tuttavia, questi derivati della biopterina non sono ancora stati approvati per il trattamento medico. Così, vi è la necessità di fornire composizioni farmaceutiche che siano adatte per applicazioni terapeutiche all'uomo. Idealmente, una tale composizione farmaceutica dovrebbe essere facile da preparare, facile da utilizzare e tuttavia stabile - è indicato in questo contesto che derivati della biopterina idrogenati sono sensibili nei confronti dell'ossidazione, quando conservati per un lungo periodo di tempo o quando forniti in soluzione.

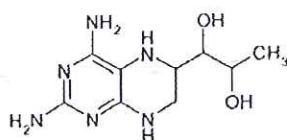
È così un oggetto della presente invenzione il fornire una composizione farmaceutica comprendente derivati della biopterina che soddisfi queste necessità.

20 RIASSUNTO DELL'INVENZIONE

Questo problema è risolto mediante le forme di realizzazione dell'invenzione come definita nelle rivendicazioni, descritta nella descrizione, ed illustrata negli Esempi e nelle Figure.

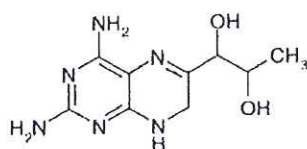
La presente invenzione riguarda in una forma di realizzazione una composizione farmaceutica solida comprendente

25 a) un composto avente la formula (I):



(I)

e/o un composto avente la formula (II):



(II)

e

5 b) almeno un sale fosfato.

In una forma di realizzazione nella composizione farmaceutica della presente invenzione, l'almeno un sale fosfato è un fosfato di sodio, un fosfato di potassio o un fosfato d'ammonio. Il sale fosfato può essere scelto nel gruppo consistente di Na_2HPO_4 (privo di acqua), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, NaH_2PO_4 (privo di acqua), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 (privo di acqua), $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 (privo di acqua) e loro miscele.

10 In alcune forme di realizzazione della composizione farmaceutica della presente invenzione, il sale fosfato è $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e la quantità di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ presente nella composizione viene scelta in modo tale che il rapporto molare di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ rispetto al composto (I) o composto (II) vari da 0,04 a 0,4.

In ulteriori forme di realizzazione della composizione farmaceutica della presente invenzione, il fosfato di sodio è $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, e la quantità di $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ presente nella composizione viene scelta in modo tale che il rapporto molare di $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ rispetto al composto (I) o al composto (II) vari da 0,01 a 0,09.

15 In altre forme di realizzazione, la composizione farmaceutica della presente invenzione comprende due differenti sali fosfato di sodio. Facoltativamente, i due differenti sali fosfato di sodio sono $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

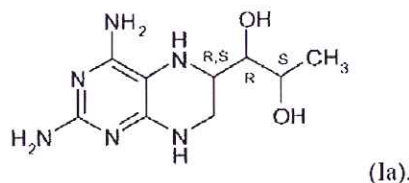
In alcune forme di realizzazione della composizione farmaceutica della presente invenzione, la quantità di $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ presente nella composizione viene scelta in modo tale che il rapporto molare sia di $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sia di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ rispetto al composto (I) o al composto (II) vari da 0,02 a 0,5.

5 In alcune forme di realizzazione della composizione farmaceutica della presente invenzione, la quantità di $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ presente nella composizione viene scelta in modo tale che il rapporto molare di ciascuno di $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ rispetto al composto (I) o al composto (II) vari da 0,02 a 0,5.

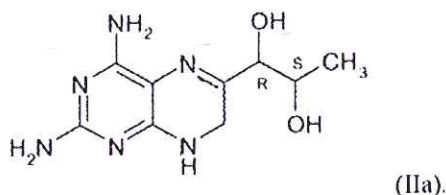
In ulteriori forme di realizzazione della composizione farmaceutica della presente invenzione il composto (I) e/o il composto (II) sono presenti come base libera.

10 In alcune forme di realizzazione della composizione farmaceutica della presente invenzione la composizione farmaceutica è una composizione farmaceutica liofilizzata.

In un'altra forma di realizzazione della composizione farmaceutica della presente invenzione, il composto (I) è un composto avente la formula (Ia):



15 In un'altra forma di realizzazione della composizione farmaceutica della presente invenzione, il composto (II) è un composto avente la formula (IIa):



In alcune forme di realizzazione della composizione farmaceutica della presente invenzione, la composizione farmaceutica comprende un ulteriore eccipiente farmaceutico.



In un'altra forma di realizzazione della composizione farmaceutica della presente invenzione, l'ulteriore eccipiente farmaceutico è un sale inorganico. Il sale inorganico può essere scelto tra $MgCl_2$, $CaCl_2$, NH_4Cl , KCl , o $NaCl$, preferibilmente il sale inorganico è $NaCl$.

5 In alcune forme di realizzazione della composizione farmaceutica della presente invenzione, la quantità di $NaCl$ presente nella composizione della presente invenzione viene scelta in modo tale che il rapporto molare di $NaCl$ rispetto al composto (I) o al composto (II) vari da 1,5 a 4, preferibilmente da 1,8 a 3,7.

In alcune forme di realizzazione, la composizione farmaceutica della presente invenzione comprende inoltre acqua di cristallizzazione.

10 In altre forme di realizzazione, la composizione farmaceutica della presente invenzione è adatta per essere ricostituita in acqua.

In ulteriori forme di realizzazione la composizione farmaceutica della presente invenzione è adatta per una somministrazione mediante infusione o iniezione.

In alcune forme di realizzazione della composizione farmaceutica della presente invenzione il composto (I) è (6R)-4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina.

15 In ulteriori forme di realizzazione della composizione farmaceutica della presente invenzione il composto (I) è (6S)-4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina.

In altre forme di realizzazione della composizione farmaceutica della presente invenzione il composto (I) è una miscela diastereoisomerica che comprende più (6R)-4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina rispetto a (6S)-4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina.

20 In alcune forme di realizzazione della composizione farmaceutica della presente invenzione la quantità di (6R)-4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina e di (6S)-4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina viene scelta in modo tale che il rapporto della quantità di (6R)-4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina rispetto alla (6S)-4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina vari da 0,5 a 2, preferibilmente attorno a 1,3.

25 In ulteriori forme di realizzazione della composizione farmaceutica della presente invenzione, un dosaggio unitario della composizione contiene 650 ± 60 mg della base libera di 4-ammino-(6R,S)-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina,



140 ± 30 mg di acqua di cristallizzazione, 70 ± 7 mg di idrogenofosfato di sodio diidrato (Na₂HPO₄•2H₂O), 16,5 ± 2 mg di idrogenofosfato di sodio diidrato (NaH₂PO₄•2H₂O), e 350 ± 30 mg di cloruro di sodio (NaCl).

5 La presente invenzione riguarda anche una composizione farmaceutica liofilizzata della presente invenzione per uso nel trattamento di una malattia. In alcune forme di realizzazione, la malattia viene scelta nel gruppo consistente di danno cerebrale traumatico, danno cerebrale non traumatico, preferibilmente ictus o meningite, pressione cranica elevata, danno cerebrale secondario.

La presente invenzione riguarda inoltre un metodo per preparare una composizione farmaceutica solida liofilizzata comprendente

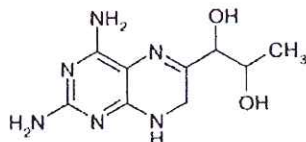
a) un composto avente la formula (I):



(I)

10

e/o un composto avente la formula (II):



(II)

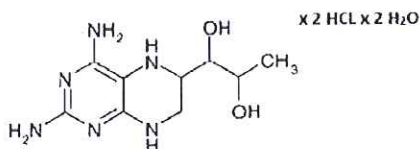
e

b) almeno un sale fosfato e facoltativamente NaCl;

15

il metodo comprendendo:

aa) sciogliere un composto di formula (III) e/o il composto di formula (II):



(III)

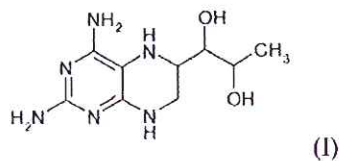
con un tampone, in cui il tampone comprende il fosfato;

bb) liofilizzare la soluzione ottenuta in aa).

5 In alcune forme di realizzazione, il metodo della presente invenzione comprende inoltre il passaggio di sciogliere il liofilizzato ottenuto in bb) in un fluido farmaceuticamente accettabile per la preparazione di una soluzione iniettabile.

Conseguentemente, la presente invenzione riguarda inoltre un metodo per preparare una soluzione iniettabile comprendente:

a) un composto avente la formula (I):



10 e/o un composto avente la formula (II):

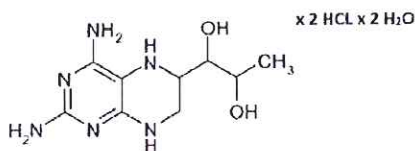


e

b) almeno un sale fosfato e facoltativamente NaCl;

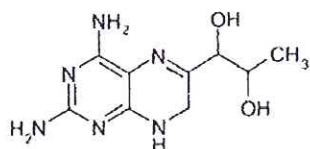
il metodo comprendendo:

15 aa) sciogliere il composto di formula (III) e/o (II):



(III),

o



(II)

con un tampone, in cui il tampone comprende il fosfato;

5 bb) liofilizzazione della soluzione ottenuta in aa);

cc) ricostituire il liofilizzato ottenuto in bb) in un fluido farmaceuticamente accettabile per la preparazione di una soluzione iniettabile, in cui il liofilizzato ottenuto in bb) viene utilizzato per riempire una fiala, preferibilmente una fiala da 50 ml, preferibilmente in una quantità di circa 1-1,5 g, preferibilmente 1,25 g di formulazione solida.

10 In altre forme di realizzazione, nel metodo della presente invenzione il tampone in aa) è un tampone idrogenofosfato di sodio comprendente almeno un sale fosfato.

In altre forme di realizzazione, nel metodo della presente invenzione il tampone in aa) comprende NaOH, tampone idrogenofosfato di sodio ed acqua. Facoltativamente, l'NaOH è una soluzione 5N di NaOH.

15 In un'altra forma di realizzazione del metodo della presente invenzione il tampone idrogenofosfato di sodio viene preparato sciogliendo separatamente NaH₂PO₄•2H₂O e Na₂HPO₄•2H₂O. In un'ulteriore forma di realizzazione del metodo della presente invenzione il tampone idrogenofosfato di sodio ha un pH di 7,4 aggiungendo la soluzione di NaH₂PO₄•2H₂O alla soluzione di Na₂HPO₄•2H₂O.

In alcune forme di realizzazione del metodo della presente invenzione il tampone comprende NaOH 5N al 12-16% (p/p), tampone idrogenofosfato di sodio all'8-12% (p/p) e acqua per iniezioni al 74-78% (p/p).



In un'altra forma di realizzazione del metodo della presente invenzione, la soluzione ottenuta in aa) viene sterilizzata mediante filtrazione, preferibilmente con un filtro da 0,22 µm.

In ulteriori forme di realizzazione del metodo della presente invenzione, il tampone ha un pH di circa 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14.

5 In ancora un'altra forma di realizzazione del metodo della presente invenzione, la soluzione nel passaggio aa) ha un pH di circa 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 11 preferibilmente tra 6,5-7,6, il più preferibilmente 7,4.

In altre forme di realizzazione del metodo della presente invenzione, il liofilizzato ottenuto in bb) viene utilizzato per riempire fiale, preferibilmente in una quantità di circa 1-1,5 g, preferibilmente una formulazione solida di 1,25 g. In ulteriori forme di realizzazione del metodo della presente invenzione il tampone viene preparato con tampone degassato.

10 In alcune forme di realizzazione, il tampone viene degassato con azoto finché il contenuto di ossigeno non sia < 1,0 ppm.

In un'altra forma di realizzazione del metodo della presente invenzione, dopo la preparazione della soluzione, la liofilizzazione viene iniziata al massimo 2 h dopo.

Viene descritta nel contesto della presente invenzione anche una composizione farmaceutica che può essere ottenuta secondo il metodo della presente invenzione.

15 Inoltre, viene descritto nel contesto della presente invenzione anche l'uso della composizione farmaceutica liofilizzata della presente invenzione nella preparazione di un medicamento per trattare un soggetto avente danno cerebrale traumatico quale lesione cranica chiusa, pressione cranica elevata ma anche danno cerebrale secondario o danno cerebrale non traumatico quale ictus o meningite.

20 È descritto nel contesto della presente invenzione anche un metodo di trattamento di una malattia in un soggetto, comprendente la fase di somministrare una composizione farmaceutica liofilizzata della presente invenzione ad un soggetto che lo richiede. In alcune forme di realizzazione, nel metodo per trattare una malattia in un soggetto la dose giornaliera massimale è 20 mg/kg di peso corporeo al giorno, preferibilmente, 17,5, 15,0, o 12,5, 10, 8,5, 7,5, 5,0, o 2,5 mg/kg di peso corporeo al giorno.

25 In ancora un'altra forma di realizzazione l'invenzione riguarda una composizione farmaceutica solida comprendente



a) un composto avente la formula (I):



e/o un composto avente la formula (II):



5 e

b) almeno un sale inorganico, preferibilmente NaCl.

In una tale forma di realizzazione, la quantità di NaCl presente nella composizione della presente invenzione può essere scelta in modo tale che il rapporto molare di NaCl rispetto al composto (I) o al composto (II) vari da 1,5 a 4, preferibilmente da 1,8 a 3,7, da 1,85 a 3,6, da 1,9 a 3,4, il più preferibilmente da 1,9 a 2,5.

10 In una forma di realizzazione il rapporto molare di NaCl rispetto al composto (I) o al composto (II) è circa 2,2.

BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

La **Figura 1** mostra la preparazione della sostanza farmaceutica 4-ammino-(6R,S)-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina dicloridrato diidrato (VAS203).

La **Figura 2** mostra un procedimento di produzione del prodotto farmaceutico VAS203 secondo l'invenzione.

15 La **Figura 3** mostra la stabilità di fiale di VAS203 da 1 g (lotto no. 928606), conservate a 2-8°C (Tabella 5).

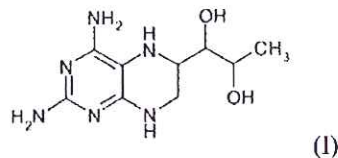
DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

È stato un oggetto della presente invenzione il fornire composizioni farmaceutiche. Inoltre, queste composizioni dovrebbero essere facili da utilizzare e stabili. È stato trovato qui che l'uso di sali del fosfato solidi (da soli o in unione ad un sale inorganico quale NaCl o KCl) in unione a derivati della biopterina solidi quali composti di formula (I) o (II)

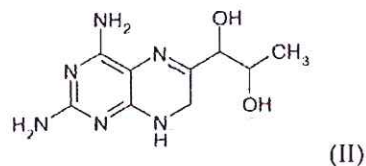


risulta in composizioni farmaceutiche (formulazioni) che sono molto ben adatte a raggiungere un valore di pH o un intervallo di pH così come un'osmolalità che, a seguito di dissoluzione, sono direttamente adatte per la somministrazione terapeutica. Le composizioni farmaceutiche solide sono particolarmente ben adatte e facili da utilizzare, poiché sono già adatte per una somministrazione endovenosa, garantendo quindi anche un uso sicuro. Inoltre, il problema dell'ossidazione dei derivati della biopterina nei liquidi viene risolto mediante il fornire composizioni solide.

- 5
- Così, la presente invenzione riguarda una composizione farmaceutica solida comprendente
- a) un composto avente la formula (I):



- e/o un composto avente la formula (II):

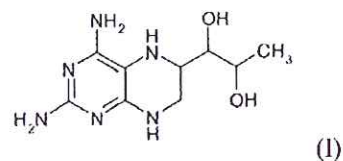


10

- e
- b) almeno un sale fosfato.

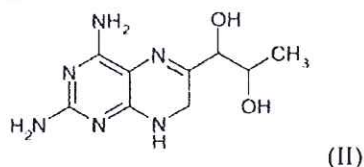
Inoltre, la presente invenzione riguarda anche una composizione farmaceutica solida comprendente

a) un composto avente la formula (I):



15

- e/o un composto avente la formula (II):



e

b) almeno un sale inorganico, in particolare NaCl.

I termini “solido” o “composizione solida” quando utilizzati qui riguardano particelle (ioni, atomi o molecole o composti) che sono strettamente impaccate insieme. Le forze tra le particelle sono forti così che le particelle non possono muoversi liberamente ma possono solo vibrare. Di conseguenza, un solido ha una forma stabile, definita, ed un volume definito. I solidi possono solo cambiare la loro forma mediante forza, come quando rotti o tagliati. Nei solidi cristallini, le particelle (atomi, molecole, o ioni) sono impaccate in un modello di ripetizione ordinato in modo regolare. Vi sono varie strutture cristalline differenti, e la stessa sostanza può avere più di una struttura (o fase solida). Il termine “solido” comprende anche composizioni/sostanze/solidi amorfi o non cristallini. Di solito, lo stato aggregato viene determinato a temperatura ambiente e pressione ambiente. La temperatura ambiente comunemente rappresenta il piccolo intervallo di temperatura in cui non si percepisce l'aria né calda né fredda, viene spesso indicato l'intervallo tra 20°C e 23,5°C con una media di 21°C (70°F). Con pressione ambiente si intende una pressione tra 900 e 1200 hPa (ettoPascal), preferibilmente circa 1000 hPa. I solidi possono essere trasformati in liquidi mediante fusione, ed i liquidi possono essere trasformati in solidi mediante congelamento. I solidi possono anche modificarsi direttamente in gas attraverso il procedimento di sublimazione.

La composizione solida della presente invenzione può essere somministrata (solitamente a seguito di dissoluzione in un liquido quale acqua) ad un individuo (“somministrazione”). Questo fornisce la somministrazione di una dose terapeuticamente efficace della composizione solida della presente invenzione ad un soggetto.

La “quantità terapeuticamente efficace” è una dose del composto di formula (I) e/o del composto di formula (II) che produce gli effetti per cui viene somministrata. La dose esatta dipenderà dallo scopo del trattamento, e sarà accertabile da un esperto nell'arte utilizzando tecniche note. Com'è noto nell'arte e descritto sopra, possono essere necessari



adeguamenti per il rilascio sistemico rispetto al localizzato, l'età, il peso corporeo, lo stato di salute generale, il sesso, la dieta, il tempo di somministrazione, l'interazione tra farmaci e la gravità delle condizioni, e saranno accertabili con sperimentazione di routine da parte di coloro che sono esperti nell'arte. In questo contesto, è indicato ancora che entrambi i composti, 4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina e 4-ammino-7,8-diidro-L-biopterina sono farmaceuticamente attivi.

5 È indicato anche che la 4-ammino-7,8-diidro-L-biopterina può essere ottenuta mediante ossidazione (anche ossidazione spontanea) dalla 4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina. Così, una composizione dell'invenzione può comprendere solo la 4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina o la 4-ammino-7,8-diidro-L-biopterina o una miscela di questi due composti in qualsiasi rapporto.

10 Le composizioni solide della presente invenzione sono applicabili ad applicazioni sia di terapia umana sia veterinarie. I composti qui descritti aventi l'attività terapeutica desiderata possono essere somministrati in un veicolante farmaceuticamente accettabile ad un paziente/soggetto, come qui descritto. A seconda del modo di introduzione, i composti possono essere formulati in una varietà di modi come discusso sotto. La composizione solida della presente invenzione può essere somministrata da sola o in combinazione con altri trattamenti.

15 La composizione solida della presente invenzione può essere inoltre "adatta per una somministrazione endovenosa". Questo significa che la composizione solida è preferibilmente miscelata con un veicolante farmaceuticamente accettabile, preferibilmente un fluido farmaceuticamente accettabile, per esempio acqua o tampone o qualsiasi dei fluidi per ricostituzione come descritto sotto, così che la composizione solida possa essere utilizzata per applicazione endovenosa. La somministrazione endovenosa è l'infusione o l'iniezione di sostanze liquide direttamente in una vena, solitamente con una siringa ed un ago cavo che viene introdotto nella pelle ad una profondità sufficiente affinché
20 il materiale sia somministrato nel corpo del soggetto.

Così, in ulteriori forme di realizzazione, la composizione farmaceutica della presente invenzione è adatta per una somministrazione mediante infusione o iniezione. Con "infusione" si intende una somministrazione continua per un certo periodo di tempo. Per esempio una tale somministrazione può richiedere da 10 min a 4 giorni. Così essa può richiedere al massimo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 32, 40, 48, 56, 68, 72, 86, o 96
25 h. Un mezzo di "iniezione" è un metodo di infusione transitorio per porre del fluido nell'organismo di un soggetto. Di



solito una tale somministrazione richiede meno di 10 min. Tuttavia, un'iniezione può essere ripetuta varie volte al giorno. Per esempio, un'iniezione può avvenire 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 volte al giorno. Inoltre la/e iniezione/i può/possono essere somministrata/e per 1, 2, 3 o 4 giorni. Tuttavia, la somministrazione attraverso iniezione o infusione può anche impiegare un tempo più lungo se richiesto. È chiaro che l'esatta durata dipende da molti fattori.

5 Tipicamente, composizioni per somministrazione endovenosa sono la composizione farmaceutica solida della presente invenzione miscelata con un veicolante farmaceuticamente accettabile, per esempio, con tampone acquoso isotonico sterile per formare una soluzione farmaceutica. Dove necessario, questa composizione/soluzione può anche comprendere un agente solubilizzante ed un anestetico locale quale lignocaina per lenire il dolore al sito dell'iniezione. Generalmente, i componenti vengono forniti separatamente o miscelati insieme in una forma di dosaggio unitario, per
10 esempio come polvere liofilizzata anidra o come concentrato privo di acqua in un contenitore sigillato ermeticamente quale una fiala, una fialetta o una bustina indicanti la quantità del composto (I) e/o del composto (II). Dove la composizione/soluzione deve essere somministrata mediante infusione, essa può essere distribuita con una bottiglia da infusione contenente acqua o soluzione salina sterili di grado farmaceutico. Dove la composizione viene somministrata per iniezione o per infusione, può essere fornita una fiala di acqua per iniezioni o di soluzione salina sterile, in modo tale
15 che i componenti possano essere miscelati prima della somministrazione.

Il termine "farmaceuticamente accettabile" significa approvato da un'agenzia regolatoria o da un'altra Farmacopea generalmente riconosciuta per l'uso negli animali, e più in particolare nell'uomo. Generalmente "farmaceuticamente accettabile" significa anche "fisiologicamente accettabile" che significa che il fluido/veicolante è in
20 accordo con o caratteristico del funzionamento normale di un soggetto vivente e non provoca tossicità o alcun altro effetto avverso. Un tale fluido/veicolante normalmente ha circa lo stesso pH e/o la stessa osmolalità, per esempio, dei fluidi, quali il sangue, di un animale.

Il "fluido farmaceuticamente accettabile" può essere uno del seguente elenco non limitante di solventi non acquosi o acquosi. Solventi non acquosi sono glicole propilenico, polietilenglicole, oli vegetali quali olio d'oliva, ed esteri organici iniettabili quali oleato di etile. Solventi acquosi includono acqua, soluzioni, emulsioni o sospensioni
25 alcoliche/acquose, compresi soluzione salina e mezzi tamponati, soluzione dello ione sodio, destrosio di Ringer, destrosio



e ione sodio, lattato di Ringer, oppure oli non volatili. I veicoli endovenosi includono rigeneratori di fluidi e di nutrienti, rigeneratori di elettroliti (quali quelli a base di destrosio di Ringer) e simili. Un fluido farmaceuticamente accettabile preferito è un solvente acquoso, per esempio acqua sterile per iniezioni.

5 In alcune forme di realizzazione, la composizione farmaceutica solida della presente invenzione viene ricostituita prima della somministrazione. In altre forme di realizzazione, la composizione farmaceutica della presente invenzione è adatta per essere ricostituita in acqua. "Ricostituita in acqua" significa ritornare (un deidratato o un concentrato) composizione allo stato liquido mediante l'aggiunta di un fluido farmaceuticamente accettabile come descritto sopra. Preferibilmente, la composizione solida della presente invenzione viene ricostituita in acqua.

10 L'invenzione può comprendere differenti composizioni solide. Per esempio, la composizione solida può comprendere il composto (I) e/o il composto (II) in aggiunta ad un sale fosfato. Con "sale fosfato" si intende che può essere utilizzato qualsiasi sale fosfato noto. Sali del fosfato si riferiscono a molte combinazioni differenti del fosfato chimico con sali e minerali. In una forma di realizzazione nella composizione farmaceutica della presente invenzione, l'almeno un sale fosfato è un fosfato di sodio, un fosfato di potassio o un fosfato d'ammonio. Il sale fosfato può essere scelto nel gruppo consistente di Na_2HPO_4 (privo di acqua), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, NaH_2PO_4 (privo di acqua), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 (privo di acqua), $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 (privo di acqua) e loro miscele.

15 In alcune forme di realizzazione della composizione farmaceutica della presente invenzione, il sale fosfato è $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e la quantità di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ presente nella composizione viene scelta in modo tale che il rapporto molare di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ rispetto al composto (I) o al composto (II) vari da 0,04 a 0,4, preferibilmente da 0,05 a 0,35, da 0,075 a 0,25, da 0,09 a 0,2. In una forma di realizzazione il rapporto molare di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ rispetto al composto (I) o al composto (II) è circa 0,144.

20 In ulteriori forme di realizzazione della composizione farmaceutica della presente invenzione, il fosfato di sodio è $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, e la quantità di $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ presente nella composizione viene scelta in modo tale che il rapporto molare di $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ rispetto al composto (I) o al composto (II) vari da 0,01 a 0,09 preferibilmente da 0,015 a 0,07,



da 0,02 a 0,05, da 0,025 a 0,04, da 0,035 a 0,05. In una forma di realizzazione il rapporto molare di $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ rispetto al composto (I) o al composto (II) è circa 0,038.

In altre forme di realizzazione, la composizione farmaceutica della presente invenzione comprende due differenti sali fosfato di sodio. Facoltativamente, i due differenti sali fosfato di sodio sono $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

5 In alcune forme di realizzazione della composizione farmaceutica della presente invenzione, la quantità di $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ presente nella composizione viene scelta in modo tale che il rapporto molare sia di $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sia di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ rispetto al composto (I) o al composto (II) vari da 0,02 a 0,5, preferibilmente da 0,03 a 0,45, da 0,04 a 0,3, da 0,05 a 0,25, da 0,06 a 0,2, da 0,07 a 0,15. In una forma di realizzazione il rapporto molare sia di $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sia di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ rispetto al composto (I) o al composto (II) è circa 0,18.

10 In alcune forme di realizzazione della composizione farmaceutica della presente invenzione, la quantità di $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ presente nella composizione viene scelta in modo tale che il rapporto molare di ciascuno di $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ rispetto al composto (I) o al composto (II) vari da 0,02 a 0,5, preferibilmente da 0,025 a 0,4, da 0,025 a 0,3, da 0,025 a 0,2, da 0,03 a 0,1. In alcune forme di realizzazione, la quantità di $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ presente nella composizione viene scelta in modo tale che il rapporto molare di $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ rispetto al composto (I) o al composto (II) vari da 0,01 a 0,09 e la quantità del $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ presente nella composizione viene scelta in modo tale che il rapporto molare di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ rispetto al composto (I) o al composto (II) vari da 0,04 a 0,4. Qui, si applicano anche le altre quantità dei sali fosfato applicati singolarmente $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ come descritto sopra. In alcune forme di realizzazione, la composizione farmaceutica solida comprende almeno 1, 2, 3, 4, 5, 6, o più sali fosfato. In una forma di realizzazione la composizione farmaceutica solida della presente invenzione
20 comprende 2 (differenti) sali fosfato.

Quando utilizzato qui, il termine "circa" intende significare che possono esservi variazioni nel rispettivo valore o intervallo (quale pH, concentrazione, percentuale, molarità, tempo ecc.) che può essere fino al 5%, fino al 10%, fino al 15% o fino a e compreso il 20% del valore dato. Per esempio, se una formulazione comprende circa 5 mg/ml di un composto, questo intende significare che una formulazione può avere tra 4 e 6 mg/ml, preferibilmente tra 4,25 e 5,75
25 mg/ml, più preferibilmente tra 4,5 e 5,5 mg/ml ed ancor più preferibilmente tra 4,75 e 5,25 mg/ml, il più preferito essendo



5 mg/ml. Lo stesso si applica anche alla molarità. Per esempio un molarità di circa 1 si deve intendere come molarità tra 0,8 e 1,2, preferibilmente da 0,85 a 1,15, più preferibilmente da 0,9 a 1,1, ancor più preferibilmente da 0,95 a 1,05, il più preferito essendo 1.

5 In alternativa, la presente invenzione riguarda composizioni solide, che comprendono il composto (I) e/o il composto (II) ed un sale inorganico differente da un sale fosfato. In queste composizioni, il sale inorganico può essere l'unico componente oltre al composto (I) o (II) (in questo caso, non vi è alcun sale fosfato presente). In alternativa, nella composizione dell'invenzione un sale inorganico può essere presente in combinazione con almeno un fosfato. Il termine "sale inorganico" quando indicato qui significa ogni sale inorganico adatto. Facoltativamente, il sale inorganico viene scelto tra $MgCl_2$, $CaCl_2$, NH_4Cl , KCl , o $NaCl$. In alcune forme di realizzazione preferite, il sale inorganico è $NaCl$.
10 In alcune forme di realizzazione della composizione farmaceutica della presente invenzione la quantità di $NaCl$ presente nella composizione della presente invenzione (da solo o insieme ad almeno un fosfato) viene scelta in modo tale che il rapporto molare di $NaCl$ rispetto al composto (I) o al composto (II) vari da 1,5 a 4, preferibilmente da 1,8 a 3,7, da 1,85 a 3,6, da 1,9 a 3,4, il più preferibilmente da 1,9 a 2,5. In una di tali forme di realizzazione il rapporto molare di $NaCl$ rispetto al composto (I) o al composto (II) è circa 2,2

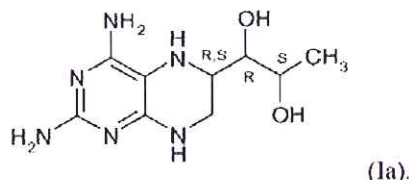
15 Nelle composizioni dell'invenzione, i composti (I) e/o il composto (II) possono essere presenti come miscele diastereoisomeriche o miscele di 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 stereoisomeri per il composto (I) e 1, 2, 3, 4, 5 o 6 stereoisomeri per il composto (II), preferibilmente di uno o due stereoisomeri.

Il composto di formula (I) può così comprendere miscele diastereoisomeriche del composto di formula (I) o miscele di uno o più stereoisomeri del composto di formula (I). Il composto (I) può essere (6R)-4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina. In ulteriori forme di realizzazione il composto (I) è (6S)-4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina.
20 In altre forme di realizzazione, il composto (I) è una miscela diastereoisomerica che comprende più (6R)-4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina rispetto a (6S)-4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina. In alcune forme di realizzazione, la quantità di (6R)-4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina e di (6S)-4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina viene scelta in modo tale che il rapporto della quantità di (6R)-4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina rispetto alla (6S)-4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina varia da 0,5 a 2, preferibilmente da 0,5 a 1,9, da 0,7 a 1,8, da 0,8 a 1,7, da 0,9 a
25

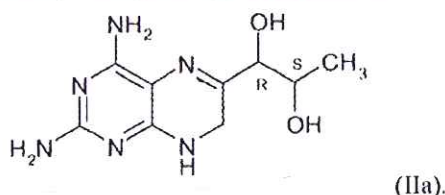


1,6, da 1 a 1,5, il più preferibilmente da 1,1 a 1,4. In una forma di realizzazione, la quantità di (6R)-4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina e di (6S)-4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina viene scelta in modo tale che il rapporto della quantità di (6R)-4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina rispetto alla (6S)-4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina sia attorno a 1,3. In alcune forme di realizzazione, la composizione farmaceutica della presente invenzione comprende solo il composto (I).

Il composto (I) può anche essere un composto avente la formula (Ia):



In modo simile, il composto di formula (II) quando indicato qui può comprendere miscele stereoisomeriche del composto di formula (II) o miscele di uno o più stereoisomeri del composto di formula (II). In alcune forme di realizzazione della composizione farmaceutica della presente invenzione il composto (II) è 4-ammino-7,8-diidro-L-biopterina. In un'altra forma di realizzazione, il composto (II) è un composto avente la formula (IIa):



In alcune forme di realizzazione, la composizione farmaceutica della presente invenzione comprende solo il composto (II).

All'interno delle composizioni farmaceutiche solide il composto (I) e/o il composto (II) possono anche essere presenti come base libera. Una "base libera" quando indicata qui si riferisce alla forma basica pura di un'ammina, al contrario della sua forma di sale. Inoltre, questo termine viene utilizzato per descrivere la forma amminica deprotonata di



un composto. Un controione comune è uno ione da un acido inorganico quale un cloruro carico negativamente. Per esempio, si confronti l'ammina base libera (NH_2) con l'ammina cloridrato ($\text{NH}_3^+ \text{Cl}^-$) quando si aggiunge HCl.

Come citato sopra, i derivati della bioterina sono sensibili nei confronti dell'ossidazione nei liquidi. Quindi, la composizione farmaceutica solida può anche essere fornita come composizione farmaceutica liofilizzata. Il termine "liofilizzato" quando utilizzato qui significa crio-essiccamento, che è un procedimento di disidratazione. Il crio-essiccamento funziona congelando il materiale e riducendo quindi la pressione circostante per permettere all'acqua congelata nel materiale di sublimare direttamente dalla fase solida alla fase gassosa. In alcune forme di realizzazione, il contenuto residuo finale di acqua nel prodotto liofilizzato è tra lo 0% ed il 15%, preferibilmente tra lo 0% ed il 12%, (p/p). I metodi per eseguire la liofilizzazione sono noti alla persona esperta nell'arte.

Come evidente per la persona esperta nell'arte, le composizioni farmaceutiche possono anche comprendere 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o più ulteriori eccipienti farmaceutici. Un "eccipiente farmaceutico" o additivi sono composti aggiunti ai composti di formula (I) e/o (II). Questi additivi potrebbero servire ad una funzione specifica. Possono essere aggiunti per incrementare il volume, agevolare la produzione, migliorare la stabilità, aumentare il rilascio e l'indirizzamento del farmaco, e modificare la sicurezza del farmaco o il profilo farmacocinetico. Sono considerati eccipienti anche i componenti che vengono utilizzati durante la produzione del prodotto farmaceutico ma possono non essere presenti nella composizione solida della presente invenzione (esempi includono acqua per prodotti liofilizzati, e gas inerte nello spazio di testa dei contenitori). Gli eccipienti farmaceutici adatti includono amido, glucosio, lattosio, saccarosio, trealosio, mannitolo, sorbitolo, glicina, istidina, raffinosa, gelatina, malto, riso, farina, gesso, gel di silice, stearato di sodio, monostearato di glicerolo, talco, ione sodio, latte scremato essiccato, glicerolo, propilene, glicole, destrosio, destrano, acqua, etanolo e simili. La composizione, se si desidera, può contenere anche piccole quantità di agenti umettanti o emulsionanti, o di agenti tamponanti il pH. Queste composizioni possono assumere la forma di soluzioni, sospensioni, emulsione e simili.

Se, per esempio, la composizione solida della presente invenzione comprende un composto di formula (I) e/o di formula (II) ed un sale fosfato, un possibile ulteriore eccipiente farmaceutico può essere un sale inorganico. Il sale inorganico può essere qualsiasi sale inorganico come descritto sopra. D'altra parte, se la composizione farmaceutica della



presente invenzione comprende un composto di formula (I) e/o di formula (II) ed un sale inorganico, un ulteriore eccipiente farmaceutico può essere un sale fosfato. Il sale fosfato può essere qualsiasi sale fosfato come descritto sopra.

Oltre agli eccipienti farmaceutici che possono essere presenti nelle composizioni farmaceutiche solide delle presenti invenzioni, in alcune forme di realizzazione la composizione farmaceutica della presente invenzione può comprendere acqua di cristallizzazione, ovviamente possono anche essere presenti ulteriori eccipienti farmaceutici. Come
5 utilizzato qui secondo il loro regolare significato nell'arte, "acqua di cristallizzazione" o "acqua di idratazione" o "acqua di cristallizzazione" intendono l'acqua che si trova all'interno di cristalli - nella presente invenzione, sia sali inorganici quali Na_2HPO_4 o NaH_2PO_4 sia il derivato della biopterina del composto (I) o del composto (II) possono avere acqua di cristallizzazione. Anche se nei sali di fosfato solidi quali $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ o $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ l'acqua di cristallizzazione è
10 presente in quantità stechiometriche definite, la quantità di acqua di cristallizzazione presente nella forma solida del composto (I) o del composto (II) può variare in relazione alle condizioni per la sintesi e/o per la cristallizzazione del composto che viene utilizzato per la preparazione della formulazione solida della presente invenzione. Senza voler essere vincolati ad alcuna teoria, si ritiene che l'acqua di cristallizzazione che è presente nella forma solida del composto (I) o del composto (II) possa essere, per esempio, legata attraverso legami a idrogeno ai due gruppi amminici del composto (I)
15 o (II) che sono presenti come base libera. A fini informativi, in questo contesto si fa riferimento ad un dosaggio unitario della composizione che contiene 650 ± 60 mg della base libera di 4-ammino-(6R,S)-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina, 140 ± 30 mg di acqua di cristallizzazione, 70 ± 7 mg di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $16,5 \pm 2$ mg di $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, e 350 ± 30 mg di cloruro di sodio (NaCl). In questo dosaggio unitario i due sali fosfato di sodio sono presenti come diidrati, mentre l'acqua di cristallizzazione che è presente in quantità di 140 ± 30 mg di acqua di cristallizzazione si riferisce solo all'acqua che è
20 presente in associazione alla base libera del composto (I) e/o del composto (II).

Come appena descritta, la composizione farmaceutica della presente invenzione può essere fornita in un dosaggio unitario. Un "dosaggio unitario" delle composizioni farmaceutiche solide della presente invenzione significa che i componenti vengono miscelati insieme in un dosaggio unitario, tipicamente implicante una miscela di componenti farmaceutici attivi, quali il composto (I) e/o il composto (II), e componenti non farmaceutici (eccipienti), quali almeno
25 un sale fosfato e/o almeno un sale inorganico. Inoltre, un dosaggio unitario può comprendere ulteriori eccipienti, quali



almeno un sale fosfato o almeno un sale inorganico e/o insieme ad altro materiale non riutilizzabile che può non essere considerato né ingrediente né confezionamento (quale un guscio per capsule, per esempio). Il termine dosaggio unitario può anche comprendere un confezionamento non riutilizzabile (specialmente quando ciascun prodotto farmaceutico è confezionato singolarmente). I dosaggi unitari possono anche comprendere composizioni farmaceutiche solide ricostituite delle presenti invenzioni.

5

Per un dosaggio unitario esemplare, in quanto segue viene delineato un calcolo dei rapporti molari dei componenti in questo dosaggio unitario.

		Composizione	Massa molare	Mol (media)	Forma
$C_9H_{16}N_6O_2$	Composto di formula (i)	650 ± 60 mg	240,27 g/mol	0,0027053	solido
$C_9H_{14}N_6O_2$	Composto di formula (ii)	650 ± 60 mg	238,26 g/mol	0,0027282	solido
H_2O	Acqua di cristallizzazione	140 ± 30 mg	18,02 g/mol	0,0077691	
$NaCl$	Cloruro di sodio	350 ± 30 mg	58,44 g mol ⁻¹	0,005989	sale
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	Idrogenofosfato di sodio diidrato	70 ± 7 mg	177,99 g/mol	0,0003932	solido diidrato
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	Idrogenofosfato di sodio diidrato	$16,5 \pm 2$ mg	156,01 g/mol	0,0001057	solido diidrato

$$\text{Rapporto molare tra } n_{NaCl}/n_{\text{composto(i)}} = 0,005989 \text{ mol}/0,0027053 \text{ mol} \sim 2,214$$

$$\text{Rapporto molare tra } n_{NaCl}/n_{\text{composto(ii)}} = 0,005989 \text{ mol}/0,0027282 \text{ mol} \sim 2,195$$

$$10 \quad \text{Rapporto molare tra } n_{Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O} + n_{NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O} / n_{\text{composto(i)}} = 0,0003932 \text{ mol} + 0,0001057 \text{ mol} / 0,0027053 \text{ mol} \sim 0,18$$

$$\text{Rapporto molare tra } n_{Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O} + n_{NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O} / n_{\text{composto(ii)}} = 0,0003932 \text{ mol} + 0,0001057 \text{ mol} / 0,0027282 \text{ mol} \sim 0,18$$

$$\text{Rapporto molare tra } n_{Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O} / n_{\text{composto(i)}} = 0,0003932 \text{ mol} / 0,0027053 \text{ mol} \sim 0,145$$



Rapporto molare tra $n_{\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}}/n_{\text{composto(ii)}} = 0,0003932 \text{ mol}/0,0027282 \text{ mol} \sim 0,144$

Rapporto molare tra $n_{\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}}/n_{\text{composto(i)}} = 0,0001057 \text{ mol}/0,0027053 \text{ mol} \sim 0,038$

Rapporto molare tra $n_{\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}}/n_{\text{composto(ii)}} = 0,0001057 \text{ mol}/0,0027282 \text{ mol} \sim 0,038$

$$n_{\text{composto(i)}} = m_{\text{composto(i)}}/M_{\text{composto(i)}} = 0,710 \text{ g}/240,27 \text{ g mol}^{-1} = 0,002955 \text{ mol}$$

$$n_{\text{composto(ii)}} = m_{\text{composto(ii)}}/M_{\text{composto(ii)}} = 0,590 \text{ g}/240,27 \text{ g mol}^{-1} = 0,0024556 \text{ mol}$$

$$n_{\text{composto(i)}} = m_{\text{composto(i)}}/M_{\text{composto(i)}} = 0,650 \text{ g}/240,27 \text{ g mol}^{-1} = 0,0027053 \text{ mol}$$

$$n_{\text{composto(ii)}} = m_{\text{composto(ii)}}/M_{\text{composto(ii)}} = 0,710 \text{ g}/238,25 \text{ g mol}^{-1} = 0,00298 \text{ mol}$$

$$n_{\text{composto(ii)}} = m_{\text{composto(ii)}}/M_{\text{composto(ii)}} = 0,590 \text{ g}/238,25 \text{ g mol}^{-1} = 0,0024763 \text{ mol}$$

$$n_{\text{composto(ii)}} = m_{\text{composto(ii)}}/M_{\text{composto(ii)}} = 0,650 \text{ g}/238,25 \text{ g mol}^{-1} = 0,0027282 \text{ mol}$$

$$n_{\text{NaCl}} = m_{\text{NaCl}}/M_{\text{NaCl}} = 0,380/58,44 \text{ g mol}^{-1} = 0,0065023 \text{ mol}$$

$$n_{\text{NaCl}} = m_{\text{NaCl}}/M_{\text{NaCl}} = 0,320/58,44 \text{ g mol}^{-1} = 0,0054757 \text{ mol}$$

$$n_{\text{NaCl}} = m_{\text{NaCl}}/M_{\text{NaCl}} = 0,350/58,44 \text{ g mol}^{-1} = 0,005989 \text{ mol}$$

$$n_{\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}} = m_{\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}}/M_{\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}} = 0,077 \text{ g}/177,99 \text{ g mol}^{-1} = 0,0004326 \text{ mol}$$

$$n_{\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}} = m_{\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}}/M_{\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}} = 0,063 \text{ g}/177,99 \text{ g mol}^{-1} = 0,0003539 \text{ mol}$$

$$n_{\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}} = m_{\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}}/M_{\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}} = 0,07 \text{ g}/177,99 \text{ g mol}^{-1} = 0,0003932 \text{ mol}$$

$$n_{\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}} = m_{\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}}/M_{\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}} = 0,0185 \text{ g}/156,01 \text{ g mol}^{-1} = 0,0001185 \text{ mol}$$

$$n_{\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}} = m_{\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}}/M_{\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}} = 0,0145 \text{ g}/156,01 \text{ g mol}^{-1} = 0,0000929 \text{ mol}$$

$$n_{\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}} = m_{\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}}/M_{\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}} = 0,0165 \text{ g}/156,01 \text{ g mol}^{-1} = 0,0001057 \text{ mol}$$

$$n_{\text{H}_2\text{O}} = m_{\text{H}_2\text{O}}/M_{\text{H}_2\text{O}} = 0,17 \text{ g}/18,02 \text{ g mol}^{-1} = 0,0094339 \text{ mol}$$

$$n_{\text{H}_2\text{O}} = m_{\text{H}_2\text{O}}/M_{\text{H}_2\text{O}} = 0,11 \text{ g}/18,02 \text{ g mol}^{-1} = 0,0061043 \text{ mol}$$

$$n_{\text{H}_2\text{O}} = m_{\text{H}_2\text{O}}/M_{\text{H}_2\text{O}} = 0,14 \text{ g}/18,02 \text{ g mol}^{-1} = 0,0077691 \text{ mol}$$

In breve, un dosaggio unitario contiene $650 \pm 60 \text{ mg}$ della base libera di 4-ammino-7,8-diidro-L-biopterina e/o di 4-ammino-(6R,S)-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina, $140 \pm 30 \text{ mg}$ di acqua di cristallizzazione, $70 \pm 7 \text{ mg}$ di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $16,5 \pm 2 \text{ mg}$ di $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, e $350 \pm 30 \text{ mg}$ di NaCl . In forme di realizzazione tipiche, questo dosaggio unitario si riferisce a e viene confezionato per la somministrazione in una fiala da 50 ml poiché dopo la



ricostituzione con un volume di 50 ml di veicolante farmaceuticamente accettabile quale acqua per iniezioni vengono ottenute un'infusione o una soluzione per iniezione che possono essere immediatamente somministrate. Così, se per esempio, viene utilizzato un dosaggio unitario differente, per esempio una fiala da 30 ml, la quantità di tutti i componenti della composizione viene regolata di conseguenza. Nell'esempio di una fiala da 30 ml, la quantità di ciascun componente sarebbe ridotta a 3/5 (60%). Ciò significa che un dosaggio unitario da 30 ml conterrà 390 ± 36 mg della base libera di 4-ammino-7,8-diidro-L-biopterina e/o di 4-ammino-(6R,S)-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina, 84 ± 18 mg di acqua di cristallizzazione, $42 \pm 4,2$ mg di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, $9,9 \pm 1,2$ mg di $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, e 210 ± 18 mg di NaCl.

La composizione farmaceutica della presente invenzione può comprendere anche ulteriori molecole, per esempio, composti correlati generati durante il procedimento di produzione della composizione farmaceutica della presente invenzione. Così, la composizione farmaceutica della presente invenzione può comprendere 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, o più ulteriori composti. Questi ulteriori composti possono essere scelti tra uno o più dei composti compreso, ma non limitato a, il gruppo consistente di 4-ammino-7,8-diidro-L-biopterina (che può essere generata mediante ossidazione spontanea di 4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina, si veda sopra), 4-ammino-L-biopterina, (6R,S)-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina, 1-[(6R,S)-2,4-diammino-5,6,7,8-tetraidropteridin-6-il]propanolo, 1-[(6R,S)-2,4-diammino-5,6,7,8-tetraidropteridin-6-il]propano, (1R,2S)-1-[(6R,S)-2-(acetilammino)-4-ammino-5,6,7,8-tetraidropteridin-6-il]-1,2-diacetossipropano, 2,4-diammino-7,8-diidropteridina, o 2,4-diamminopteridina, per citare alcuni composti esemplificativi.

Come descritto sopra, è stato mostrato che derivati della pteridina esibiscono proprietà differenti da quelle di altri inibitori di NO, rendendo il composto potenzialmente più adatto rispetto agli analoghi "classici" dell'arginina. Così, la presente invenzione riguarda anche un uso di una composizione farmaceutica liofilizzata della presente invenzione per il trattamento di una malattia. In alcune forme di realizzazione, la malattia viene scelta nel gruppo consistente di danno cerebrale traumatico, danno cerebrale non traumatico, preferibilmente ictus o meningite, pressione cranica elevata, danno cerebrale secondario.

Il termine "danno cerebrale traumatico" o "trauma cranico" si verifica quando una forza esterna danneggia in modo traumatico il cervello. Il TBI può essere classificato sulla base della gravità, del meccanismo (danno cerebrale



chiuso o penetrante), o altre caratteristiche (per esempio, che interessa una posizione specifica o un'area molto estesa). Un danno cerebrale traumatico può avvenire come conseguenza di un impatto focale sulla testa, mediante una rapida accelerazione/decelerazione all'interno del cranio o mediante una combinazione complessa sia di movimento sia di impatto rapido, così come onde d'urto, o penetrazione da parte di un proiettile. La scala del coma Glasgow (SCG), il sistema più comunemente utilizzato per classificare la gravità del TBI, classifica il livello di coscienza di una persona su una scala di 3-15 sulla base di reazioni verbali, motorie, e di apertura degli occhi a stimoli. In generale, si conviene che un TBI con una SCG di 13 o superiore sia lieve, di 9-12 sia moderato, e di 8 o inferiore sia grave. Sistemi simili esistono per bambini piccoli. Dal punto di vista diagnostico, si distingue ulteriormente tra TBI aperti e chiusi. Un TBI aperto è considerato essere un danno in cui le meningi cerebrali (dura madre) sono meccanicamente distrutte ed il cervello è a contatto con l'ambiente attraverso questa apertura. Spesso, un TBI aperto è associato all'uscita di liquido e di detriti di tessuto cerebrale. In un TBI chiuso il cranio, o scatola cranica, rimane intatto, e il danno principale del cervello (trauma) è caratterizzato da lesioni locali quali contusioni o ematomi e/o danno tissutale cerebrale diffuso. Il termine "cranio" quando indicato qui è l'insieme dello scheletro della testa osseo e cartilagineo esistente del neurocranio (scatola cranica) e del viscerocranio (craniofacciale) dei vertebrati. "Intracranico" significa all'interno del cranio.

Al contrario, un "danno cerebrale non traumatico" non implica resistenza meccanica esterna per acquisire un danno cerebrale. Le cause per un danno cerebrale non traumatico possono includere mancanza di ossigeno, glucosio o sangue. Le infezioni possono causare encefalite (rigonfiamento del cervello), meningite (rigonfiamento delle meningi) o tossicità cellulare, come per esempio causata da insufficienza epatica fulminante, come possono comportare tumori o veleni. Queste infezioni possono avvenire attraverso ictus, attacco cardiaco, quasi soffocamento, strangolamento o coma diabetico, avvelenamento o altre cause chimiche quali abuso di alcol o sovradosaggio di farmaci, infezioni o tumori e condizioni degenerative quali la malattia di Alzheimer e la malattia di Parkinson. Una malattia neurodegenerativa acuta è rappresentata da "ictus", che si riferisce alla perdita della funzione cerebrale a causa di disturbi nell'afflusso di sangue al cervello, specialmente quando si verifica velocemente, ed è spesso associata alla malattia cerebrovascolare. Questo può avvenire a seguito di ischemia (mancanza di flusso sanguigno) causata da blocco (trombosi, embolia arteriosa), o di



un'emorragia del sistema nervoso centrale (SNC), o di vasi sanguigni intracranici. Di conseguenza, l'area affetta del cervello non può funzionare normalmente.

Un'altra malattia che può essere trattata è la "meningite", che è un'infezione acuta delle membrane che rivestono il cervello ed il midollo spinale, note collettivamente come meningi. L'infezione può essere causata da
5 infezione con virus, batteri, o altri microrganismi, e meno comunemente da certi farmaci.

Oltre alla lesione causata al momento del danno, il trauma cranico (danno cerebrale non traumatico o traumatico) causa "danno secondario" o "danno cerebrale secondario", che si riferisce ad una varietà di eventi che hanno luogo nei minuti e nei giorni dopo il danno. Questi procedimenti, che includono alterazioni nel flusso di sangue cerebrale e nella pressione all'interno del cranio, contribuiscono sostanzialmente alla lesione dal danno iniziale. Gli eventi di danno
10 secondario possono includere per esempio danno alla barriera ematoencefalica, rilascio di fattori che causano infiammazione, sovraccarico di radicali liberi, rilascio eccessivo del neurotrasmettitore glutammato (eccitotossicità), affluenza di ioni calcio e sodio nei neuroni, e disfunzione dei mitocondri. Gli assoni danneggiati nella sostanza bianca cerebrale possono separarsi dai loro corpi cellulari come risultato di danno secondario, uccidendo potenzialmente quei neuroni. Altri fattori nel danno secondario sono variazioni nel flusso sanguigno al cervello, alterazione dell'integrità
15 transitoria ripetuta della barriera ematoencefalica, ischemia (flusso sanguigno insufficiente), ipossia cerebrale (insufficiente ossigeno nel cervello), edema cerebrale (rigonfiamento del cervello), e pressione intracranica (la pressione all'interno del cranio) aumentata.

Può anche essere che la pressione intracranica possa alzarsi a causa di rigonfiamento o dell'effetto di una massa da una lesione, quale emorragia. Di conseguenza, la pressione di perfusione cerebrale (la pressione del flusso sanguigno
20 nel cervello) è ridotta; ne risulta ischemia. Quando la pressione all'interno del cranio aumenta troppo, questo può causare morte cerebrale o erniazione, in cui parti del cervello vengono compresse da strutture nel cranio. Il termine "pressione intracranica" (PIC) significa la pressione all'interno del cranio e così nel tessuto cerebrale e nel fluido cerebrospinale (FCS). L'organismo ha vari meccanismi mediante i quali mantiene la PIC stabile, con pressioni dell'FCS variabili di circa
25 1 mmHg negli adulti normali attraverso variazioni nella produzione e nell'assorbimento di FCS. La PIC viene misurata in millimetri di mercurio (mmHg) e, a riposo, è normalmente 7-15 mmHg per un adulto supino. Le variazioni nella PIC



sono attribuite a variazioni del volume in uno o più dei compartimenti contenuti nel cranio. Una “pressione elevata nel cranio” o una “pressione intracranica elevata” significa una pressione aumentata nel cranio di un soggetto rispetto ad un soggetto normale sano. Poiché la pressione intracranica è normalmente tra 7-15 mmHg; allora 20-25 mmHg, il limite superiore del normale, è già considerata una pressione intracranica elevata e può essere richiesto un trattamento per ridurre questa pressione. Così, poiché la pressione intracranica elevata può essere considerata qualsiasi pressione superiore a 20 mmHg nel cranio di un soggetto supino, preferibilmente una pressione è superiore a 25 mmHg, superiore a 26 mmHg, superiore a 27 mmHg, superiore a 28 mmHg, superiore a 29 mmHg, superiore a 30 mmHg, superiore a 31 mmHg, superiore a 32 mmHg, superiore a 33 mmHg, superiore a 34 mmHg o superiore a 35 mmHg.

10 Secondo questa linea, nel contesto della presente invenzione viene ulteriormente descritto l'uso della composizione farmaceutica liofilizzata della presente invenzione nella preparazione di un medicamento per trattare un soggetto avente una lesione cranica chiusa, una pressione cranica elevata e un danno cerebrale secondario. Un “danno cranico chiuso” quando indicato qui significa un tipo di danno cerebrale traumatico in cui il cranio e la dura madre rimangono intatti (si veda anche sopra).

15 Inoltre, descritto nel contesto della presente invenzione è un metodo per trattare una malattia in un soggetto, comprendente la fase di somministrare una composizione farmaceutica liofilizzata della presente invenzione ad un soggetto che lo richiede.

20 Per la somministrazione, il medico curante ed i fattori clinici determineranno il regime di dosaggio. Com'è ben noto nell'arte medica, i dosaggi per un qualsiasi paziente dipendono da molti fattori, compresi la statura del paziente, l'area superficiale corporea, l'età, il particolare composto da somministrare, il sesso, il tempo e la via di somministrazione, lo stato di salute generale, ed altri farmaci che vengono somministrati simultaneamente. Una dose giornaliera tipica può essere, per esempio, nell'intervallo da 2,5 mg/kg a 12,5 mg/kg di peso corporeo; tuttavia, sono previste dosi anche inferiori o superiori a questo intervallo esemplare, specialmente considerando i suddetti fattori.

25 I dosaggi vengono preferibilmente somministrati una volta al giorno per al massimo 4 giorni, tuttavia, durante la progressione del trattamento i dosaggi possono essere somministrati in intervalli di tempo molto più lunghi e nel bisogno possono essere somministrati in intervalli di tempo molto più brevi, per esempio, al giorno. In un caso preferito



la risposta immunitaria viene monitorata utilizzando metodi descritti qui ed ulteriori metodi noti a coloro che sono esperti nell'arte e i dosaggi vengono ottimizzati, per esempio, in tempo, quantità e/o composizione. I dosaggi varieranno ma un dosaggio preferito per la somministrazione endovenosa del composto (I) e/o del composto (II) è da approssimativamente 2,5 mg/kg a 12,5 mg/kg di peso corporeo al giorno.

5 Se il regime è un'iniezione o un'infusione a breve termine continua, esso dovrebbe essere anche nell'intervallo da circa 1 µg a circa 1 mg di unità per chilogrammo di peso corporeo per minuto, rispettivamente. Il progresso può essere monitorato mediante la valutazione periodica.

10 Possono facoltativamente essere impiegati saggi in vitro per aiutare ad identificare gli intervalli di dosaggio ottimali. La dose precisa da impiegare nella formulazione dipenderà anche dalla via di somministrazione e dalla gravità della malattia, e dovrebbe essere decisa secondo il giudizio del medico e le circostanze di ciascun paziente. Dosi efficaci possono essere estrapolate da curve di risposta in base alla dose derivate da sistemi di test in vitro o su modelli animali. Preferibilmente, la composizione farmaceutica viene somministrata direttamente o in combinazione con un adiuvante.

15 La dose giornaliera massima (DGM) è basata sulla quantità del composto (I) e/o (II), che tipicamente viene utilizzato per la principale indicazione dei soggetti (per esempio adulti) al giorno. Tuttavia, il regime di dosaggio può differire dalle iniezioni alle infusioni o anche iniezioni e/o infusioni multiple al giorno. In alcune forme di realizzazione, nel metodo per trattare una malattia in un soggetto la dose massima giornaliera è 12,5 mg/kg di peso corporeo, preferibilmente 12,5, 11,5, 10,5, 9,5, 8,5, 7,5, 6,5, 5,5, 4,5, 3,5, 2,5 mg/kg di peso corporeo. In alcune forme di realizzazione, la dose giornaliera massima è 10,0, 9,0 o preferibilmente 8,5 mg/kg di peso corporeo, o anche inferiore quale 7,5, 5,0, 2,5 mg/kg di peso corporeo.

20 Come utilizzato qui, un intervallo che viene definito come "da X a Y" corrisponde ad un intervallo che viene definito come "tra X e Y". Entrambi gli intervalli includono specificamente il limite superiore ed anche il limite inferiore. Questo significa che per esempio un intervallo di "da 2,5 mg/kg a 12,5 mg/kg" o "tra 2,5 mg/kg e 12,5 mg/kg" comprende una concentrazione di 2,5, 3,5, 4,5, 5,5, 6,5, 7,5, 8,5, 9,5, 10,5, 11,5 e 12,5 così come qualsiasi valore intermedio dato.



È anche previsto che le composizioni farmaceutiche vengono impiegate in approcci di coterapia, cioè in cosomministrazione con altri medicinali o farmaci, per esempio altri farmaci per prevenire, per trattare o per migliorare malattie quali danno cerebrale traumatico o non traumatico.

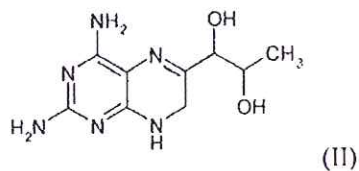
5 “I soggetti” che vengono trattati nella presente invenzione sono preferibilmente mammiferi quali uomo, scimmie, gatti, cani, cavalli, maiali, bovini, topi o ratto, essendo preferito l'uomo.

La presente invenzione prevede anche un metodo per preparare una composizione farmaceutica solida liofilizzata comprendente

a) un composto avente la formula (I):



10 e/o un composto avente la formula (II):

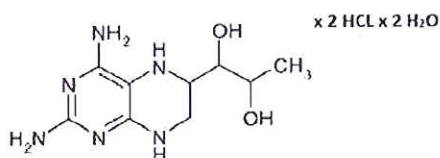


e

b) almeno un sale fosfato;

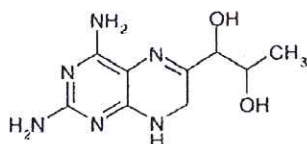
il metodo comprendendo:

15 aa) sciogliere il composto di formula (I) e/o (II):



(III),

o



(II)

con un tampone, in cui il tampone comprende il fosfato; e

5 bb) liofilizzare la soluzione ottenuta in aa).

In questo contesto, è indicato che mentre il composto di formula (II) è facilmente disponibile come tale da sintesi, il prodotto di sintesi tipico del composto di formula (I) è il suo dicloridrato diidrato mostrato nella formula (III). Per questa ragione, nel metodo per preparare una composizione solida dell'invenzione che contiene il composto di formula (I), 4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina, il materiale di partenza è tipicamente 4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-

10 biopterina dicloridrato diidrato, il composto di formula (III).

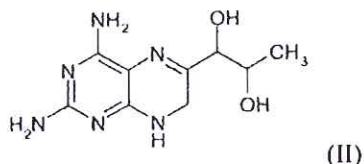
Inoltre, la presente invenzione riguarda inoltre un metodo per preparare una composizione farmaceutica solida liofilizzata comprendente

a) un composto avente la formula (I):



(I)

e/o un composto avente la formula (II):

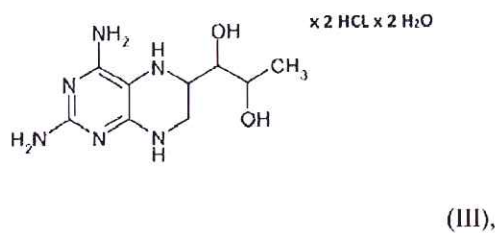


e

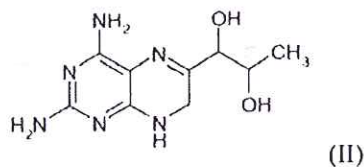
b) almeno un acido inorganico, preferibilmente NaCl;

5 il metodo comprendendo:

aa) sciogliere il composto di formula (III) e/o di formula (II):



o



10 con un tampone;

bb) liofilizzare la soluzione ottenuta in aa).

Il tampone come descritto in aa) viene utilizzato per sciogliere il composto di formula (III) e/o di formula (II) a dare una soluzione di composto-tampone. Un tampone, in generale, è una soluzione che contiene un acido debole (o una base) ed il sale di quell'acido debole (o di quella base). Inoltre, esso resiste a variazioni nel pH quando vi vengono aggiunte

15 piccole quantità di un acido o di una base. Vari fosfati possono formare diverse combinazioni di tamponi differenti. Tre



possibili fosfati di sodio possono includere NaH_2PO_4 - diidrogenofosfato di sodio, Na_2HPO_4 - idrogenofosfato di disodio, Na_3PO_4 - fosfato di sodio.

Il tampone in aa) può anche essere un tampone idrogeno fosfato di sodio comprendente almeno un sale fosfato. Un “tampone idrogeno fosfato di sodio” è un tampone comprendente un sale fosfato di sodio. In alcune forme di realizzazione, il tampone fosfato di sodio comprende almeno un sale fosfato di sodio come descritto sopra. In altre forme di realizzazione, il tampone fosfato di sodio comprende 2, 3, 4, 5, o più sali fosfato di sodio, preferibilmente i due differenti sali di fosfato come descritto sopra. In un'altra forma di realizzazione del metodo della presente invenzione, il tampone idrogeno fosfato di sodio viene preparato sciogliendo separatamente $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Il termine “sciogliendo separatamente” significa che la dissoluzione di ciascun fosfato di sodio avviene separatamente l'uno dall'altro, per esempio in recipienti di vetro differenti. In un'ulteriore forma di realizzazione del metodo della presente invenzione, il tampone idrogeno fosfato di sodio ha un pH di 7,4 aggiungendo la soluzione di $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ alla soluzione di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Inoltre il tampone in aa) può comprendere NaOH, tampone idrogeno fosfato di sodio ed acqua. Facoltativamente, l'NaOH è una soluzione 5N di NaOH. Una “soluzione 5N di NaOH” significa una soluzione di NaOH (idrossido di sodio) che ha una normalità di 5 (5N). Se la concentrazione di una soluzione di idrossido di sodio è $c(\text{NaOH}) = 5 \text{ mol/l}$, allora la sua normalità è 5N.

In alcune forme di realizzazione del metodo della presente invenzione il tampone comprende NaOH 5N al 12-16% (p/p), tampone idrogeno fosfato di sodio all'8-12% (p/p) ed acqua per iniezioni al 74-78% (p/p).

In ulteriori forme di realizzazione del metodo della presente invenzione, il tampone ha un pH di circa 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14.

In ancora un'altra forma di realizzazione del metodo della presente invenzione, la soluzione nel passaggio aa) ha un pH di circa 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 11 preferibilmente tra 6,5-7,6, il più preferibilmente circa 7,4.

Il tampone può essere preparato in modi differenti. Per esempio, esso può essere preparato sotto degassamento a dare un tampone degassato. Un “tampone degassato” si riferisce alla rimozione di gas disciolti, per esempio ossigeno, dai liquidi, specialmente acqua o soluzioni acquose. Il far gorgogliare in una soluzione un gas inerte sostituisce i gas



disciolti dannosi e reattivi quali ossigeno e biossido di carbonio. Azoto, argon, elio, ed altri gas inerti vengono comunemente utilizzati. Per completare la sostituzione, la soluzione dovrebbe essere agitata vigorosamente e fatta gorgogliare per lungo tempo. In alcune forme di realizzazione, il tampone viene degassato con azoto finché il contenuto di ossigeno non sia $< 1,0$ ppm (parti per milione).

5 Come ulteriore passaggio addizionale nel metodo, la soluzione ottenuta in aa) può essere sterilizzata mediante filtrazione, preferibilmente con un filtro da $0,22 \mu\text{m}$. La sterilizzazione mediante filtrazione comprende qualsiasi procedimento che elimina (rimuove) o uccide tutte le forme di vita microbica, compresi agenti trasmissibili (quali forme di funghi, batteri, virus, spore, ecc.) presenti su una superficie, contenuti in un fluido, in un medicamento o in una composizione (solida o fluida). Qui, la sterilizzazione viene ottenuta mediante filtrazione. La sterilizzazione può anche
10 essere ottenuta applicando calore, sostanze chimiche, irradiazione, pressione elevata, o loro combinazioni con un passaggio di filtrazione. Il filtro può avere dimensioni dei pori differenti. Di solito, un filtro con una dimensione dei pori di $0,2 \mu\text{m}$ (microfiltrazione) rimuoverà efficacemente i microrganismi. Nella lavorazione delle sostanze biologiche, i virus devono essere rimossi o inattivati per esempio mediante calore o glutaraldeide o simili. Vengono utilizzati nanofiltri con una dimensione dei pori più piccola di $20\text{-}50 \text{ nm}$ (nanofiltrazione). Più piccola è la dimensione dei pori inferiore è la
15 velocità di scorrimento. Per ottenere un volume totale superiore o per evitare un blocco prematuro, potrebbero essere utilizzati prefiltri per proteggere i filtri a membrana con pori piccoli.

In un'altra forma di realizzazione del metodo della presente invenzione dopo la preparazione della composizione farmaceutica; la liofilizzazione è iniziata al massimo 2 h dopo, preferibilmente al massimo 1,5 h dopo, 1 h dopo, 30 min dopo, il più preferibilmente al massimo 15 min dopo.

20 Viene descritta nel contesto della presente invenzione anche una composizione farmaceutica che può essere ottenuta secondo il metodo della presente invenzione.

Per una manipolazione migliore della composizione farmaceutica solida della presente invenzione il liofilizzato ottenuto in bb) o la composizione farmaceutica della presente invenzione vengono utilizzati per riempire delle fiale, preferibilmente in una quantità di circa $1\text{-}1,5 \text{ g}$, preferibilmente circa $1,25 \text{ g}$ di formulazione solida. Quando utilizzati
25 come "dosaggi unitari", la quantità di circa $1\text{-}1,5 \text{ g}$, o preferibilmente di circa $1,25 \text{ g}$ di formulazione solida viene utilizzata

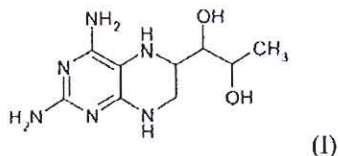
per riempire una fiala da 50 ml. Il termine "fiala" si riferisce ad un (piccolo) recipiente o bottiglia di vetro o di plastica, spesso utilizzato per conservare le composizioni farmaceutiche come liquidi o solidi. Oggigiorno, le fiale sono spesso fatte anche di materie plastiche quali polipropilene o polistirene. Anche qualsiasi altro contenitore adatto può ovviamente essere utilizzato per la conservazione della composizione solida dell'invenzione.

5 Per ottenere una soluzione iniettabile pronta all'uso, il metodo della presente invenzione comprende anche il passaggio di ricostituire il liofilizzato ottenuto in bb) in un fluido farmaceuticamente accettabile per la preparazione di una soluzione iniettabile. Il termine "soluzione iniettabile" si riferisce ad una soluzione che può essere utilizzata per la somministrazione endovenosa, preferibilmente per iniezione o per infusione (si veda anche sopra la descrizione per l'iniezione). Una soluzione iniettabile comprende un fluido farmaceuticamente accettabile.

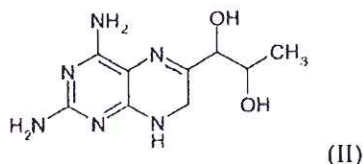
10 La presente invenzione è ulteriormente caratterizzata dal seguente elenco di punti:

Punto 1. Una composizione farmaceutica solida comprendente

a) un composto avente la formula (I):



e/o un composto avente la formula (II):



15

e

b) almeno un sale fosfato.

Punto 2. La composizione farmaceutica del punto 1, in cui almeno un sale fosfato è un fosfato di sodio, un fosfato di potassio o un fosfato d'ammonio.



Punto 3. La composizione farmaceutica del punto 2, in cui il sale fosfato viene scelto nel gruppo consistente di Na_2HPO_4 (privo di acqua), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, NaH_2PO_4 (privo di acqua), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 (privo di acqua) $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 (privo di acqua) e loro miscele.

5 Punto 4. La composizione farmaceutica del punto 2, in cui il sale fosfato è $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ed in cui la quantità di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ presente nella composizione viene scelta in modo tale che il rapporto molare di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ rispetto al composto (I) o al composto (II) vari da 0,04 a 0,4.

Punto 5. La composizione farmaceutica del punto 2, in cui il fosfato di sodio è $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ed in cui la quantità di $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ presente nella composizione viene scelta in modo tale che il rapporto molare di $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ rispetto al composto (I) o al composto (II) vari da 0,01 a 0,09.

10 Punto 6. La composizione farmaceutica di qualsiasi dei punti 1-5, comprendente due sali fosfato di sodio differenti.

Punto 7. La composizione farmaceutica del punto 6, in cui i due sali fosfato di sodio differenti sono $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

15 Punto 8. La composizione farmaceutica del punto 7, in cui la quantità di $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ presente nella composizione viene scelta in modo tale che il rapporto molare sia di $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sia di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ rispetto al composto (I) o al composto (ii) vari da 0,02 a 0,5.

Punto 9. La composizione farmaceutica di qualsiasi dei punti 1-8, in cui il composto (I) e/o il composto (II) sono presenti come base libera.

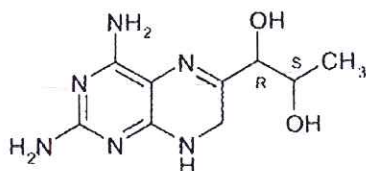
20 Punto 10. La composizione farmaceutica di qualsiasi dei punti 1-9, in cui la composizione farmaceutica è una composizione farmaceutica liofilizzata.

Punto 11. La composizione farmaceutica di qualsiasi dei punti 1-10, in cui il composto (I) è un composto avente la formula (Ia):



(Ia).

Punto 12. La composizione farmaceutica di qualsiasi dei punti 1-11, in cui il composto (II) è un composto avente la formula (IIa):



(IIa).

5 Punto 13. La composizione farmaceutica di qualsiasi dei punti 1-12, in cui la composizione farmaceutica comprende un ulteriore eccipiente farmaceutico.

Punto 14. La composizione farmaceutica del punto 13, in cui l'ulteriore eccipiente farmaceutico è un sale inorganico.

10 Punto 15. La composizione farmaceutica del punto 14, in cui il sale inorganico viene scelto tra $MgCl_2$, $CaCl_2$, NH_4Cl , KCl , o $NaCl$.

Punto 16. La composizione farmaceutica del punto 15, in cui il sale inorganico è $NaCl$.

Punto 17. La composizione farmaceutica del punto 16, in cui la quantità di $NaCl$ presente nella composizione viene scelta in modo tale che il rapporto molare di $NaCl$ rispetto al composto (I) o al composto (II) vari da 1,5 a 4, preferibilmente da 1,8 a 3,7.

15 Punto 18. La composizione farmaceutica di qualsiasi dei punti 1-17, in cui la composizione comprende inoltre acqua di cristallizzazione.

Punto 19. La composizione farmaceutica di qualsiasi dei punti 1-18, in cui la composizione è adatta per essere ricostituita in acqua.



Punto 20. La composizione farmaceutica di qualsiasi dei punti 1-19, in cui la composizione è adatta per una somministrazione mediante infusione o iniezione.

Punto 21. La composizione farmaceutica di qualsiasi dei punti 1-20, in cui il composto (I) è (6R)-4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina.

5 Punto 22. La composizione farmaceutica di qualsiasi dei punti 1-21, in cui il composto (I) è (6S)-4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina.

Punto 23. La composizione farmaceutica di qualsiasi dei punti 1-22, in cui il composto (I) è una miscela diastereoisomerica che comprende più (6R)-4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina rispetto a (6S)-4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina.

10 Punto 24. La composizione farmaceutica del punto 23, in cui la quantità della (6R)-4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina e della (6S)-4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina viene scelta in modo tale che il rapporto della quantità di (6R)-4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina rispetto alla (6S)-4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina vari da 0,5 a 2, preferibilmente attorno a 1,3.

15 Punto 25. La composizione farmaceutica di qualsiasi dei punti 1-24, in cui un dosaggio unitario della composizione contiene 650 ± 60 mg della base libera di 4-ammino-(6R,S)-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina, 140 ± 30 mg di acqua di cristallizzazione, 70 ± 7 mg di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $16,5 \pm 2$ mg di $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, e 350 ± 30 mg di NaCl.

20 Punto 26. La composizione di qualsiasi dei punti 1-25, in cui la composizione comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, o più ulteriori composti, in cui gli ulteriori composti vengono scelti nel gruppo consistente di uno o più dei composti scelti nel gruppo consistente di 4-ammino-L-biopterina, (6R,S)-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina, 1-[(6R,S)-2,4-diammino-5,6,7,8-tetraidropteridin-6-il]propanolo, 1-[(6R,S)-2,4-diammino-5,6,7,8-tetraidropteridin-6-il]propano, (1R,2S)-1-[(6R,S)-2-(acetilammino)-4-ammino-5,6,7,8-tetraidropteridin-6-il]-1,2-diacetossipropano, 2,4-diammino-7,8-diidropteridina, 2,4-diamminopteridina.

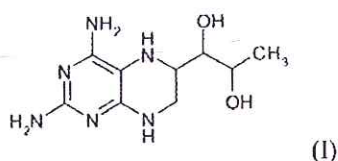
Punto 27. Una composizione farmaceutica liofilizzata di qualsiasi dei punti da 1 a 26 per uso nel trattamento di una malattia.



Punto 28. La composizione farmaceutica liofilizzata per uso del punto 27, in cui la malattia viene scelta nel gruppo consistente di danno cerebrale traumatico, danno cerebrale non traumatico, preferibilmente infarto o meningite, pressione cranica elevata, danno cerebrale secondario.

Punto 29. Un metodo per preparare una composizione farmaceutica solida liofilizzata comprendente

5 a) un composto avente la formula (I):



e/o un composto avente la formula (II):

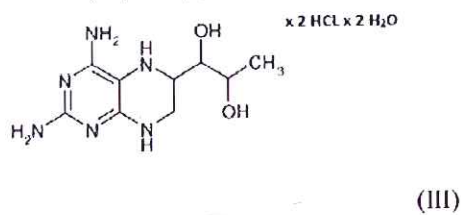


e

10 b) almeno un sale fosfato;

il metodo comprendendo:

aa) sciogliere il composto di formula (III) e/o (II):



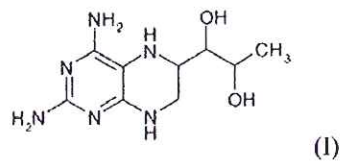
con un tampone, in cui il tampone comprende il fosfato;

15 bb) liofilizzare la soluzione ottenuta in aa).

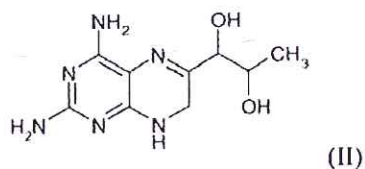


Punto 30. Un metodo per preparare una soluzione iniettabile comprendente:

a) un composto avente la formula (I):



e/o un composto avente la formula (II):



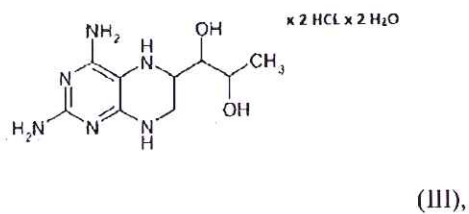
5

e

b) almeno un sale fosfato e facoltativamente NaCl;

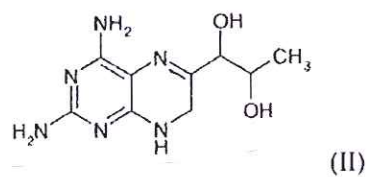
il metodo comprendendo:

aa) sciogliere il composto di formula (III) e/o (II):



10

o





con un tampone, in cui il tampone comprende il fosfato;

bb) liofilizzare la soluzione ottenuta in aa);

5 cc) ricostituire il liofilizzato ottenuto in bb) in un fluido farmaceuticamente accettabile per la preparazione di una soluzione iniettabile, in cui il liofilizzato ottenuto in bb) viene utilizzato per riempire una fiala, preferibilmente una fiala da 50 ml, preferibilmente in una quantità di circa 1-1,5 g, preferibilmente 1,25 g della formulazione solida.

Punto 31. Il metodo del punto 29 o 30, in cui il tampone in aa) è un tampone idrogeno fosfato di sodio comprendente almeno un sale fosfato.

Punto 32. Il metodo di qualsiasi dei punti 29-31, in cui il tampone in aa) comprende NaOH, tampone idrogeno fosfato di sodio ed acqua.

10 Punto 33. Il metodo del punto 31, in cui l'NaOH è una soluzione 5N di NaOH.

Punto 34. Il metodo del punto 31 in cui il tampone idrogenofosfato di sodio viene preparato sciogliendo separatamente $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Punto 35. Il metodo del punto 33 in cui il tampone idrogenofosfato di sodio ha un pH di 7,4 aggiungendo la soluzione di $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ alla soluzione di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

15 Punto 36. Il metodo di qualsiasi dei punti 29-35, in cui il tampone comprende NaOH 5N al 12-16% (p/p), tampone idrogenofosfato di sodio all'8-12% (p/p) ed acqua per iniezioni al 74-78% (p/p).

Punto 37. Il metodo di qualsiasi dei punti 29-36, in cui la soluzione ottenuta in aa) viene sterilizzata mediante filtrazione, preferibilmente con un filtro da 0,22 μm .

Punto 38. Il metodo di qualsiasi dei punti 29-37, in cui il tampone ha un pH di circa 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14.

20 Punto 39. Il metodo di qualsiasi dei punti 29-38, in cui la soluzione nel passaggio aa) ha un pH di circa 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 11, preferibilmente tra 6,5-7,6, il più preferibilmente 7,4.

Punto 40. Il metodo di qualsiasi degli articoli 29-39, in cui il liofilizzato ottenuto in bb) viene utilizzato per riempire fiale, preferibilmente in una quantità di circa 1-1,5 g, preferibilmente 1,25 g di formulazione solida.

Punto 41. Il metodo di qualsiasi dei punti 29-40, in cui il tampone viene preparato con tampone degassato.



Punto 42. Il metodo di qualsiasi degli articoli 29-41, in cui il tampone viene degassato con azoto finché il contenuto di ossigeno non sia $< 1,0$ ppm.

Punto 43. Il metodo di qualsiasi degli articoli 29-42, in cui, dopo la preparazione della soluzione, la liofilizzazione viene iniziata al massimo 2 h dopo.

5 ESEMPI

Gli esempi seguenti illustrano ulteriormente l'invenzione. Questi esempi non dovrebbero tuttavia essere intesi come limitanti l'ambito di questa invenzione. Gli esempi sono inclusi a scopo illustrativo e la presente invenzione è limitata solo dalle rivendicazioni.

Esempio 1 - Descrizione del procedimento di produzione

10 VAS203 viene preparato in una sintesi multipassaggio a partire da L-biopterina disponibile in commercio. Uno schema del procedimento viene mostrato nella Figura 1. La sintesi di VAS203 è basata sulle pubblicazioni W. Pfeleiderer et al. in Pteridines 1989, 1, 199-210 e Pteridines 1995, 6, 1-7.

15 Lo scopo della prima fase di sviluppo è stato di riprodurre le procedure di letteratura e stimare la loro fattibilità per una scala multi-grammo. La purificazione degli intermedi mediante cromatografia flash è stata eliminata e sostituita con fasi di precipitazione o di cristallizzazione. Inoltre, sono state eseguite adozioni sui rapporti molarli dei reagenti e condizioni di reazione, in modo tale che fosse disponibile un procedimento robusto per l'intermedio MAE 119 (4-ammino-L-biopterina).

20 È stato problematico stabilire una via robusta ed attendibile per l'idrogenazione di MAE 119 a VAS203, utilizzando PtO₂ come catalizzatore. Sono stati testati differenti solventi e mezzi acquosi a valori di pH differenti, ma solo quando è stato utilizzato acido cloridrico diluito è stato possibile ottenere risultati veloci e riproducibili, specialmente sul rapporto diastereoisomerico della sostanza farmaceutica. È stato possibile ridurre drasticamente la quantità totale di massa di platino residua mediante preidrogenazione del catalizzatore ossido di platino (IV), quindi il rapporto diastereoisomerico è cambiato leggermente. La lavorazione della soluzione acida di VAS203 si è dimostrata essere difficile, poiché l'evaporazione semplice dell'acqua a pressione ridotta ha lasciato un residuo simile a vetro. Il progresso è stato ottenuto
25 quando è stato utilizzato 2-propanolo come cosolvente per il procedimento di evaporazione. Questa procedura ha dato un



solido, ma sfortunatamente il 2-propanolo viene incorporato in questo solido. Mediante condizioni di essiccamento convenzionali non è stato possibile ridurre la quantità di 2-propanolo residuo a meno del 5% (p/p). Per superare questo problema, può essere incluso un passaggio di liofilizzazione finale per generare VAS203. I singoli lotti possono essere raggruppati per fornire quantità superiori.

5 La prova per l'assegnazione strutturale di VAS203 è stata fornita dalla via di sintesi, supportata dall'analisi elementare, dalla risonanza magnetica nucleare ($^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$), dalla spettroscopia UV e IR (dati non mostrati).

Esempio 2

Descrizione e composizione del prodotto farmaceutico

10 VAS203 sarà fornito come polvere liofilizzata sterile, da bianco a rosso chiaro o marrone, contenuta in fiale di vetro da 50 ml sotto azoto come atmosfera protettiva. Ciascuna fiala contiene 650 ± 60 mg della base libera di 4-ammino-(6R,S)-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina e 140 ± 30 mg di acqua di cristallizzazione. Inoltre, le fiale contengono 350 ± 30 mg di cloruro di sodio (NaCl), 70 ± 7 mg di idrogenofosfato di disodio diidrato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), e $16,5 \pm 2$ mg di idrogenofosfato di disodio diidrato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). I limiti di tolleranza della composizione del prodotto farmaceutico sono relativamente elevati ($\pm 10\%$). La ragione per questo è la variazione del contenuto di cloridrato di VAS203. Il
15 contenuto di cloridrato di VAS203 varia da lotto a lotto fino al 10% (da 2,03 HCl a 2,24 HCl). Durante la preparazione del prodotto farmaceutico, il cloridrato è stato neutralizzato nella presente invenzione mediante l'aggiunta di idrossido di sodio e tampone sodio-fosfato per ottenere una soluzione isotonica con un valore di pH fisiologico. Quindi, anche il contenuto delle molecole generate durante la neutralizzazione (cloruro di sodio, idrogenofosfato di disodio e diidrogenofosfato di sodio) varia in base al contenuto di cloridrato del rispettivo lotto di VAS203. I limiti dati della
20 tolleranza sono necessari per soddisfare le specifiche dei parametri di qualità pertinenti pH e osmolalità. La composizione qualitativa di fiale da 1 g di VAS203 è elencata nella Tabella 2.



Tabella 2

Componente	Riferimento a standard	Funzione
4-ammino-(6R,S)-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina	interno	principio attivo
cloruro di sodio*	farmacopea europea	osmolarità
idrogenofosfato di sodio diidrato	farmacopea europea	tampone
diidrogenofosfato di sodio diidrato	farmacopea europea	tampone
acqua per iniezioni (acqua per iniezioni)	farmacopea europea	solvente utilizzato per ricostituzione
azoto	Farmacopea europea	atmosfera protettiva
* Il cloruro di sodio viene generato durante la preparazione della formulazione quando il cloridrato della sostanza farmaceutica reagisce con la soluzione di idrossido di sodio. Entrambi i componenti sono conformi alla Farmacopea Europea.		

Sviluppo farmaceutico

Una forma di dosaggio liofilizzata solida viene sviluppata qui per VAS203 per la preparazione di una soluzione per infusione.

5 1 g di VAS203 in tampone soluzione di 10 g di idrossido di sodio/idrogeno fosfato di sodio con un pH finale di 7,4 è stato scelto per essere trattato asetticamente, sterilizzato mediante filtrazione su membrana ed utilizzato per riempire fiale di vetro da 50 ml. Successivamente, questa soluzione è stata liofilizzata secondo un programma di liofilizzazione scelto che ha prodotto un prodotto liofilizzato con stabilità eccellente. In questa composizione solida, VAS203 è presente come base libera 4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina. Le fiale vengono chiuse in atmosfera di azoto, sigillate con tappi per crio-essiccamento e chiuse con chiusure per vuoto bianche. Gli eccipienti vengono aggiunti allo scopo di fornire
 10 una soluzione isotonica con pH fisiologico dopo la ricostituzione con 50 ml di acqua per iniezioni. Il pH della soluzione finale isotonica è da 6,5 a 7,6. La concentrazione finale della sostanza farmaceutica VAS203 è 20 mg/ml.



Descrizione del procedimento di produzione e controlli del procedimento

Ad un pH di 7,4 4-ammino-(6R,S)-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina dicloridrato diidrato (VAS203) disciolto in una soluzione tampone è molto instabile e si ossida nei suoi due metaboliti 4-ammino-7,8-diidro-L-biopterina e 4-ammino-L-biopterina. È importante, quindi, che la soluzione di VAS203 venga preparata con tampone degassato e, dopo la
5 preparazione della soluzione di VAS203, la liofilizzazione dovrebbe essere avviata senza ritardo.

Per permettere la liofilizzazione in fiale da 50 ml, deve essere preparato un tampone di soluzione concentrata di VAS203 (1 g di VAS203 in 10 g di tampone). La soluzione tampone viene preparata miscelando le soluzioni madre:

soluzione di idrossido di sodio (NaOH) 5N al 14% (p/p)

soluzione di tampone idrogenofosfato di sodio (NaPB) al 10% (p/p)

10 500 mmol/l, pH 7,4

acqua per iniezioni al 76% (p/p)

Il tampone di soluzione sterile viene quindi degassato con azoto finché il contenuto di ossigeno non sia <1,0 ppm. Per ciascuna fiala, vengono utilizzati 9,0 g di questo tampone di soluzione per sciogliere 1,0 g di VAS203. Il
15 tampone di soluzione viene utilizzato per riempire un pallone spurgato con azoto ed il VAS203 solido (liofilizzato) viene aggiunto con attenzione entro 15 min sotto azoto come atmosfera protettiva. Dopo il controllo del valore del pH la soluzione di VAS203 viene sterilizzata mediante filtrazione con un filtro Millipak 200 da 0,22 µm. I filtri da 0,22 µm vengono testati per l'integrità dopo l'uso. Un campione di 100 ml viene prelevato per il test del carico biologico. Il limite del carico biologico della soluzione del prodotto farmaceutico prima della filtrazione sterilizzante viene definito come =
20 10 cfu/100 ml. La soluzione rimanente viene filtrata per una seconda volta e distribuita in fiale da 50 ml, 10 g per fiala. Le fiale vengono sterilizzate prima del riempimento mediante calore secco secondo la sezione 5.1.1. della Farmacopea Europea. Dopo la liofilizzazione le fiale vengono chiuse in atmosfera di azoto, sigillate con tappi per crio-essiccamento e chiuse con chiusure per vuoto bianche. La soluzione di VAS203 viene preparata poco prima del crio-essiccamento. Il procedimento di riempimento asettico è stato validato utilizzando il test Media Fill. Un diagramma di flusso delle fasi successive del procedimento di produzione, indicante i componenti utilizzati per ciascuna fase viene mostrato in Fig 2. Il



risultato è una composizione solida in cui VAS203 è presente come base libera 4-ammino-(6R,S)-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina.

Stabilità

5 Un monitoraggio di stabilità è stato realizzato per 24 mesi. I campioni sono stati conservati “a lungo termine” a 5°C (vero). Uno studio di stabilità accelerata è stato realizzato a 40°C/75% di UR per 6 mesi (vero). Le procedure analitiche utilizzate nel programma di stabilità includono test per il saggio, la purezza e le sostanze correlate. Le specifiche applicate ed i metodi utilizzati sono uguali al rilascio del prodotto farmaceutico.

10 Un monitoraggio della stabilità è stato realizzato per almeno 60 mesi. La Tabella 3 mostra le condizioni ed il periodo di conservazione dell'indagine sulla stabilità. I campioni sono stati conservati “a lungo termine” a 5°C (vero). Uno studio di stabilità accelerata è stato realizzato a 40°C/75% di UR per 6 mesi (vero). La Tabella 4 fornisce il programma del test per i differenti punti temporali. Le procedure analitiche utilizzate nel programma della stabilità includono test per il saggio, la purezza e le sostanze correlate. Le specifiche applicate ed i metodi utilizzati sono uguali al rilascio del prodotto farmaceutico. Risultati esemplari dello studio di stabilità vengono mostrati nella Tabella 5 (che viene riportata come Figura 4).

Tabella 3. Condizioni del monitoraggio della stabilità da realizzare

Condizione di conservazione	Confezione	Periodo di conservazione	Punti temporali della stabilità (mesi)
5°C	fiale da 50 ml di vetro	60 mesi	iniziale (rilascio), 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48, 60
40°C/75% UR	fiale da 50 ml di vetro	6 mesi	iniziale (rilascio), 1, 3, 6

Tabella 4. Programma del test ai punti temporali della stabilità

Mese	Condizione	Test da eseguire*
iniziale	-	A
1	accelerato (40°C)	B



3	a lungo termine (5°C) & accelerato (40°C)	B
6	a lungo termine (5°C) & accelerato (40°C)	A (accelerato), B (a lungo termine)
9	a lungo termine (5°C)	B
12	a lungo termine (5°C)	A
18	a lungo termine (5°C)	B
24	a lungo termine (5°C)	B
36	a lungo termine (5°C)	A
48	a lungo termine (5°C)	A
60	a lungo termine (5°C)	A
* I test da eseguire sono: - A: Specifica della durata di conservazione completa - B: Specifica della durata di conservazione completa senza i punti in esame "sterilità", "endotossine" e "particelle"		

Discussione

I dati di stabilità sono disponibili per il lotto conservato a 5°C ed a 40°C/75% di UR, protetto dalla luce. Variazioni minori sono state osservate per campioni conservati ad entrambe le temperature fino a 24 mesi ma queste non hanno mostrato alcuna tendenza coerente e si ritiene che siano nell'intervallo della variabilità analitica. Non è stato formato alcun prodotto di degradazione. Un leggero incremento potrebbe essere osservato per il primo metabolita (prodotto di ossidazione) della sostanza farmaceutica (4-ammino-7,8-diidro-L-biopterina). Dopo una conservazione di 24 mesi a 5°C in 7 di 10 fiale è stato trovato un totale di 15 particelle visibili.

I dati di stabilità sono disponibili per il lotto conservato a 5°C ed a 40°C/75% di UR, protetto dalla luce. Non è stata osservata alcuna variazione significativa per campioni conservati ad entrambe le temperature fino a 36 mesi. Non è stato formato alcun prodotto di degradazione.

Conclusioni

Le fiale di prodotto farmaceutico VAS203 sono stabili quando conservate a 5°C, protette dalla luce, per non meno di 36 mesi. Le fiale del prodotto farmaceutico VAS203 sono stabili quando conservate a 40°C/75% di UR, protette



dalla luce, per non meno di 6 mesi. Considerando quanto detto sopra, una durata di conservazione di 42 mesi viene stabilita per 1 g di polvere di VAS203 liofilizzata contenuta in fiale da 50 ml di vetro sotto azoto come atmosfera protettiva. L'istruzione per la conservazione sarà di conservare le fiale a 2-8°C, e le fiale devono essere avvolte con un foglio di alluminio e confezionate in scatole di cartone per proteggerle dalla luce. Tutti i prodotti farmaceutici ricostituiti dovrebbero essere esaminati visivamente per del materiale particellare. L'istruzione per la conservazione sarà di conservare le fiale a 2-8°C.

La durata di conservazione può essere estesa se sono disponibili dati di stabilità appropriati a lungo termine ed accelerato dal concomitante studio di stabilità per fiale da 1 g di VAS203 e fiale di 50 ml di placebo ed i risultati soddisfano le specifiche attuali. La durata di conservazione sarà determinata secondo i principi descritti nelle linee guida ICH Q1E.

Se nessun cambiamento significativo viene rilevato in condizioni accelerate nel corso di 6 mesi e i dati a lungo termine mostrano scarsa o nessuna variazione nel tempo e bassa variabilità, due volte il periodo coperto dai dati in tempo reale sarà utilizzato come durata di conservazione prolungata, ma la durata di conservazione può non superare la lunghezza dei dati a lungo termine disponibili di più di 12 mesi.

Esempio 3 - Stabilità durante la preparazione per la somministrazione ed il corso dell'infusione

Uno studio di stabilità a temperatura ambiente è stato realizzato per la sostanza farmaceutica VAS203 per testare qualsiasi degradazione della soluzione ricostituita in siringhe trasparenti di polipropilene (PP) da 50 ml che vengono utilizzate in studi clinici. Durante il test di stabilità le siringhe di PP sono state esposte alla normale luce del giorno. Il contenuto della soluzione, la purezza, le sostanze correlate ed il pH sono stati monitorati per 48 h (iniziale, 6, 24, 48 h dopo la preparazione). La Tabella 6 mostra i risultati del test di stabilità.

20 Discussione

Il contenuto della soluzione (saggio) è rimasto costante entro limiti specificati (650 ± 60 mg) per 48 ore. Durante il periodo testato, la purezza cromatografica per entrambi i diastereoisomeri è stata ben entro i limiti specificati, non è stato possibile osservare alcun cambiamento significativo. Il contenuto relativo di sostanze correlate è rimasto costante entro limiti specificati per 48 ore. Non si è formato alcun prodotto di degradazione. È stato possibile osservare un leggero incremento per il primo metabolita di VAS203 (4-ammino-7,8-diidro-L-biopterina). Tuttavia, quest'ossidazione è stata



probabilmente causata dall'ossigeno residuo nella siringa, tra 6 e 48 ore la variazione è stata insignificante. Il pH della soluzione di VAS203 ricostituita è rimasto costante entro i limiti specificati per 48 ore. Non è stato possibile osservare alcuna modifica. La sensibilità alla luce non è stata osservata fino a 48 ore.

Conclusioni

- 5 Le ricerche effettuate dimostrano che una soluzione ricostituita di VAS203 è stabile nel suo dispositivo di applicazione (siringa di PP da 50 ml) a temperatura ambiente esposta alla normale luce del giorno per 48 ore. Tuttavia, la data di scadenza è stata ridotta per evitare la contaminazione microbiologica. La data di scadenza è stata definita come il punto temporale della preparazione della soluzione di VAS203 più 27 ore.

Tabella 6. Stabilità della soluzione ricostituita di VAS203 in siringa di PP da 50 ml (dispositivo di applicazione), conservata a temperatura ambiente

Articolo in esame	Specificità (lotto di fase clinica I)	Periodo di conservazione in ore			
		0	6	24	48
Saggio (HPLC) (calcolato su base anidra e priva di cloruro)	650 ± 60 mg	615 mg	610 mg	621 mg	626 mg
Purezza (HPLC)					
-(6R)-4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina [area %]	57,0 ± 3,5	55,5	55,4	55,4	55,5
-(6S)-4-ammino-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina [area %]	37,5 ± 3,5	39,0	38,5	38,4	38,1
Sostanze correlate (HPLC)*:					
A [area %]	≤ 4,5	3,3	3,8	3,8	4,1
B [area %]	≤ 1,2	0,6	0,6	0,6	0,6
C [area %]	≤ 2,7	1,5	1,6	1,5	1,5



Ulteriori sostanze correlate, ciascuna [area %]	$\leq 0,6$	0,2	0,2	0,2	0,1
Ulteriori sostanze correlate, totale [area %]	$\leq 3,0$	0,5	0,6	0,6	0,4
Soluzione ricostituita[§]					
- pH	da 6,5 a 7,6	7,1	N.T.	7,1	7,1
N.T.: non testato; §: ricostituita in 50 ml di acqua per iniezioni * A: 4-ammino-7,8-diidro-L-biopterina; B: Σ (6R)-5,6,7,8-Tetraidro-L-biopterina e (6S)-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina; C: Σ 1-[(6R)-2,4-Diammino-5,6,7,8-tetraidropteridin-6-il]propanolo e 1-[(6S)-2,4-Diammino-5,6,7,8-tetraidropteridin-6-il]propanolo					

5 Si deve notare che come utilizzate qui, le forme singolari “un/uno/una” ed “il/lo/la”, includono riferimenti plurali, a meno che il contesto non indichi chiaramente altrimenti. Così, per esempio, il riferimento a “un reagente” comprende uno o più tra tali reagenti differenti ed il riferimento a “il metodo” comprende il riferimento a passaggi equivalenti e a metodi noti a coloro che sono di abilità ordinaria nell’arte che potrebbero essere modificati o essere messi al posto dei metodi qui descritti.

Se non indicato diversamente, il termine “almeno” prima di una serie di elementi si deve intendere riferirsi a ogni elemento nella serie. Coloro che sono esperti nell’arte riconosceranno, o saranno in grado di accertare utilizzando non più di una sperimentazione di routine, molti equivalenti alle forme di realizzazione specifiche della presente invenzione descritta qui. Tali equivalenti vengono intesi essere compresi dalla presente invenzione.

10 In ogni punto di questa descrizione e nelle rivendicazioni che seguono, a meno che il contesto non richieda diversamente, il termine “comprendono”, e variazioni come “comprende” e “comprendente”, saranno intesi implicare l’inclusione di un numero intero o di una fase specificati o di un gruppo di numeri interi o di fasi ma non l’esclusione di



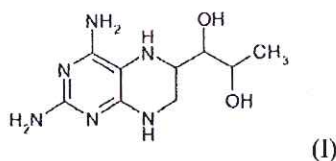
nessun altro numero intero o fase o gruppo di numeri interi o di fasi. Quando utilizzato qui il termine “comprendente” può essere sostituito con il termine “contenente” o talvolta quando utilizzato qui con il termine “avente”.

5 Quando utilizzato qui “composto da” esclude qualsiasi elemento, passaggio o ingrediente non specificato nell’elemento della rivendicazione. Quando utilizzato qui, “costituito essenzialmente da” non esclude materiali o passaggi che non influenzano materialmente le caratteristiche basilari e nuove della rivendicazione. In ciascun esempio qui qualsiasi dei termini “comprendente”, “costituito essenzialmente da” e “composto da” può essere sostituito con ciascuno di altri due termini.



RIVENDICAZIONI

1. Una composizione farmaceutica solida comprendente
a) un composto avente la formula (I):



- 5 e/o un composto avente la formula (II):



e

b) almeno un sale fosfato.

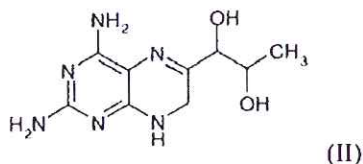
2. Composizione farmaceutica della rivendicazione 1, in cui l' almeno un sale fosfato è un fosfato di sodio, un fosfato di potassio o un fosfato d'ammonio.
3. Composizione farmaceutica della rivendicazione 2, in cui il sale fosfato viene scelto nel gruppo consistente di Na_2HPO_4 (privo di acqua), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, NaH_2PO_4 (privo di acqua), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 (privo di acqua) $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 (privo di acqua) e loro miscele.
4. Composizione farmaceutica di qualsiasi delle rivendicazioni 1-3, in cui il composto (I) e/o il composto (II) sono presenti come base libera.
5. Composizione farmaceutica di qualsiasi delle rivendicazioni 1-4, in cui la composizione farmaceutica è una composizione farmaceutica liofilizzata.
6. Composizione farmaceutica di qualsiasi delle rivendicazioni 1-5, in cui la composizione farmaceutica comprende un ulteriore eccipiente farmaceutico, preferibilmente un sale inorganico, preferibilmente NaCl.



7. Composizione farmaceutica di qualsiasi delle rivendicazioni 1-6, in cui la composizione comprende inoltre acqua di cristallizzazione.
8. Composizione farmaceutica di qualsiasi delle rivendicazioni 1-7, in cui un dosaggio unitario della composizione contiene 650 ± 60 mg della base libera di 4-ammino-(6R,S)-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina o di 4-ammino-(6R,S)-7,8-diidro-L-biopterina, 140 ± 30 mg di acqua di cristallizzazione, 70 ± 7 mg di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $16,5 \pm 2$ mg di $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, e 350 ± 30 mg di NaCl.
9. Composizione farmaceutica liofilizzata di qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 8 per uso nel trattamento di una malattia.
10. Composizione farmaceutica liofilizzata per l'uso della rivendicazione 9, in cui la malattia viene scelta nel gruppo consistente di un danno cerebrale traumatico, danno cerebrale non traumatico, preferibilmente ictus o meningite, pressione cranica elevata, danno cerebrale secondario.
11. Un metodo per preparare una composizione farmaceutica solida liofilizzata comprendente:
- a) un composto avente la formula (I):



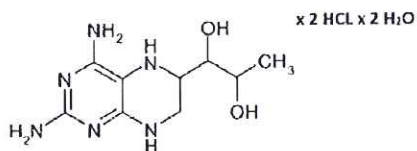
- 15 e/o un composto avente la formula (II):



- e
- b) almeno un sale fosfato e facoltativamente NaCl;
- il metodo comprendendo:



aa) sciogliere il composto di formula (III) e/o (II):



(III),

o



(II)

5 con un tampone, in cui il tampone comprende il fosfato;

bb) liofilizzare la soluzione ottenuta in aa).

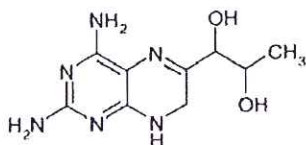
12. Un metodo per preparare una soluzione iniettabile comprendente:

a) un composto avente la formula (I):



(I)

10 e/o un composto avente la formula (II):



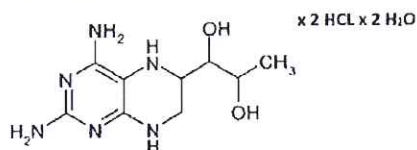
(II)

e

b) almeno un sale fosfato e facoltativamente NaCl;

il metodo comprendendo:

aa) sciogliere il composto di formula (III) e/o (II):



(III),

5

o



(II)

con un tampone, in cui il tampone comprende il fosfato;

bb) liofilizzare la soluzione ottenuta in aa);

10 cc) ricostituire il liofilizzato ottenuto in bb) in un fluido farmaceuticamente accettabile per la preparazione di una soluzione iniettabile, in cui il liofilizzato ottenuto in bb) viene utilizzato per riempire una fiala, preferibilmente una fiala da 50 ml, preferibilmente in una quantità di circa 1-1,5 g, preferibilmente 1,25 g di formulazione solida.

15

Il sottoscritto dichiara che la presente traduzione è conforme al testo originale.

D.ssa Federica TRUPIANO (USBM-CPI-026 BM)



TAVOLA I

Figura 1 : Preparazione della sostanza farmaceutica VAS203

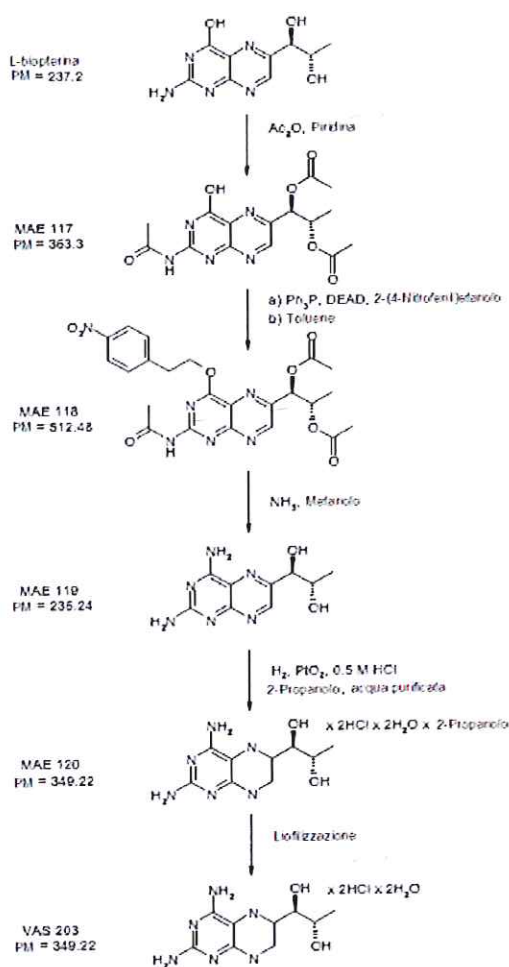




TAVOLA II

Fig. 2

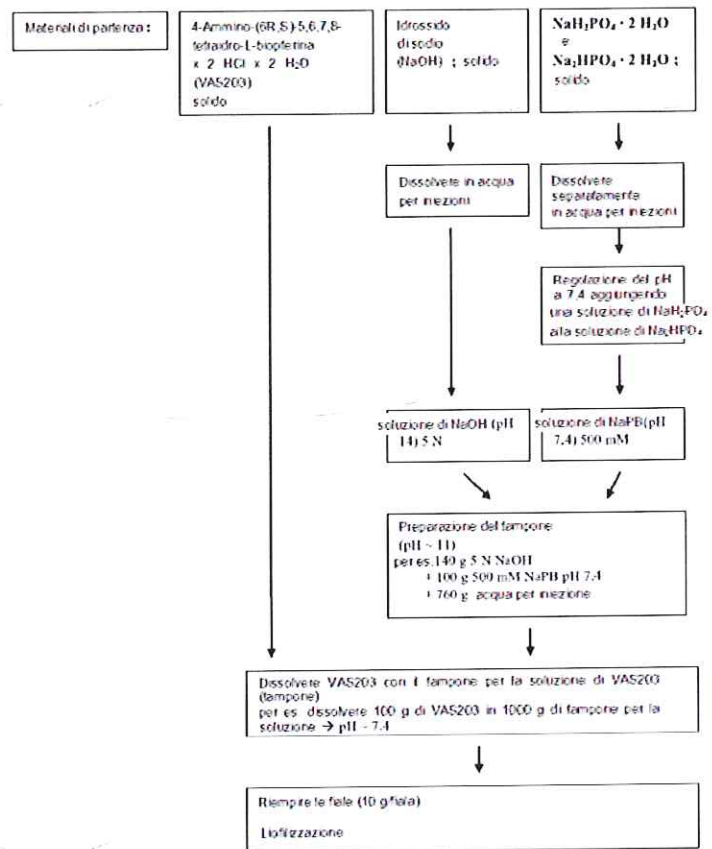


TAVOLA III

Fig. 3

Articolo del test	Specifica	Periodo di conservazione in mesi							
		0	3	6	9	12	18	24	36
Aspetto	Polvere liofilizzata di colore da bianco a rosso chiaro o marrone	e conforme	e conforme	e conforme	e conforme	e conforme	e conforme	e conforme	e conforme
Identificazione (HPLC)	Coeluzione con una sostanza di riferimento	e conforme	e conforme	e conforme	e conforme	e conforme	e conforme	e conforme	e conforme
Saggio (HPLC) (calcolato su base anidra e priva di idrato)	650 ± 60 mg	645 mg	649 mg	637 mg	660 mg	687 mg	658 mg	686 mg	694 mg
Purezza (HPLC)									
- (R)-4-Amino-5,8,7,8-tetraidro-L-biotterina [area %]	55.5 ± 3.0	54.6	55.0	54.6	54.4	55.1	54.8	54.6	54.6
- (S)-4-Amino-5,8,7,8-tetraidro-L-biotterina [area %]	40.0 ± 3.0	41.5	41.6	41.3	41.6	41.8	41.3	41.5	41.4

