

FORMULAZIONE LIQUIDA PER L'INALAZIONE

COMPRENDEnte RPL554

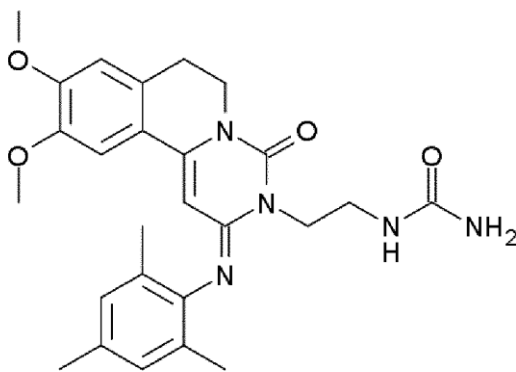
AMBITO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda una composizione farmaceutica liquida comprendente un farmaco respiratorio.

STATO DELL'ARTE

Le proprietà tossicocinetiche delle composizioni farmaceutiche liquide sono imprevedibili. È importante che un principio farmaceutico attivo (API) sia correttamente formulato così che sia fornito un dosaggio sicuro, efficace e controllato quando la composizione è somministrata a un paziente. In modo particolare, questo è il caso delle composizioni inalabili. Inoltre, le composizioni farmaceutiche inalabili devono avere una stabilità a lungo termine affidabile per assicurare che il profilo di dosaggio della composizione sarà mantenuto dopo la conservazione. Questo evita la somministrazione di dosaggi errati. Le composizioni farmaceutiche devono anche essere formulate in modo tale che la somministrazione non sia sgradevole per un paziente, per esempio, per quanto riguarda il gusto e l'acidità.

RPL554 (9,10-dimetossi-2-(2,4,6-trimetilfenilimmino)-3-(N-carbamoil-2-amminoetil)-3,4,6,7-tetraidro-2H-pirimido[6,1-a]isochinolin-4-one) è un inibitore doppio di PDE3/PDE4 ed è descritto in WO 00/58308 (ed è anche talvolta indicato come RPL554). Come inibitore combinato di PDE3/PDE4, RPL554 ha un'attività sia antinfiammatoria sia broncodilatatrice ed è utile nel trattamento di disturbi respiratori come, per esempio, asma e broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO). La struttura di RPL554 è mostrata di seguito.



È spesso preferibile somministrare RPL554 mediante inalazione per via della sua efficacia nel trattamento di disturbi respiratori. Un metodo di somministrazione efficace è la nebulizzazione. Franciosi *et al.* divulgano una soluzione di RPL554 in un tampone citrato-fosfato (Efficacy and safety of RPL554, a dual PDE3 and PDE4 inhibitor, in healthy volunteers and in patients with asthma or chronic obstructive pulmonary disease: findings from four clinical trials (Efficacia e sicurezza di RPL554, un inibitore doppio di PDE3 e PDE4, in volontari sani e in pazienti con asma o broncopneumopatia cronica ostruttiva: esiti da quattro studi clinici), *The Lancet: Respiratory Medicine* 11/2013; 1(9):714-27. DOI: 10.1016/S2213-2600(13)70187-5).

L'effetto di RPL554 sul tono del muscolo liscio bronchiale umano isolato è descritto in Calzetta *et al.*, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (346, 3, pagine da 414 a 423). Compton *et al.*, *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 26 (2013) 562-573, descrive trattamenti per BPCO.

RIASSUNTO DELL'INVENZIONE

È una scoperta sorprendente della presente invenzione il fatto che la composizione ottimale per l'inalazione comprendente RPL554 è una composizione farmaceutica liquida comprendente una sospensione di particelle

di RPL554. È stato riscontrato che le sospensioni di RPL554 hanno proprietà altamente desiderabili per un contesto clinico. È stato riscontrato che diversi vantaggi sono associati a una composizione farmaceutica liquida che comprende un diluente e una sospensione di particelle di RPL554 o un sale farmaceuticamente accettabile di questa.

La composizione farmaceutica liquida dell'invenzione ha proprietà notevolmente migliorate rispetto alle formulazioni precedenti, per esempio, quando confrontata con una formulazione in soluzione di RPL554. Riguardo alle proprietà tossicocinetiche, è stato riscontrato che la formulazione in sospensione ha caratteristiche di rilascio ritardato in confronto a quelle di una soluzione. Questo può ridurre il numero di trattamenti che devono essere somministrati a un paziente. È stato anche riscontrato che la sospensione consente un dosaggio molto maggiore di RPL554 da somministrare, come può essere osservato dai valori plasmatici di C_{max} e AUC. Questo può anche ridurre la frequenza di somministrazioni necessarie.

La composizione farmaceutica liquida dell'invenzione presenta anche un'eccellente stabilità, con composizioni che non hanno presentato degradazione né dopo 12 mesi a condizioni ambiente (25 °C), né dopo 6 mesi a condizioni accelerate (40 °C). È osservata degradazione in una composizione in soluzione comparabile nelle stesse condizioni. Le composizioni possono non mostrare alcuna degradazione né dopo 12 mesi a condizioni ambiente (25 °C/60% UR), né dopo 6 mesi a condizioni accelerate (40 °C/75% UR).

Di conseguenza, la presente invenzione fornisce una composizione farmaceutica liquida comprendente un diluente e una sospensione di particelle di 9,10-dimetossi-2-(2,4,6-trimetilfenilimmino)-3-(N-carbamoil-2-amminoetil)-

3,4,6,7-tetraidro-2H-pirimido[6,1-a]isochinolin-4-one (RPL554) o un sale farmaceuticamente accettabile di questa in cui le particelle di RPL554 hanno una distribuzione granulometrica con un valore Dv_{50} (dimensione media di particella in volume) da 0,2 μm a 5 μm e in (a) il diluente è acqua e/o (b) la composizione farmaceutica liquida comprende inoltre uno o più tamponi.

L'invenzione fornisce anche una composizione farmaceutica liquida secondo l'invenzione per l'uso nel trattamento del corpo umano o animale. Una composizione farmaceutica liquida secondo l'invenzione può essere usata nel trattamento o nella prevenzione di una patologia o condizione scelta tra asma, asma allergica, raffreddore da fieno, rinite allergica, bronchite, enfisema, bronchiectasia, broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO), sindrome da sofferenza respiratoria dell'adulto (ARDS), asma resistente agli steroidi, asma grave, asma pediatrica, fibrosi cistica, fibrosi del polmone, fibrosi polmonare, malattia polmonare interstiziale, disturbi cutanei, dermatite atopica, psoriasi, infiammazione oculare, ischemia cerebrale, malattie infiammatorie e malattie autoimmuni.

Tipicamente, detta patologia o condizione è asma o BPCO, più tipicamente COPD.

Collegato all'invenzione è anche un metodo di trattamento o di prevenzione di una malattia o di una condizione come definita qui in un soggetto, il quale metodo comprende la somministrazione al detto soggetto di una quantità efficace di una composizione farmaceutica liquida secondo l'invenzione.

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

Figura 1 – La contrazione provocatoria (CP) di acetilcolina che ha prodotto in modo cumulativo un aumento del 50% della resistenza totale delle

vie aeree (Acetilcolina RL PC50) in animali trattati con soluzione salina o formulazione in soluzione di RPL554: punto temporale a 2 e a 5 h: Acetilcolina RL PC50 è stata log-trasformata ai fini di analisi statistiche. Il test t post-hoc dei dati non trasformati ha mostrato differenze tra i gruppi rispetto alla soluzione salina. *L'analisi non parametrica ha mostrato una differenza significativa tra 2 ore (soluzione di RPL554 da 1 mg/ml, $P = 0,0190$ non regolato) e 5 ore (soluzione da 2,5 mg/ml, $P = 0,0095$ non regolato) rispetto al gruppo della soluzione salina. Valori $N = 6, 4, 4; 4, 4$ da sinistra a destra. (Si noti: controllo non tracciato a 5 h).

Figura 2 – Acetilcolina RL PC50 in animali trattati con veicolo o la formulazione in sospensione di RPL554: punto temporale a 2 e a 5 h: Acetilcolina RL PC50 è stata log-trasformata ai fini di analisi statistiche (pannello superiore). Analisi non parametriche hanno mostrato una differenza significativa tra 2 ore (sospensione da 10 mg/ml di RPL554, $P = 0,0268$ non regolato) rispetto al gruppo di controllo con veicolo. La rianalisi dei dati combinando i dati del veicolo (2 + 5 h) ha rivelato una broncoprotezione complessivamente significativa ($P = 0,0016$) che è stata riflessa da un grado significativo di broncoprotezione con la sospensione di RPL554 da 2,5 mg/ml (2,52 volte (da 1 a 5,72), $P < 0,05$ e sospensione di RPL554 da 10 mg/ml (4,67 volte (da 2 a 11), $*P < 0,05$) rispetto al veicolo. Al punto temporale a 5 h, la sospensione di RPL554 da 10 mg/ml ha determinato un grado significativo di broncoprotezione (2,77 volte (da 1,3 a 6,0), $*P < 0,05$). ($N = 8,4,4,3, 6$, da sinistra a destra) pannello inferiore).

La Figura 3 mostra le concentrazioni medie di RPL554 nel plasma da volontari umani sani in seguito alla somministrazione (i) della formulazione in

sospensione o (ii) della formulazione in soluzione mediante nebulizzatore a un livello di dose nominale di circa 1,5 mg.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Tipicamente, le particelle di RPL554 sono particelle micronizzate.

Le particelle hanno una distribuzione granulometrica con un valore Dv_{50} (dimensione media di particelle) da circa 0,2 μm a circa 5 μm . Più tipicamente, le particelle di RPL554 hanno una distribuzione granulometrica con un valore Dv_{50} da circa 0,7 μm a circa 3,0 μm . Per esempio, le particelle di RPL554 possono avere una distribuzione granulometrica con un valore Dv_{50} da 0,9 μm a 1,7 μm o, in alternativa, da 1,7 μm a 2,7 μm . Spesso, le particelle di RPL554 hanno una distribuzione granulometrica con un valore Dv_{50} da circa 1,1 μm a circa 2,6 μm .

Il valore Dv_{50} è la dimensione media di particella per una distribuzione volumetrica. Pertanto, metà del volume delle particelle è compreso in particelle aventi diametri inferiori al valore Dv_{50} e metà del volume delle particelle è compreso in particelle aventi diametri superiori al valore Dv_{50} . Questo è un modo ben noto con cui descrivere le distribuzioni granulometriche.

Le particelle hanno tipicamente una distribuzione granulometrica con un valore Dv_{10} da circa 0,4 μm a circa 1,0 μm . Le particelle hanno tipicamente una distribuzione granulometrica con un valore Dv_{90} da circa 2,0 μm a circa 4,0 μm . Il valore Dv_{10} riflette il diametro di particella in cui il 10% del volume del campione è in particelle aventi un diametro di particella inferiore al valore Dv_{10} . Il valore Dv_{90} riflette il diametro di particella in cui il 90% del volume del campione è in particelle aventi un diametro di particella inferiore al valore Dv_{90} .

La tecnica usata per misurare il valore Dv_{50} è tipicamente la diffrazione laser. Per esempio, le particelle di RPL554 hanno tipicamente una distribuzione granulometrica con valore Dv_{50} da circa $0,2 \mu\text{m}$ a circa $5 \mu\text{m}$ come misurato mediante diffrazione laser. L'analisi della distribuzione granulometrica può essere effettuata mediante diffrazione laser usando lo Spraytec di Malvern unitamente a una cella di dispersione umida. Tipicamente, i parametri di strumento per lo Spraytec di Malvern sono come segue:

- particella – particella opaca standard;
- indice di rifrazione di particella – 1,50;
- indice di rifrazione (immaginario) – 0,50;
- densità di particella – 1,00;
- indice di rifrazione del disperdente – 1,33;
- unità di controllo – 1000 giri al minuto;
- tipo di misurazione – temporizzata;
- tempo di campionamento iniziale – 30 secondi;
- oscuramento – dal 20% al 30%
- disperdente – 1% di polisorbato 20 in acqua deionizzata.

Le particelle di RPL554 possono essere prodotte mediante un qualsiasi processo di riduzione dimensionale farmaceuticamente accettabile o processo di produzione controllata di dimensione di particella. Per esempio, le particelle possono essere prodotte essiccando per atomizzazione una soluzione di RPL554, o mediante cristallizzazione controllata, o mediante riduzione dimensionale di una forma solida di RPL554, per esempio, mediante macinazione a getto d'aria, micronizzazione meccanica o macinazione dei mezzi.

La concentrazione di particelle di RPL554 nella composizione farmaceutica liquida va tipicamente da circa 0,01 mg/ml a circa 40 mg/ml. Più tipicamente, la concentrazione di particelle di RPL554 nella composizione farmaceutica liquida va da circa 0,1 mg/ml a circa 20 mg/ml. Per esempio, la concentrazione di particelle di RPL554 nella composizione farmaceutica liquida può andare da circa 0,01 mg/ml a circa 5 mg/ml, o da 0,1 mg/ml a 5 mg/ml. La concentrazione di particelle di RPL554 nella composizione farmaceutica liquida può andare, per esempio, da 0,1 mg/ml a 6 mg/ml.

Preferibilmente, il pH della sospensione va da circa 6 a circa 8, più preferibilmente da circa 6.5 a circa 7.

La composizione farmaceutica liquida può inoltre comprendere uno o più tensioattivi. I tensioattivi sono tensioattivi farmaceuticamente accettabili. I tensioattivi possono essere tensioattivi non ionici, tensioattivi anionici, tensioattivi cationici o tensioattivi zwitterionici. Preferibilmente, gli uno o più tensioattivi sono scelti da uno o più tensioattivi non ionici.

Gli uno o più tensioattivi sono tipicamente scelti tra poliossietilenglicole alchil eteri, poliossipropilenglicole alchil eteri, glucoside alchil eteri, poliossietilenglicole ottifenol eteri, poliossietilenglicole alchifenol eteri, glicerolo alchil esteri, poliossietilenglicole sorbitano alchil esteri (polisorbati), sorbitano alchil esteri, cocamide MEA, cocamide DEA, ossido di dodecildimetilammina, copolimeri a blocchi di polietilenglicole e polipropilenglicole (poloassameri) e ammina di sego polietossilata (POEA).

Preferibilmente, gli uno o più tensioattivi sono scelti tra poliossietilenglicole sorbitano alchil esteri, per esempio, polisorbato 20 (poliossietilene (20) sorbitano monolaurato), polisorbato 40 (poliossietilene (20)

sorbitano monopalmitato), polisorbato 60 (poliossietilene (20) sorbitano monostearato) e polisorbato 80 (poliossietilene (20) sorbitano monooleato), e sorbitano alchil esteri, per esempio, sorbitano monolaurato, sorbitano monopalmitato, sorbitano monostearato, sorbitano tristearato e sorbitano monooleato.

La concentrazione totale degli uno o più tensioattivi va tipicamente da circa 0,01 mg/ml a circa 2 mg/ml. La composizione comprende spesso due o più tensioattivi, per esempio, un polisorbato e un tensioattivo Span.

Tipicamente, la composizione farmaceutica liquida comprende inoltre uno o più tamponi. I tamponi sono tamponi farmaceuticamente accettabili. I tamponi possono essere un qualsiasi tampone idoneo per l'uso in una composizione farmaceutica liquida idonea per l'inalazione. Gli uno o più tamponi sono tipicamente scelti tra tamponi citrato o fosfato. I tamponi citrato includono acido citrico, citrato di sodio e miscele di questi. I tamponi fosfato includono acido fosforico, fosfato monosodico, fosfato sodico bibasico e miscele di questi.

La concentrazione totale degli uno o più tamponi va tipicamente da circa 5 mg/ml a circa 40 mg/ml. La composizione comprende spesso due o più componenti tampone, per esempio, due sali di fosfato, per esempio, sali di fosfato sodico.

Una composizione farmaceutica liquida secondo l'invenzione può comprendere: (a) le particelle di RPL554 a una concentrazione da circa 0,01 mg/ml a circa 40 mg/ml; (b) uno o più tensioattivi a una concentrazione da circa 0,01 mg/ml a circa 5 mg/ml; e (c) un tampone a una concentrazione da circa 5 mg/ml a circa 25 mg/ml.

La composizione farmaceutica liquida comprende inoltre tipicamente un regolatore di tonicità. Il regolatore di tonicità può essere un qualsiasi regolatore di tonicità farmaceuticamente accettabile. Esempi di regolatori di tonicità includono semplici sali atossici come, per esempio, alogenuri di metalli alcalini, per esempio, cloruro di sodio e ioduro di potassio. Tipicamente, il regolatore di tonicità è cloruro di sodio. La concentrazione del regolatore di tonicità dipenderà dalla quantità necessaria per raggiungere la tonicità desiderata, per esempio, l'isotonicità con il corpo o i polmoni. La concentrazione del regolatore di tonicità va tipicamente da circa 2 mg/ml a circa 8 mg/ml e, più tipicamente, da circa 3,5 mg/ml a 6 mg/ml.

La composizione farmaceutica liquida può comprendere altri componenti. In alternativa, altri componenti possono essere esclusi. In alcuni casi, la composizione farmaceutica liquida non comprende un agonista del recettore β_2 -adrenergico o un antagonista del recettore muscarinico (oppure non comprende più di 0,1 % in peso in totale di un agonista di recettore β_2 -adrenergico e di un antagonista di recettore muscarinico).

Il diluente può essere un qualsiasi diluente farmaceuticamente accettabile. Il diluente è idoneo per la somministrazione mediante inalazione. Esempi di diluenti idonei includono acqua, etanolo e glicerolo. Il diluente è preferibilmente acqua. Il diluente è preferibilmente sterile.

Una composizione farmaceutica liquida secondo l'invenzione comprende tipicamente:

- (a) le particelle di RPL554 a una concentrazione da 0,01 mg/ml a 40 mg/ml;

- (b) un poliossietilenglicole sorbitano alchil estere a una concentrazione da 0,1 mg/ml a 2 mg/ml;
- (c) un sorbitano alchil estere a una concentrazione da 0,01 mg/ml a 0,1 mg/ml;
- (d) un primo componente tampone fosfato a una concentrazione da 5 mg/ml a 10 mg/ml;
- (e) un secondo componente tampone fosfato a una concentrazione da 5 mg/ml a 10 mg/ml; e
- (f) un regolatore di tonicità a una concentrazione da 2 mg/ml a 8 mg/ml.

Per esempio, la composizione farmaceutica liquida può comprendere:

- (a) le particelle di RPL554 a una concentrazione da 0,05 mg/ml a 25 mg/ml;
- (b) poliossietilene (20) sorbitano monolaurato (polisorbato 20, Tween 20) a una concentrazione da 0,1 mg/ml a 2 mg/ml;
- (c) sorbitano monolaurato (Span 20) a una concentrazione da 0,01 mg/ml a 0,1 mg/ml;
- (d) fosfato monosodico monoidrato a una concentrazione da 5 mg/ml a 10 mg/ml;
- (e) fosfato sodico bibasico anidro a una concentrazione da 5 mg/ml a 10 mg/ml; e
- (f) cloruro di sodio a una concentrazione da 2 mg/ml a 8 mg/ml.

Tipicamente, la composizione farmaceutica liquida è idonea per la somministrazione mediante nebulizzatore.

L'invenzione fornisce anche un nebulizzatore comprendente una composizione farmaceutica liquida secondo l'invenzione. Il nebulizzatore è tipicamente caricato con la composizione farmaceutica liquida. Il nebulizzatore comprende tipicamente da circa 1 ml a circa 200 ml, più tipicamente da 1 ml a 20 ml della composizione farmaceutica liquida.

I nebulizzatori usano aria compressa per aerosolizzare una composizione farmaceutica liquida in un aerosol che è inalato nel tratto respiratorio di un soggetto. Esempi di nebulizzatori includono un nebulizzatore a nebbia fine, un nebulizzatore a membrana vibrante, un nebulizzatore a getto e un nebulizzatore a onde ultrasoniche. Dispositivi di nebulizzazione idonei includono il Philips Ineb™ (Philips), il Pari LC Sprint (Pari GmbH), il sistema di somministrazione polmonare AERx^{RTM} (Aradigm Corp.) e il nebulizzatore riutilizzabile Pari LC Plus (Pari GmbH).

L'invenzione fornisce anche una composizione farmaceutica liquida per l'uso nel trattamento del corpo umano o animale. La composizione è come qui definita. La composizione farmaceutica liquida è tipicamente per l'uso nel trattamento del corpo umano o animale, in cui il trattamento comprende la somministrazione mediante inalazione.

Le composizioni dell'invenzione consentono il rilascio ritardato di RPL554 nel flusso sanguigno. La concentrazione di RPL554 nel plasma dopo un determinato arco di tempo è pertanto aumentata rispetto all'uso di composizioni note di RPL554. Tipicamente, la concentrazione di RPL554 nel plasma del sangue è superiore a o uguale a 1 ng/ml a un tempo superiore a o uguale a quattro ore dopo che è somministrata una dose nebulizzata della composizione. La dose nebulizzata va tipicamente da 0,02 mg/kg a 0,6 mg/kg. Per esempio, la dose

nebulizzata può andare da 0,2 mg/kg a 0,6 mg/kg. Per esempio, l'invenzione fornisce una composizione farmaceutica liquida come qui definita per l'uso nel trattamento del corpo umano o animale, in cui la concentrazione di RPL554 nel plasma del sangue è superiore a o uguale a 1 ng/ml a un tempo superiore a o uguale a quattro ore dopo che una dose nebulizzata da 0,2 mg/kg a 0,6 mg/kg è somministrata tramite inalazione della composizione nebulizzata dell'invenzione. La concentrazione di RPL554 nel plasma del sangue è tipicamente superiore a o uguale a 1 ng/ml a un tempo superiore a o uguale a tre, quattro o cinque ore dopo che è somministrata una dose nebulizzata della composizione.

Collegato all'invenzione è anche un metodo di trattamento o prevenzione di una patologia o condizione come qui definita in un soggetto, il quale metodo comprende la somministrazione a detto soggetto di una quantità efficace di una composizione farmaceutica liquida come qui definita. Tipicamente, il metodo è per il trattamento di una patologia o condizione. La patologia o condizione è tipicamente scelta tra asma, asma allergica, raffreddore da fieno, rinite allergica, bronchite, enfisema, bronchiectasia, broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO), sindrome da sofferenza respiratoria dell'adulto (ARDS), asma resistente agli steroidi, asma grave, asma pediatrica, fibrosi cistica, fibrosi del polmone, fibrosi polmonare, malattia polmonare interstiziale, disturbi cutanei, dermatite atopica, psoriasi, infiammazione oculare, ischemia cerebrale e malattie autoimmuni. Preferibilmente, il metodo comprende il trattamento di asma o broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO), più preferibilmente di BPCO.

Una quantità efficace di RPL554 va tipicamente da 0,01 mg/kg a 50 mg/kg per una dose singola. Una quantità efficace di RPL554 va spesso da circa

0,01 mg/kg a 1 mg/kg per una dose singola. Per esempio, una quantità efficace può essere una dose da circa 0,1 mg a circa 500 mg, o da circa 0,1 mg a 100 mg, preferibilmente da circa 0,1 mg a circa 6 mg. Una quantità efficace può andare da 0,1 mg a 12 mg. Una dose singola di RPL554 può andare da 0,5 mg a 3 mg, per esempio, può essere di circa 1,5 mg. Le dosi possono essere somministrate giornalmente. Per esempio, la dose di RPL554 può andare da 0,01 mg/kg/giorno a 50 mg/kg/giorno, tipicamente da 0,01 mg/kg/giorno a 10 mg/kg/giorno o da 0,01 mg/kg/giorno a 1 mg/kg/giorno. Queste dosi sono tipicamente la dose nominale emessa dall'inalatore. La composizione farmaceutica liquida può essere somministrata una volta, due volte o tre volte al giorno, oppure può essere somministrata due volte, tre volte, quattro volte o cinque volte alla settimana. La composizione può essere somministrata il numero di volte necessitato dal paziente.

Una quantità efficace può essere una dose da circa 0,1 mg a circa 500 mg, o da circa 0,1 mg a 100 mg, preferibilmente da circa 0,5 mg a circa 6 mg. Una quantità efficace può andare da 0,1 mg a 12 mg. Una dose singola di RPL554 può andare da 0,5 mg a 24 mg, la quale può essere somministrata mediante nebulizzatore. Una dose singola di RPL554 può andare da 0,5 mg a 6 mg, per esempio, può essere di circa 1,5 mg. Le dosi possono essere somministrate una volta, due volte o tre volte al giorno. Per esempio, la dose di RPL554 può andare da 0,1 mg/giorno a 50 mg/giorno, tipicamente da 1,5 mg/giorno a 18 mg/giorno. Queste dosi sono tipicamente la dose nominale emessa dall'inalatore. La composizione farmaceutica liquida può essere somministrata una volta, due volte o tre volte al giorno, oppure può essere somministrata due volte, tre volte, quattro volte o cinque volte alla settimana. La

composizione può essere somministrata il numero di volte necessitato dal paziente.

È una scoperta sorprendente della presente invenzione il fatto che una formulazione in sospensione di RPL554 consenta che alte dosi di RPL554 siano somministrate a un paziente senza un aumento concomitante di responsabilità cardiovascolare. La composizione farmaceutica liquida è pertanto idonea per l'uso nel trattamento di pazienti affetti da disturbi cardiovascolari o a rischio di essere affetti da disturbi cardiovascolari.

Per esempio, la composizione può essere usata per trattare una patologia o condizione come sopra definita in un paziente affetto da vulnerabilità cardiovascolare. I pazienti affetti da vulnerabilità cardiovascolare sono tipicamente quelli a rischio aumentato di eventi avversi che insorgono da tachicardia o ipertensione. Più tipicamente, i pazienti affetti da vulnerabilità cardiovascolare sono quelli affetti da una condizione cardiaca preesistente, o da una condizione che sarebbe aggravata da tachicardia o ipertensione. Tali pazienti includono quelli affetti da coronaropatia, cardiomiopatia, ipertensione, cardiopatia ipertensiva, scompenso cardiaco, aritmia, disritmia cardiaca, endocardite, miocardite, valvulopatia cardiaca e ictus. Sono anche inclusi pazienti che sono stati colpiti da infarto miocardico.

L'invenzione è descritta in maggior dettaglio dai seguenti Esempi.

ESEMPI

Esempio 1 – formulazione stabilità della formulazione in sospensione di RPL554

Le composizioni farmaceutiche liquide secondo l'invenzione sono state prodotte con le formulazioni presentate nelle Tabelle 1 e 2 di seguito.

Tabella 1 – formulazione della variante 1a (0,4 mg/ml)

Costituente	Funzione	Concentrazione (mg/ml)
RPL554 (micronizzato)	Composto attivo	0,4
Polisorbato 20 (Tween 20)	Tensioattivo	0,50
Sorbitano monolaurato (Span 20)	Tensioattivo	0,05
Fosfato monosodico monoidrato	Tampone	6,58
Fosfato sodico bibasico anidro	Tampone	6,80
Cloruro di sodio	Regolatore di tonicità	4,80
Acqua	Diluente	Q.S.

Tabella 2 – formulazione della variante 1b (20,0 mg/ml)

Costituente	Funzione	Concentrazione (mg/mL)
RPL554 (micronizzato)	Composto attivo	20.0
Polisorbato 20 (Tween 20)	Tensioattivo	0,50
Sorbitano monolaurato (Span 20)	Tensioattivo	0,05
Fosfato monosodico monoidrato	Tampone	6,58
Fosfato sodico bibasico anidro	Tampone	6,80
Cloruro di sodio	Regolatore di tonicità	4,80
Acqua	Diluente	Q.S.

Il test mediante saggio è stato effettuato in duplicato. I parametri chiave del metodo sono come segue:

- fase mobile: acetonitrile:acqua:TFA (45:55:0,1);
- colonna: fenile Waters X-Bridge, 3,5 μ m, 150 x 4,6 mm;
- velocità di flusso: 1,5 ml/min;
- volume di iniezione: 10 μ l;
- rilevamento: UV @ 254 nm;
- durata: 6 minuti; e
- concentrazione del campione e standard: 0,1 mg/ml.

La variante 1a è stata conservata in condizioni (i) di una temperatura di 25 °C e un'umidità relativa (UR) del 60% o (ii) di una temperatura di 40 °C e una UR del 75%. L'aspetto, il pH, il saggio, le impurità e la distribuzione granulometrica (PSD) sono stati misurati inizialmente, a 1 mese, a 2 mesi e a 6 mesi (6 mesi solo per le condizioni di 25 °C e UR del 60%). La quantità di impurità è stata misurata mediante HPLC con il tempo di ritenzione relativo (RRT) dell'impurità indicato.

I risultati sono mostrati nelle Tabelle 3 e 4 di seguito.

Tabella 3 – Stabilità della variante 1a nelle condizioni: 25 °C/60% UR

Test	Iniziale	1 mese	2 mesi	6 mesi
Aspetto	Sospensione priva di agglomerati di colore giallo chiaro	Sospensione priva di agglomerati di colore giallo chiaro	Sospensione priva di agglomerati di colore giallo chiaro	Sospensione priva di agglomerati di colore giallo chiaro
pH	6,55	6,59	6,68	6,51
Saggio(mg/g)	0,372	0,374	0,373	0,372
Impurità (% area)				
Totale maggiore	1,8 0,490 (RRT 0,28)	1,8 0,533 (RRT 0,26)	1,6 0,429 (RRT 0,26)	1,9 0,463 (RRT 0,26)
Secondo maggiore	0,401 (RRT 1,13)	0,408 (RRT 1,12)	0,389 (RRT 1,12)	0,432 (RRT 1,12)
PSD (Dv50, µm)	2,282	2,069	2,089	2,133

Tabella 4 – Stabilità della variante 1a nelle condizioni: 40 °C/75% UR

Test	Iniziale	1 mese	2 mesi
Aspetto	Sospensione priva di agglomerati di colore giallo chiaro	Sospensione priva di agglomerati di colore giallo chiaro	Sospensione priva di agglomerati di colore giallo chiaro
pH	6,55	6,91	6,67
Saggio(mg/g)	0,372	0,374	0,377
Impurità (% area)			
Totale maggiore	1,8 0,490 (RRT 0,28)	1,7 0,445 (RRT 0,26)	1,6 0,428 (RRT 0,26)
Secondo maggiore	0,401 (RRT 1,13)	0,409 (RRT 1,12)	0,380 (RRT 1,12)
PSD (Dv50, µm)	2,28	2,10	2,14

La variante 1b è stata conservata in condizioni (i) di una temperatura di 25 °C o un'umidità relativa (UR) del 60% e (ii) di una temperatura di 40 °C e una UR del 75%. L'aspetto, il pH, le impurità e la distribuzione granulometrica (PSD) sono stati misurati inizialmente, a 1 mese e a 2 mesi. La quantità di impurità è stata misurata mediante HPLC con il tempo di ritenzione relativo (RRT) dell'impurità indicato.

I risultati sono mostrati nelle Tabelle 5 e 6 di seguito.

Tabella 5 - Stabilità della variante 1b nelle condizioni: 25 °C/60% UR

Test	Iniziale	1 mese	2 mesi
Aspetto	Sospensione priva di agglomerati di colore giallo	Sospensione priva di agglomerati di colore giallo	Sospensione priva di agglomerati di colore giallo
pH	6,55	6,67	6,68
Saggio(mg/g)	18,72	18,86	18,54
Impurità (% area)			
Totale maggiore	1,2 0,399 (RRT 1,13)	1,2 0,401 (RRT 1,12)	1,2 0,401 (RRT 1,12)
Secondo maggiore	0,306 (RRT 1,11)	0,328 (RRT 1,11)	0,329 (RRT 1,11)
PSD (Dv50, µm)	2,11	2,37	2,05

Tabella 6 - Stabilità della variante 1b nelle condizioni: 40 °C/75% UR

Test	Iniziale	1 mese	2 mesi
Aspetto	Sospensione priva di agglomerati di colore giallo	Sospensione priva di agglomerati di colore giallo	Sospensione priva di agglomerati di colore giallo
pH	6,55	6,76	6,3
Saggio(mg/g)	18,72	18,99	19,01
Impurità (% area)			
Totale maggiore	1,2 0,399 (RRT 1,13)	1,2 0,394 (RRT 1,12)	1,2 0,388 (RRT 1,13)
Secondo maggiore	0,306 (RRT 1,11)	0,308 (RRT 1,11)	0,322 (RRT 1,11)
PSD (Dv50, µm)	2,11	2,09	2,13

Come può essere osservato dalle Tabelle da 3 a 6, la composizione farmaceutica liquida secondo l'invenzione presenta un'eccellente stabilità a lungo termine senza alcuna significativa variazione del pH o della quantità di impurità presenti. Questa stabilità è persino osservata dopo 2 mesi a 40 °C.

Esempio comparativo 1 – formulazione e stabilità della formulazione in soluzione di RPL554

Un test di stabilità simile è stato eseguito per la formulazione in soluzione di RPL554. Una soluzione da 1,0 mg/ml di RPL554 in una soluzione acquosa con tampone citrato/fosfato a un pH approssimativamente di 3.2 è stata mantenuta in condizioni di una temperatura di 25 °C e un'umidità relativa (UR) del 60% per sei mesi. L'aspetto, il pH, il saggio e le impurità presenti sono stati misurati inizialmente e a 6 mesi. I risultati sono mostrati nella Tabella 7 di seguito.

Tabella 7 - Stabilità della soluzione di RPL554 nelle condizioni: 25 °C/60% UR

Test	Iniziale	6 mesi
Aspetto	Una soluzione limpida, leggermente colorata. Priva di contaminazione visibile.	Una soluzione limpida, leggermente colorata. Priva di contaminazione visibile.
pH	3,04	3,00
Saggio	0,98 mg/mL	0,98 mg/mL
Impurità da HPLC		
RRT 0,85	0,19%	0,19%
RRT 0,87	0,15%	0,42%
RRT 1,03	< 0,10%	< 0,10%
RRT 1,09	0,20%	0,16%
RRT 1,12	0,54%	0,57%
RRT 1,14	0,14%	< 0,10%
RRT 1,15	0,11%	< 0,10%

Mentre non vi è alcuna variazione nell'aspetto della soluzione, vi è un significativo aumento della quantità dell'impurità con il valore RRT di 0,87. Questa impurità è stata identificata come un prodotto dell'idrolisi di RPL554. La

soluzione di RPL554 è meno stabile della formulazione in sospensione secondo l'invenzione.

Esempio 2 – distribuzione granulometrica

La distribuzione granulometrica di un campione di RPL554 micronizzato idoneo per l'uso in formulazioni nebulizzate è stata valutata usando diffrazione laser. L'analisi della distribuzione granulometrica è stata effettuata mediante diffrazione laser usando lo Spraytec di Malvern unitamente a una cella di dispersione umida.

I risultati sono come segue: $Dv_{10} = 0,69 \mu\text{m}$; $Dv_{50} = 1,35 \mu\text{m}$; $Dv_{90} = 2,5 \mu\text{m}$.

Esempio 3 – formulazioni

Formulazioni in sospensione e in soluzione di RPL554 sono state preparate come segue. Queste formulazioni sono state usate negli Esempi da 4 a 6.

Sospensione di RPL554 da 20 mg/ml

	Costituente	Quantità	Concentrazione (mg/ml)
Costituenti formulazione (sospensione)	RPL554 - micronizzato	2,12 g ^a	20 mg/ml
	Soluzione umettante	10,0 ml	N/A
	Soluzione tampone	Fino a 100 ml	N/A

^a Include un eccesso del 6% per perdite di fabbricazione previste

Veicolo = come sopra, omettendo RPL554

Soluzione tampone di RPL554

	Costituente	Quantità (g)	Concentrazione (mg/ml)
	Fosfato monosodico monoidrato	32,9	6,58

Fosfato sodico bibasico anidro	34,0	6,80
Cloruro di sodio	24,0	4,80
Acqua per iniezione	Fino a 5000 ml	N/A

Soluzione umettante di RPL554

Costituente	Quantità (g)	Concentrazione (mg/ml)
Polisorbato 20 (Tween 20)	10,0	5,00
Sorbitano monolaurato (Span 20)	1,0	0,50
Soluzione tampone di RPL554	Fino a 2000 ml	N/A

Metodo di preparazione (sospensione)

Soluzione tampone di RPL554: la quantità necessaria di eccipienti veicolo è stata pesata in un contenitore idoneo e portata al volume necessario con acqua per iniezione. Gli eccipienti sono stati agitati magneticamente per 10 minuti fino a quando i sali del campione si sono interamente disciolti. Il pH è stato misurato, registrato e regolato se necessario a $\text{pH } 7.0 \pm 0.3$ usando HCl/NaOH e filtrato attraverso un filtro da $0,22 \mu\text{m}$.

Soluzione umettante di RPL554: la quantità necessaria di polisorbato 20 è stata pesata in un contenitore idoneo ed è stata aggiunta la quantità necessaria di sorbitano monolaurato. La soluzione umettante è stata agitata magneticamente per 10 minuti, quindi trasferita a un contenitore più grande con soluzione tampone e portata al volume finale con la soluzione tampone. La soluzione è stata agitata magneticamente per 10 minuti e filtrata attraverso un filtro da $0,22 \mu\text{m}$.

Veicolo: il volume necessario di soluzione umettante di RPL554 è stato misurato in un contenitore idoneo e portato al volume finale con la soluzione umettante di RPL554, miscelato con un agitatore magnetico

per 10 minuti. Il pH è stato misurato, registrato e regolato se necessario a $\text{pH } 7.0 \pm 0.3$ usando HCl/NaOH.

Sospensione di RPL554 da 20 mg/ml: la quantità necessaria di RPL554 è stata pesata in un becher piccolo ed è stata aggiunta la quantità necessaria di soluzione umettante. La sospensione è stata miscelata usando un miscelatore Silverson dotato di uno schermo a elevato potere di taglio da 5/8" approssimativamente per 1 minuto a 8000 giri al minuto. La miscela è stata trasferita a un nuovo becher asciutto, pulito, risciacquando con soluzione tampone. Il peso necessario è stato ottenuto con soluzione tampone e miscelato usando un miscelatore Silverson dotato di uno schermo a elevato potere di taglio da 1" approssimativamente per 1 minuto a 8000 giri al minuto. È stato misurato il pH, registrato e regolato se necessario a $\text{pH } 7.0 \pm 0.3$ usando HCl/NaOH. La soluzione è stata trasferita nel contenitore finale.

Per le concentrazioni minori delle sospensioni di RPL554, la quantità necessaria di formulazione da 20 mg/ml è stata pesata e diluita al volume necessario con veicolo usando una siringa dotata di un filtro da 0,22 μm . La formulazione è stata delicatamente miscelata su un agitatore magnetico per 5 minuti.

Costituenti formulazione (soluzione)	Soluzione di RPL554 da 1 mg/ml (pH 3.5)	
	Costituente	Quantità
	RPL554	100 mg
	Soluzione acido citrico 0,1 M	22,5 ml
	Soluzione fosfato sodico bibasico dodecaidrato 0,2 M	9,7 ml
	0,9% (p/p) soluzione salina	67,8 ml
	Soluzione di RPL554 da 1,5 mg/ml (pH 2.5)	
	Costituente	Quantità
	RPL554	150 mg

Soluzione acido citrico 0,1 M	45 ml
Soluzione fosfato sodico bibasico dodecaidrato 0,2 M	5 ml
0,9% (p/p) soluzione salina	50 ml

Veicolo: come sopra, omettendo RPL554

Metodo di
preparazione
(soluzione)

Soluzione di acido citrico 0,1 M di RPL554: la quantità necessaria di acido citrico è stata pesata in un contenitore idoneo, portata al volume necessario con 0,9% di soluzione salina e agitata magneticamente fino a quando completamente disciolta.

Soluzione di fosfato sodico bibasico 0,2 M di RPL554: la quantità necessaria di fosfato sodico bibasico anidro è stata pesata in un contenitore idoneo, portata al volume necessario con 0,9% di soluzione salina e agitata magneticamente fino a quando completamente disciolta.

Veicolo: il volume necessario di soluzione di acido citrico, soluzione di fosfato sodico bibasico e 0,9% di soluzione salina è stato misurato in un contenitore idoneo e miscelato attentamente. Il pH è stato misurato e regolato se necessario (pH 3.5 (\pm 0.3) o pH 2.5 (\pm 0.2)) mediante aggiunta goccia a goccia di ulteriore soluzione di acido citrico o fosfato sodico secondo necessità.

Soluzione di RPL554: la quantità necessaria di materiale di prova è stata pesata in un contenitore idoneo, portata al volume finale con veicolo e agitata magneticamente fino a quando completamente disciolta. Il pH è stato misurato e regolato se necessario.

Esempio 4 – profilo tossicocinetico nei ratti

Riassunto

Ratti Han Wistar (5/sexo/gruppo) sono stati dosati mediante inalazione solo nasale una volta al giorno a dosi bersaglio di 2,4, 8,4 o 21,6 mg/kg/giorno di una sospensione di RPL554 secondo l'invenzione per 7 giorni consecutivi (gruppi 2, 3 e 4). 5 ratti/sexo/gruppo aggiuntivi hanno ricevuto la sospensione di veicolo e funto da controlli (gruppo 1). La durata della somministrazione delle dosi è stata di 240 minuti ciascun giorno. Al termine del periodo di trattamento, tutti gli animali sopravvissuti sono stati sottoposti a eutanasia e necropsia. Animali satellite (3/sexo/gruppo) sono stati analogamente dosati e dissanguati il Giorno 7 per l'analisi tossicocinetica. Un gruppo aggiuntivo di animali satellite (3/sexo) è stato dosato mediante inalazione solo nasale una volta al giorno a una dose bersaglio di 2,4 mg/kg/giorno di soluzione di RPL554 per il confronto con la sospensione di RPL554 e dissanguato il Giorno 7 per l'analisi tossicocinetica (gruppo 5). Le concentrazioni medie di aerosol e le dosi conseguite sono presentate nella Tabella 8 di seguito.

Tabella 8 – Concentrazioni medie di aerosol e dosi conseguite

Gruppo	Tipo di formulazione	Livello esposizione bersaglio (µg/l)	Livello esposizione conseguito (µg/l)	Dose bersaglio (mg/kg/giorno)	Dose conseguita (mg/kg/giorno)	Concentrazione formulazione (mg/ml)
1	Sospensione veicolo	0	0,00	0	0	0
2	Sospensione	13	18,10	2,4	3,27	1,5
3	Sospensione	47	55,18	8,4	9,96	4,5
4	Sospensione	121	141,51	21,6	25,49	12
5	Soluzione	13	14,47	2,4	2,62	1,6

Risultati tossicocinetici

Il profilo tossicocinetico della sospensione di RPL554 è stato misurato a dosi differenti (gruppi 2, 3 e 4). Questo è stato confrontato con il profilo tossicocinetico della soluzione di RPL554 nota (gruppo 5). I dosaggi

somministrati al gruppo 2 e al gruppo 5 sono simili. Il gruppo 1 è il gruppo di controllo.

I parametri tossicocinetici di RPL554 sotto forma di sospensione (invenzione) o di soluzione (comparativi) sono stati valutati il giorno 7 della settimana 1 di esposizione giornaliera all'inalazione delle composizioni di RPL554 ai ratti. I risultati sono mostrati nelle Tabelle 10 e 11 di seguito. I parametri misurati sono la concentrazione massima di RPL554 nel plasma del sangue dei ratti (C_{max}), il tempo impiegato per raggiungere la C_{max} (T_{max}) e l'area sotto la curva di dose dopo 8 ore (AUC_{8h}).

Tabella 10 – risultati tossicocinetici per i ratti maschi

Gruppo	Dose conseguita (mg/kg/giorno)	C_{max} (ng/ml)	T_{max} (ore, medio)	AUC_{8h} (ng.h/ml)
1 (veicolo)	0	0	0	0
2(sospensione)	3,27	10,5	4,25	41,9
3(sospensione)	9,96	44,1	4,25	172
4(sospensione)	25,49	94,1	4,083	372
5(soluzione)	2,62	53,4	4,083	139

Tabella 11 – risultati tossicocinetici per i ratti femmina

Gruppo	Dose conseguita (mg/kg/giorno)	C_{max} (ng/ml)	T_{max} (ore, medio)	AUC_{8h} (ng.h/ml)
1 (veicolo)	0	0	0	0
2(sospensione)	3,27	19,9	4,25	79,1
3(sospensione)	9,96	133	4,25	478
4(sospensione)	25,49	573	4,25	2030
5(soluzione)	2,62	52,0	4,083	153

Questi risultati dimostrano che è possibile raggiungere valori di C_{max} sostanzialmente più elevati usando la composizione farmaceutica liquida dell'invenzione (per es., i gruppi 3 e 4) in confronto a una composizione in soluzione (gruppo 5). La dose limitata di solubilità ottenibile da una soluzione di RPL554 evita che tali valori di C_{max} siano conseguiti con una composizione

in soluzione. È stato anche dimostrato che le composizioni in sospensione hanno un rilascio ritardato, con valori di T_{max} maggiori osservati per i gruppi da 2 a 4.

Esempio 5 – profilo tossicocinetico nei cani

È stato valutato il profilo tossicocinetico di sospensioni di RPL554 secondo l'invenzione per cani beagle. Il progetto di studio era come presentato nella Tabella 12 di seguito.

Tabella 12 – progetto di studio, dosi e concentrazioni nominali

Fase	Dose	Trattamento	Formulazione	Dose bersaglio di RPL554 (mg/kg/giorno)	Concentrazione bersaglio di aerosol* $\mu\text{g/l}$	Concentrazione nominale (mg/ml)
1	1	RPL554	Sospensione	1	19,8	1,5
1	2	RPL554	Sospensione	3	59,4	4,5
1	3	RPL554	Sospensione	9	178	16
2		RPL554	Sospensione	9	178	16
3		RPL554	Sospensione e soluzione	0,5	10	1,5 (sospensione) 1,0 (soluzione)

* Concentrazione aerosol calcolata supponendo una durata dell'esposizione di 120 minuti e un peso corporeo di 12 kg

Gli animali hanno ricevuto la sostanza di prova, RPL554, mediante somministrazione per inalazione per 3 giorni a ciascuna dose nella fase a dose variabile (Fase 1), con un periodo di washout di almeno 2 giorni tra le dosi. Nella fase a dose costante (Fase 2), gli animali hanno ricevuto la sostanza di prova per 7 giorni consecutivi. Nella fase di crossover (Fase 3), gli animali hanno ricevuto la sostanza di prova come singola esposizione alla formulazione in sospensione seguita da 2 giorni senza dose seguiti da una singola esposizione alla formulazione in soluzione comparativa.

Risultati tossicocinetici

In seguito a 7 giorni di dosaggio a 9,82 mg/kg/giorno con la sospensione di RPL554 (gruppo 2), i valori di C_{max} per i maschi e le femmine erano di 116

ng/ml e 95,9 ng/ml, rispettivamente, e i valori di AUC_{6h} per i maschi e le femmine erano di 389 ng.h/ml e 289 ng.h/ml, rispettivamente.

Dopo una singola esposizione della sospensione di RPL554 a 0,395 mg/kg, i valori di C_{max} per il maschio e le femmine erano di 13,4 ng/ml e 12,7 ng/ml, rispettivamente, e i valori di AUC_{6h} per il maschio e le femmine erano di 33,9 ng.h/ml e 31,5 ng.h/ml, rispettivamente.

Dopo una singola esposizione della soluzione di RPL554 a 0,543 mg/kg, i valori di C_{max} per il maschio e le femmine erano di 40,9 ng/ml e 34,2 ng/ml, rispettivamente, e i valori di AUC_{6h} per il maschio e le femmine erano di 74,6 ng.h/ml e 62,8 ng.h/ml, rispettivamente.

Si è qui osservato che è possibile conseguire valori elevati di C_{max} e AUC usando la sospensione di RPL554 secondo l'invenzione (per es., 116 ng/ml e 95,9 ng/ml).

I risultati tossicocinetici confermano anche che la formulazione in sospensione fornisce un rilascio ritardato in confronto alla formulazione in soluzione. Questo può essere osservato dai dati dall'esperimento di fase 3 (dosi singole separate della formulazione in sospensione). Questi dati sono presentati nella Tabella 13 di seguito, in cui la formulazione in soluzione (dose bersaglio 0,5 mg/kg/giorno, effettiva 0,543 mg/kg/giorno) è confrontata con la formulazione in sospensione (dose bersaglio 0,5 mg/kg/giorno, effettiva 0,395 mg/kg/giorno). La Tabella 13 mostra le concentrazioni nel plasma (ng/ml) nel tempo in seguito a trattamento con una singola dose della sospensione o una singola dose della soluzione. I due trattamenti sono stati eseguiti a distanza di due giorni. Sono presentati i dati per tutti i tre cani: un cane maschio (61) e due

cani femmina (62 e 64). BLQ si riferisce alle concentrazioni nel plasma inferiori a 1,00 ng/ml.

Tabella 13 – Valori di concentrazione di RPL554 nel plasma (ng/ml) per 3 cani in seguito a una dose con una sospensione di RPL554 e una soluzione di RPL554

Cane	61 (M)		62 (F)		64 (F)	
Tempo (ore)	Sospensione	Soluzione	Sospensione	Soluzione	Sospensione	Soluzione
0	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
0,017	11	39,7	9,83	35,2	13,5	33,1
0,25	13,4	40,9	11,6	26,5	13,7	26,5
0,667	10,4	13	7,26	15,7	10,8	13
1,667	4,57	4,84	2,51	3,31	4,99	3,15
3	2,88	1,23	1,87	1,99	2,42	1,21
4	1,81	BLQ	1,4	BLQ	1,74	BLQ

I dati nella Tabella 13 dimostrano che la formulazione in sospensione di RPL554 porta a un profilo di rilascio più ritardato rispetto alla formulazione in soluzione di RPL554. Per esempio, la concentrazione di RPL554 nel plasma è al di sotto del limite rilevabile 4 ore dopo l'inalazione della formulazione in soluzione per tutti i cani, mentre almeno 1,4 ng/ml di RPL554 sono presenti dopo 4 ore nel plasma del sangue per tutti i cani in seguito all'inalazione della sospensione.

Esempio 6 – funzione polmonare nelle cavie

Introduzione

RPL554 causa la broncoprotezione contro agenti spasmogeni somministrati per via endovenosa quando somministrato come polvere secca o quando preparato come soluzione in soluzione salina acidificata (pH 2.5). Questo antagonismo funzionale (1,5 raddoppiando la diluizione, vale a dire, 2,8 volte) contro la metacolina è stato anche verificato in soggetti umani asmatici

(Franciosi *et al.*, 2013). Questo Esempio ha valutato la broncoprotezione consentita da RPL554 quando presentato come la nuova formulazione in sospensione per la nebulizzazione.

Metodologia

Esposizione al farmaco

Cavie maschio Dunkin Hartley (da 300 a 400 g) sono state poste in una camera ad aerosol su misura ed esposte a veicolo (0,9% soluzione salina pH 2.5), RPL554 (soluzione da 2,5 mg/ml) o RPL554 (soluzione da 1 mg/ml) per un periodo di 15 minuti. Sono stati generati aerosol usando un nebulizzatore a ultrasuoni (Ultraneb 99) ed è stata usata una velocità di flusso di 1 l/min per dirigere la soluzione nebulizzata a una camera ad aerosol che conteneva 4 bracci che consente agli animali di essere trattenuti con il loro tratto respiratorio superiore (vale a dire, il naso) che sporge nella camera ad aerosol.

Dopo questo periodo di esposizione di 15 minuti, è stato consentito agli animali di riprendersi e in seguito, prima delle 2 ore e delle 5 ore dopo l'esposizione al farmaco, gli animali sono stati anestetizzati con uretano (1,5 g/kg) ed è stata realizzata un'incisione sulla linea mediana per esporre la trachea. È stata effettuata una tracheostomia e una cannula tracheale legata in loco e attaccata a uno pneumotacografo che a sua volta è stato collegato a un trasduttore di pressione Validyne (+ 2 cmH₂O) per il rilevamento del flusso. Respiro dopo respiro, sono state misurate le variazioni del flusso d'aria usando un sistema di registrazione della funzione polmonare (LFR, versione 9, Mumed UK) e mostrato in tempo reale su un PC. Il segnale di flusso è stato integrato per fornire una misura del volume corrente.

È stata inserita una cannula nella cavità toracica tra il 3° e il 5° spazio intercostale e collegata al lato negativo di un trasduttore di pressione Validyne (+ 20 cmH₂O). Il lato positivo del trasduttore di pressione è stato collegato al lato dello pneumotacografo prossimo all'animale, al fine di ottenere una misura della pressione transpolmonare (TPP: differenza tra pressione alla bocca e toracica). I parametri di funzione polmonare, la resistenza totale delle vie aeree (RL; cmH₂O.s/l) e la compliance polmonare dinamica (ml/cmH₂O) sono stati ricavati da ciascuna misura del flusso, del volume corrente e della TPP mediante il metodo di integrazione. L'arteria carotidea è stata incannulata per la misurazione della pressione sanguigna, rispettivamente. Sono state stabilite curve cumulative di concentrazione-effetto e la concentrazione provocatoria (CP) di acetilcolina che ha prodotto in modo cumulativo un aumento del 50% della RL (PC50).

Esposizione ad acetilcolina

È stata monitorata la broncocostrizione per acetilcolina (da 0,25 a 16 mg/ml, esposizione di 4 secondi) 2 ore e 5 ore dopo la somministrazione di una soluzione di RPL554 (1 e 2,5 mg/ml) o di veicolo (soluzione salina acidificata pH 3.5 o pH 2.5). Sono stati generati aerosol di acetilcolina con un nebulizzatore Aeroneb[®] Lab (Aerogen Inc.). L'afflusso è stato diretto tramite lo pneumotacografo per la misurazione delle meccaniche respiratorie polmonari, o deviato attraverso il nebulizzatore ai fini della somministrazione del farmaco direttamente nel polmone (meccaniche respiratorie non misurate durante il periodo di esposizione di 4 secondi).

In una serie separata di esperimenti, è stata eseguita la funzione polmonare 2 e 5 ore dopo l'inalazione della nuova formulazione in sospensione di RPL554 (2,5 mg/ml e 10 mg/ml) e del veicolo.

Risultati

Parametri al basale

Resistenza polmonare totale al basale (RL), compliance polmonare dinamica (C_{dyn}), pressione sanguigna arteriosa media (BP) ed emissione del nebulizzatore sono state misurate in animali precedentemente esposti al controllo con veicolo (soluzione salina pH 2.5) e a formulazioni in soluzione di RPL554 (1 mg/ml o 2,5 mg/ml, Figura 1) e a nuove formulazioni in sospensione di RPL554 (2,5 mg/ml e 10 mg/ml, Figura 2). I parametri respiratori e cardiovascolari al basale sono stati ottenuti prima dell'esposizione all'acetilcolina e sono stati monitorati 2 e 5 ore dopo l'esposizione a soluzione salina o RPL554 in cavie anestetizzate.

Parametri della funzione polmonare

In generale, RL rappresenta variazioni nel diametro delle vie aeree nelle vie aeree centrali in seguito all'attivazione dei recettori muscarinici sui muscoli lisci delle vie aeree in questa regione del polmone. È stata scelta l'acetilcolina per la sua breve durata d'azione.

1. Formulazione in soluzione di RPL554

L'acetilcolina somministrata a cavie anestetizzate per via inalatoria ha causato una risposta broncocostrittrice dose-dipendente come determinato dalle variazioni della RL misurate 2 ore e 5 ore dopo l'esposizione a soluzione salina e RPL554 (soluzione da 1 mg/ml, 2,5 mg/ml).

1.1 - Analisi dell'acetilcolina RL PC50

L'analisi post-hoc della media aritmetica ha dimostrato una significativa broncoprotezione al punto di 2 ore per la soluzione di RPL554 da 1 mg/ml (diff. media = 3,5 (da 0,11 a 8,83) mg/ml, $P = 0,0445$) e da 2,5 mg/ml al punto temporale di 2 ore (4,7 (da 0,4 a 9) mg/ml, $P = 0,0357$) e a quello di 5 ore (3,4 (da 0,9 a 6) mg/ml, $P = 0,0133$). Il grado di broncoprotezione era meno evidente a 5 ore per la soluzione di RPL554 da 1 mg/ml (2,5 (da -0,17 a 5,2) mg/ml, $P = 0,0628$).

È stata osservata una differenza significativa tra il gruppo della soluzione di RPL554 rispetto a quello della soluzione salina a 2 ore (RPL554 da 1 mg/ml, $P = 0,0190$ non regolato) e a 5 ore (2,5 mg/ml, $P = 0,0095$ non regolato) (Figura 1).

2. Nuova formulazione in sospensione di RPL554

L'acetilcolina somministrata a cavie anestetizzate per via inalatoria ha causato una broncocostrizione dose-dipendente come determinato dalle variazioni della RL misurata 2 ore e 5 ore dopo l'esposizione alla soluzione salina e alla sospensione di RPL554 (2,5 mg/ml e 10 mg/ml). È stata anche registrata simultaneamente una riduzione dose-dipendente della compliance polmonare al basale (C_{dyn}) in seguito alle concentrazioni crescenti di acetilcolina 2 ore e 5 ore dopo l'esposizione alla soluzione salina o alla sospensione di RPL554 (2,5 mg/ml e 10 mg/ml).

2.1 – Analisi dell'acetilcolina RL PC50

L'analisi della variazione dei dati log₂-trasformati per l'acetilcolina RL PC50 ha rivelato un effetto complessivo del farmaco a 2 ore ($P = 0,0238$). Per il gruppo del tempo di 2 h, questo è stato riflesso da una differenza significativa tra la sospensione di RPL554 da 10 mg/ml e il gruppo del veicolo (differenza

media delle volte = 2,67 (da 1,12 a 6,36), $P < 0,05$). Nonostante la differenza media maggiore tra RPL554 (sospensione da 10 mg/ml) rispetto al veicolo in corrispondenza della variazione di 14 volte al punto temporale di 5 ore (da 0,5 a 400), l'ampio intervallo di confidenza è la ragione per cui non è stata conseguita una differenza statistica (Figura 2, pannello superiore).

I dati relativi al veicolo per i punti temporali di 2 e 5 ore sono stati combinati e rianalizzati (Figura 2, pannello inferiore). Vi era un significativo effetto complessivo del trattamento ($P = 0,0016$) che era riflesso da un grado significativo di broncoprotezione con la sospensione di RPL554 da 2,5 mg/ml (2,52 volte (da 1 a 5,72), $P < 0,05$ e RPL554 da 10 mg/ml (4,67 volte (da 2 a 11), $P < 0,05$). Al punto temporale di 5 ore, la sospensione di RPL554 da 10 mg/ml ha determinato un grado significativo di broncoprotezione (2,77 volte (da 1,3 a 6,0) (Figura 2, pannello inferiore).

Riassunto

RPL554 ha inibito la broncocostrizione indotta da acetilcolina somministrata aerosolizzata quando misurata 2 e 5 ore dopo l'esposizione al farmaco. Sia le formulazioni in soluzione di RPL554 (1 mg/ml, 2,5 mg/ml) e le nuove formulazioni in sospensione di RPL554 (2,5 mg/ml, 10 mg/ml) hanno prodotto una broncoprotezione statisticamente significativa.

Esempio 7 – studio farmacocinetico in esseri umani

Uno studio di fase I, randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, è stato effettuato per valutare la sicurezza, la tollerabilità e la farmacocinetica di singole dosi inalate di formulazione in sospensione di RPL554 secondo l'invenzione, somministrate mediante nebulizzatore a soggetti maschi sani di età da 18 a 50 anni, compresi.

La dose nominale di formulazione in sospensione era approssimativamente di 1,5 mg, che è essenzialmente equivalente alla dose da 0,018 mg/kg precedentemente rivelatasi ben tollerata in studi clinici con la formulazione in soluzione.

La formulazione in sospensione usata era una sospensione sterile per la nebulizzazione contenente 1,5 mg di sostanza farmacologica micronizzata di RPL554 in 5 ml di soluzione salina tamponata con fosfato a pH 7, con tensioattivi (Tween 20 e Span 20) (come descritto nell'Esempio 1 di cui sopra, ma con una concentrazione differente di RPL554). Il dosaggio della sospensione è stato eseguito usando un nebulizzatore a getto standard (PARI LC Sprint).

Sono stati raccolti campioni di sangue (4 ml a ciascun punto temporale) a intervalli di tempo appropriati dopo la somministrazione. I campioni sono stati raccolti mediante venipuntura o tramite cannula a permanenza nell'avanbraccio in provette con eparina di litio e sono stati immediatamente raffreddati (bagno di ghiaccio). Il sangue è stato centrifugato entro 15 minuti dalla raccolta. Il plasma è stato separato in una centrifuga refrigerata (circa 4 °C) a 1100 g per 15 minuti e trasferito in provette di polipropilene. La concentrazione dell'attivo è stata in seguito misurata.

I risultati medi sono presentati nella Figura 3, che mostra le curve di concentrazione media per i soggetti dopo la somministrazione delle formulazioni in soluzione o in sospensione. I risultati per la formulazione in soluzione sono stati ricavati da uno studio clinico precedente (*The Lancet Respiratory Medicine* Volume 1, n. 9, pagg. da 714 a 727, novembre 2013) che ha usato una soluzione sterile per la nebulizzazione contenente RPL554 disciolto in soluzione salina tamponata con citrato-fosfato a pH 3.2. La quantità somministrata tramite

nebulizzatore era tale che la dose nominale di RPL554 era di 0,018 mg/kg (~1,26 mg per una persona di 70 kg).

I parametri farmacocinetici medi misurati durante lo studio sono presentati nella Tabella 14 di seguito.

Tabella 14

Formulazione	C _{max} (pg/ml)	AUC _{inf} (pg.h/ml)	Emivita (h)
Soluzione	870	1833	3
Sospensione	393	3795	10

I valori nella Tabella 14 dimostrano che la formulazione in sospensione secondo l'invenzione ha un profilo farmacocinetico sostanzialmente migliorato in confronto alla formulazione in soluzione comparativa. In particolare, l'area sotto la curva (AUC) e l'emivita sono entrambe significativamente aumentate. Questo dimostra che la formulazione in sospensione fornisce un modo inaspettatamente migliorato mediante cui RPL554 può essere somministrato mediante inalazione.

Esempio 8 – studio di stabilità di dodici mesi

Tre lotti della formulazione in sospensione sono stati realizzati con le composizioni presentate nella Tabella 15 di seguito.

Tabella 15

Costituente	Concentrazione (mg/ml)
RPL554 (API termotrattato)	0,5, 2,5 e 10
Polisorbato 20 (Tween 20)	0,5
Sorbitano monolaurato (Span 20)	0,05
Fosfato monosodico monoidrato	6,58
Fosfato sodico bibasico anidro	6,80
Cloruro di sodio	4,80
Acqua per iniezione	Da pesare

Test analitico

Il test analitico è stato effettuato dopo 1, 3, 6 e 12 mesi di conservazione delle formulazioni a 25 °C e 60% UR. I risultati dei 12 mesi sono descritti di seguito.

Aspetto

Il test dell'aspetto è stato effettuato visivamente su un campione singolo. Il campione di placebo è stato riscontrato come soluzione limpida, incolore. I campioni di resistenza da 0,5 mg/ml erano una sospensione di colore giallo chiaro priva di agglomerati visibili, mentre i campioni di resistenza da 2,5 mg/ml e 10 mg/ml apparivano come sospensioni di colore giallo prive di agglomerati visibili.

pH

La determinazione del pH è stata effettuata su un campione singolo. I risultati sono mostrati nella Tabella 16.

Tabella 16

Numero lotto	Resistenza	pH
BN011/14	0,5mg/ml	6.656
BN010/14	2,5mg/ml	6.652
BN009/14	10mg/ml	6.655
BN008/14	Placebo	6.661

È stato riscontrato che tutte le tre formulazioni attive e il placebo avevano un pH di 6.7 al punto temporale del dodicesimo mese.

Saggio

Il test mediante saggio è stato effettuato in duplicato. I parametri chiave del metodo sono riassunti come segue:

Fase mobile	Acetonitrile:acqua : TFA 45:55:0,1
Colonna	Fenile Waters X-Bridge , 3,5 µm, 150 × 4,6 mm, (numero parte 186003335)
Temperatura colonna	40°C
Velocità di flusso	1,5 ml/min
Volume di iniezione	10 µl
Rilevamento	UV, 254 nm
Durata	6 minuti
Temperatura autocampionatore	Ambiente
Concentrazione standard	0,1 mg/ml

I risultati del saggio sono mostrati nella Tabella 17.

<i>Tabella 17</i>				
Numero lotto	Resistenza	Prep 1	Prep 2	Media
BN011/14	0,5mg/mL	0,5180	0,5178	0,52
BN010/14	2,5mg/mL	2,6541	2,6407	2,65
BN009/14	10mg/mL	10,4219	10,4926	10,46

I risultati del saggio per le sospensioni attive di ciascuna resistenza al punto temporale del dodicesimo mese non hanno mostrato alcuna variazione dal punto temporale iniziale.

Sostanze correlate

La determinazione delle sostanze correlate è stata effettuata in duplicato.

I parametri chiave del metodo sono riassunti come segue.

Fase mobile	A - Acqua purificata/acetonitrile/TFA (95/5/0,1). B – Acetonitrile/acqua/TFA (95/5/0,1).		
Colonna	Fenile X-Bridge 4,6 x 150 mm dimensione di particella 3,5 µm (ex - Waters; #186003335)		
Temperatura colonna	30°C		
Temperatura autocampionatore	Ambiente		
Velocità di flusso	1,0 ml/min		
Volume di iniezione	10 µl		
Rilevamento	UV, 254 nm		
Gradiente	Tempo (min)	%A	%B
	0	100	0
	2	100	0
	15	0	100
	25	0	100
	27	100	0
	37	100	0
Diluente	Acetonitrile : acqua (50 : 50)		
Concentrazione campione	0,2mg/ml		
Concentrazione standard	2 µg/ml		

I risultati dalla determinazione delle sostanze correlate delle sospensioni sono presentati nella Tabella 18.

Tabella 18 – Risultati dall'analisi delle sostanze correlate delle sospensioni di RPL554 (come %LC)

Lotto BN011/14 – (0,5 mg/ml) – 25 °C/60% UR

RRT	%LC		Media
	T1	T2	
0,78	0,0776	0,0764	0,08
0,86	0,1028	0,1046	0,10
0,92	0,2084	0,2101	0,21
0,93	0,1875	0,1846	0,19
1,09	0,0548	0,0562	0,06
1,11	0,4130	0,4142	0,41
Totale			1,05

Lotto BN010/14 – (2,5 mg/ml) – 25 °C/60% UR

RRT	%LC		Media
	T1	T2	
0,77	0,0779	0,0792	0,08
0,85	0,1041	0,1051	0,10
0,92	0,2184	0,2227	0,22
0,93	0,1768	0,1746	0,18
1,11	0,4226	0,4270	0,42
Totale			1,00

Lotto BN009/14 – (10 mg/ml) – 25 °C/60%UR

RRT	%LC		Media
	T1	T2	
0,78	0,0769	0,0789	0,08
0,86	0,1016	0,1031	0,10
0,92	0,2056	0,2194	0,21
0,93	0,1819	0,1684	0,18
1,11	0,4137	0,4250	0,42
Totale			0,99

I risultati delle sostanze correlate per le sospensioni attive di ciascuna resistenza al punto temporale del dodicesimo mese erano simili al punto temporale iniziale.

Distribuzione granulometrica (PSD)

Il metodo della distribuzione granulometrica è stato effettuato usando uno Spraytec con le impostazioni descritte di seguito.

Proprietà ottiche: Particella: RI (reale): 1,50 (particella opaca standard); RI (immaginario): 0,50; Densità: 1,00; Disperdente (acqua); Disperdente RI: 1,33

Disperdente usato per l'analisi del campione: 1% di polisorbato 20 in acqua deionizzata

Impostazioni dell'unità di controllo: Velocità dell'agitatore di 1000 giri al minuto

Tempo di misurazione: Tempo di campionamento: 30 secondi; Tempo di fondo: 10 secondi

I risultati sono mostrati nella Tabella 19.

Tabella 19 – Risultati dalla determinazione della granulometria mediante diffrazione laser di sospensioni di RPL554 (in μm)

Numero lotto	Resistenza	Dv10	Dv50	Dv90
BN011/14	0,5 mg/mL	0,7946	1,577	3,168
BN010/14	2,5mg/mL	0,7872	1,589	3,119
BN009/14	10mg/mL	0,8012	1,566	2,976

I profili di distribuzione granulometrica erano simili per tutte le 3 resistenze al punto temporale del dodicesimo mese e non hanno mostrato alcuna variazione in confronto al punto temporale iniziale.

Valutazione microscopica

La valutazione microscopica è stata effettuata valutando visivamente le formulazioni usando un microscopio G3. Non è stato osservato alcun aggregato in nessuno dei lotti testati, sebbene alcuni grandi agglomerati sparsi siano stati occasionalmente osservati per le sospensioni da 2,5 mg/ml e 10 mg/ml. La valutazione ha determinato che non vi era alcuna variazione in confronto al punto temporale iniziale.

Tasso di rilascio e dose rilasciata totale

Il tasso di rilascio e la dose rilasciata totale sono stati eseguiti su 3 fiale per lotto. Le sospensioni sono state erogate e somministrate usando una combinazione di nebulizzatore PARI LC PLUS® / compressore PARI TurboBOY S®. I risultati dal tasso di rilascio e dalla dose rilasciata totale sono presentati nella Tabella 20.

Tabella 20 – Risultati dalla determinazione del tasso di rilascio e della dose rilasciata totale usando il nebulizzatore PARI LC PLUS

Lotto BN011/14 0,5 mg/ml

Numero replicato	T1	T2	T3
Peso iniziale (g)	36,8175	36,7852	36,8030
Peso finale (g)	32,6399	32,7369	32,6272
Massa rilasciata (g)	4,1776	4,0483	4,1758
Tempo di rilascio totale (s)	900	1020	960
Tasso di rilascio (mg/min) (nel primo minuto)	0,136	0,130	0,137
Tasso medio di rilascio (mg/min)	0,1		
Saggio* (mg)	1,179	1,144	1,198
Saggio medio* (mg)	1,2		
% Efficienza	54,50	54,56	55,39
% Media di efficienza	54,8		

Lotto BN010/14 2,5 mg/ml

Numero replicato	T1	T2	T3
Peso iniziale (g)	37,0977	38,7543	37,2942
Peso finale (g)	32,8590	34,9311	32,9187
Massa rilasciata (g)	4,2387	4,3632	4,3755
Tempo di rilascio totale (s)	1020	1020	1020
Tasso di rilascio (mg/min) (nel primo minuto)	0,303	0,229	0,335
Tasso medio di rilascio (mg/min)	0,3		
Saggio* (mg)	6,212	6,684	6,565
Saggio medio* (mg)	6,5		
% Efficienza	55,36	57,86	56,68
% Media di efficienza	56,6		

Lotto BN009/14 10 mg/ml

Numero replicato	T1	T2	T3
Peso iniziale (g)	36,9365	38,4396	37,0922
Peso finale (g)	32,6608	34,2031	32,7858
Massa rilasciata (g)	4,2757	4,2365	4,3064
Tempo di rilascio totale (s)	1080	1140	1080
Tasso di rilascio (mg/min) (nel primo minuto)	1,326	1,095	1,221
Tasso medio di rilascio (mg/min)	1,2		
Saggio* (mg)	24,279	24,168	24,705
Saggio medio* (mg)	24,4		
% Efficienza	54,30	54,55	54,86
% Media di efficienza	54,6		

* il saggio è totalmente rilasciato

%Efficienza è la dose totale rilasciata/dose teorica rilasciata (calcolata usando la massa rilasciata e la resistenza di formulazione dal saggio)

La dose totale rilasciata e il tasso di rilascio per tutte le resistenze erano simili al punto temporale iniziale. L'efficienza di rilascio di tutte le sospensioni era coerente con i punti temporali precedenti.

Distribuzione granulometrica aerodinamica (APSD)

La determinazione della distribuzione granulometrica aerodinamica (APSD) è stata effettuata su 3 fiale per lotto per condizione usando il Next Generation Impactor (NGI). Le sospensioni sono state erogate e somministrate usando una combinazione di nebulizzatore PARI LC PLUS® / compressore PARI TurboBOY S®. I risultati dalla determinazione APSD sono presentati nella Tabella 21. I risultati sono stati immessi nel programma CITDAS (versione 3.10) per calcolare la dose di particelle fini usando un valore di cut-off di 5 µm e i risultati ottenuti dai calcoli sono anch'essi presentati nella Tabella 21.

Tabella 21 – Risultati dalla distribuzione granulometrica aerodinamica mediante NGI (come RPL554 in mg) usando il nebulizzatore PARI LC PLUS

Lotto BN011/14 - (0,5 mg/ml) 25 °C/60%UR

Stadio	NGI 1	NGI 2	NGI 3	Media
Gola	0,05495	0,09324	0,08583	0,08
Stadio 1	0,13433	0,12798	0,12692	0,13
Stadio 2	0,26114	0,18827	0,22637	0,23
Stadio 3	0,40347	0,29208	0,39028	0,36
Stadio 4	0,49538	0,41178	0,46929	0,46
Stadio 5	0,23507	0,24668	0,29097	0,26
Stadio 6	0,07792	0,06313	0,08504	0,08
Stadio 7	0,01105	0,01100	0,01525	0,01
MOC	0,00034	0,00169	0,00151	0,00
Somma	1,67365	1,43585	1,69147	1,60
Massa rilasciata (g)	4,2864	4,1465	4,2623	4,23
FPD $\leq 5\mu\text{m}^*$	0,735	0,667	0,785	0,7
FPD/massa rilasciata (mg/g)	0,171	0,161	0,184	0,2
FPF (FPD come % dose totale) $\leq 5\mu\text{m}^*$	43,9	46,4	46,4	45,6
GSD*	2,0	2,2	2,0	2,1
MMAD*	5,3	5,0	5,1	5,2

Lotto BN010/14 - (2,5 mg/ml) 25 °C/60%UR

Stadio	NGI 1	NGI 2	NGI 3	Media
Gola	0,35731	0,43867	0,47848	0,42
Stadio 1	0,71616	1,04125	0,93292	0,90
Stadio 2	1,28121	1,58441	1,43900	1,43
Stadio 3	1,98259	2,21051	1,95403	2,05
Stadio 4	2,41709	2,37565	2,23993	2,34
Stadio 5	1,69766	1,45824	1,39429	0,52
Stadio 6	0,54927	0,43922	0,37542	0,45
Stadio 7	0,07994	0,07293	0,06443	0,07
MOC	0,00163	0,00151	0,00540	0,00
Somma	9,08286	9,62239	8,88390	9,20
Massa rilasciata (g)	4,3881	4,5659	4,3137	4,42
FPD $\leq 5\mu\text{m}^*$	4,356	3,945	3,702	4,0
FPD/massa rilasciata (mg/g)	0,993	0,864	0,858	0,9
FPF (FPD come % dose totale) $\leq 5\mu\text{m}^*$	48,0	41,0	41,7	43,5
GSD*	2,1	2,1	2,1	2,1
MMAD*	5,0	5,7	5,5	5,4

Lotto BN009/14 - (10 mg/ml) 25 °C/60%UR

Stadio	NGI 1	NGI 2	NGI 3	Media
Gola	1,82141	1,46478	1,70097	1,66
Stadio 1	2,99033	3,28692	3,75069	3,34
Stadio 2	5,51909	6,88069	7,01532	6,47
Stadio 3	8,46593	10,48679	10,09839	9,68
Stadio 4	9,42726	10,16201	9,36013	9,65
Stadio 5	6,30967	4,85282	4,67990	5,28
Stadio 6	1,84396	0,98008	1,00599	1,28
Stadio 7	0,28335	0,13666	0,12275	0,18
MOC	0,00383	0,00710	0,00108	0,00
Somma	36,66483	38,25785	37,73522	37,55
Massa rilasciata (g)	4,3787	4,6309	4,4044	4,47
FPD $\leq 5\mu\text{m}^*$	16,313	14,318	13,490	14,7
FPD/massa rilasciata (mg/g)	3,726	3,092	3,063	3,3
FPF (FPD come % dose totale) $\leq 5\mu\text{m}^*$	44,5	37,4	35,7	39,2
GSD*	2,0	1,9	1,9	2,0
MMAD*	5,3	5,9	6,1	5,8

* calcolato usando CITDAS su dati non arrotondati. Abbreviazioni: FPD: dose di particelle fini; FPF: frazione di particelle fini; GSD: distribuzione di dimensione geometrica; MMAD: diametro aerodinamico mediano di massa; MOC: collettore a micro-orifizi.

Stabilità al 12° mese

Le Tabelle 22 (per 0,5 mg/ml), 23 (per 2,5 mg/ml) e 24 (per 10 mg/ml) di seguito combinano i dati dei 12 mesi sopra descritti con i dati corrispondenti per i punti temporali dei mesi 1, 3 e 6 per le formulazioni in sospensione di RPL554 dell'invenzione.

(Si noti: i picchi di impurità con * nelle Tabelle 22, 23 e 24 sono stati osservati come doppietto ma erano stati osservati come picco singolo al punto temporale iniziale. Questo è probabilmente dovuto a una nuova colonna usata che ha fornito una migliore separazione e non si ritiene sia un segno di degradazione).

Riassunto

Le sospensioni di RPL554 per la nebulizzazione da 0,5 mg/ml (BN011/14), 2,5 mg/ml (BN010/14) e 10 mg/ml (NG009/14) e il placebo associato (BN008/14) sono stati fabbricati e posti in stabilità a 25 °C/60%UR e sono stati testati al punto temporale del 12° mese.

I risultati hanno mostrato che non vi è stata essenzialmente alcuna variazione in nessuno dei lotti testati al punto temporale del 12° mese e hanno confermato che le sospensioni di RPL554 per la nebulizzazione sono rimaste stabili per 12 mesi a 25 °C/60% UR.

Tabella 22 (0,5 mg/ml) Test	Iniziale	1 mese	3 mesi	6 mesi	12 mesi
Condizioni di conservazione	N/A	25°C/60%UR	25°C/60%UR	25°C/60%UR	25°C/60%UR
Aspetto	Sospensioni prive di agglomerati visibili di colore giallo chiaro	Sospensioni prive di agglomerati visibili di colore giallo chiaro	Sospensioni prive di agglomerati visibili di colore giallo chiaro	Sospensioni prive di agglomerati visibili di colore giallo chiaro	Sospensioni prive di agglomerati visibili di colore giallo chiaro
pH	6,7	6,7	6,6	6,6	6,7
Saggio medio (n=2) (mg/mL)	0,51	0,51	0,52	0,52	0,52
Impurità medie (n=2) (%LC)					
Totale	0,98	1	0,89	0,95	1,05
Maggiore	0,39 (RRT 1,11)	0,23 (RRT 0,92)	0,38 (RRT 1,10)	0,38 (RRT 1,10)	0,41 (RRT 1,11)
Secondo maggiore	0,23 (RRT 0,92)	0,20 (RRT 1,11)* 0,18 (RRT 1,10)*	0,22 (RRT 0,92)	0,22 (RRT 0,93)	0,21 (RRT 0,92)
PSD (µm)	Dv10= 0,7646	Dv10= 0,7721	Dv10= 0,7823	Dv10= 0,8036	Dv10= 0,7946
	Dv50= 1,534	Dv50= 1,542	Dv50= 1,56	Dv50= 1,585	Dv50= 1,577
	Dv90= 2,999	Dv90= 2,991	Dv90= 3,084	Dv90= 3,158	Dv90= 3,168
FPD media (mg)	0,4	0,6	0,6	0,6	0,7
FPD media/massa rilasciata (n=3) (mg/g)	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2
MMAD medio (n=3)	5,4	5,7	5,4	5,6	5,2
GSD media (n=3)	2	2	2,1	2	2,1
Peso medio riempimento fiala (n=5)(g)	5,0 (n=10)	5,1	5,1	5,1	5,1
Dose rilasciata totale media (n=3) (mg)	1,1	1,1	1,2 (n=5)	1	1,2
Tasso rilascio medio (n=3) (mg/min) (nei primi due minuti)	0,1	0,1	0,1 (n=5)	0,1	0,1
% Efficienza media (n=3)	53,8	55,5	56,0 (n=5)	51,4	54,8

Tabella 23 (2,5 mg/mL) Test	Iniziale	1 mese 25°C/60%UR	3 mesi 25°C/60%UR	6 mesi 25°C/60%UR	12 mesi 25°C/60%UR
Condizioni di conservazione	N/A	25°C/60%UR	25°C/60%UR	25°C/60%UR	25°C/60%UR
Aspetto	Sospensioni prive di agglomerati visibili di colore giallo	Sospensioni prive di agglomerati visibili di colore giallo	Sospensioni prive di agglomerati visibili di colore giallo	Sospensioni prive di agglomerati visibili di colore giallo	Sospensioni prive di agglomerati visibili di colore giallo
pH	6,7	6,7	6,7	6,6	6,7
Saggio medio (n=2) (mg/mg)	2,6	2,57	2,64	2,63	2,65
Impurità medie (n=2) (%LC)					
Totale	1,02	0,92	0,89	0,98	1
Maggiore	0,41 (RRT 1,10)	0,23 (RRT 0,92)	0,39 (RRT 1,10)	0,41 (RRT 1,10)	0,42 (RRT 1,11)
Secondo maggiore	0,23 (RRT 0,92)	0,20 (RRT 1,11)* 0,18 (RRT 1,10)*	0,22 (RRT 0,93)	0,23 (RRT 0,93)	0,22 (RRT 0,92)
PSD (µm)	Dv10= 0,7964	Dv10= 0,7981	Dv10=0,7943	Dv10=0,7851	Dv10=0,7872
	Dv50= 1,586	Dv50= 1,569	Dv50= 1,561	Dv50= 1,583	Dv50= 1,589
	Dv90= 3,075	Dv90= 3	Dv90=2,98	Dv90=3,099	Dv90=3,119
FPD media (mg)	3	3,1	3,4	3,5	4
FPD media/massa rilasciata (n=3) (mg/g)	0,7	0,7	0,8	0,8	0,9
MMAD medio (n=3)	6,0	6,1	5,8	6	5,4
GSD media (n=3)	1,9	1,9	1,9	2	2,1
Uniformità media contenuto fiala (n=10)	Pass EP 2.9.6 e 2.9.40	N/A	N/A	N/A	N/A
Peso medio riempimento fiala (n=5) (g)	5,1 (n=10)	5,2	5,2	5,3	5,3
Dose rilasciata totale media (n=3) (mg)	6	6,2	4,5	5,7	6,5
Tasso rilascio medio (n=3) (mg/min) (nel primo minuto)	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3
% Efficienza media (n=3)	56,3	55,5	41,2	55	56,6

Tabella 24 (10 mg/mL) Test	Iniziale	1 mese 25°C/60%UR	3 mesi 25°C/60%UR	6 mesi 25°C/60%UR	12 mesi 25°C/60%UR
Condizioni di conservazione	N/A	25°C/60%UR	25°C/60%UR	25°C/60%UR	25°C/60%UR
Aspetto	Sospensione priva di agglomerati visibili di colore giallo	Sospensione priva di agglomerati visibili di colore giallo	Sospensione priva di agglomerati visibili di colore giallo	Sospensione priva di agglomerati visibili di colore giallo	Sospensione priva di agglomerati visibili di colore giallo
pH	6,7	6,7	6,7	6,6	6,7
Saggio medio (n=2) (mg/ml)	10,24	10,16	10,28	10,23	10,46
Impurità medie (n=2) (%LC)					
Totale	0,98	0,92	0,89	0,97	0,99
Maggiore	0,40 (RRT 1,11)	0,23 (RRT 0,92)	0,39 (RRT 1,10)	0,41 (RRT 1,10)	0,42 (RRT 1,11)
Secondo maggiore	0,23 (RRT 0,92)	0,21 (RRT 1,11)* 0,18 (RRT 1,10)*	0,22 (RRT 0,93)	0,22 (RRT 0,93)	0,21 (RRT 0,92)
PSD (µm)	Dv10= 0,7884 Dv50= 1,564 Dv90= 3,02	Dv10= 0,7877 Dv50= 1,55 Dv90= 2,965	Dv10= 0,7954 Dv50= 1,545 Dv90= 2,909	Dv10= 0,7756 Dv50= 1,558 Dv90= 3,059	Dv10= 0,8012 Dv50= 1,566 Dv90= 2,976
FPD media (mg)	12,2	12,7	14,2	13,3	14,7
FPD media/massa rilasciata (n=3) (mg/g)	2,9	3	3,1	2,2 (n=2)	3,3
MMAD medio (n=3)	6,1	5,9	6	5,7 (n=2)	5,8
GSD media (n=3)	1,9	1,9	1,9	2,0 (n=2)	2
Uniformità media contenuto fiala (n=10)	Pass EP 2.9.6 e 2.9.40	N/A	N/A	N/A	N/A
Peso medio riempimento fiala (n=5) (g)	5,2 (n=10)	5,1	5,1	5,1	5,1
Dose rilasciata totale media (n=3) (mg)	25,5	23,4	26,4	22,7	24,4
Tasso rilascio medio (n=3) (mg/min) (nel primo minuto)	1,3	1,4	1,4	1,2	1,2
% Efficienza media (n=3)	57,3	52,8	56,7	53,5	54,6

Esempio 9 – analisi al sesto mese a condizioni accelerate (40 °C/75% UR)

Studi di stabilità accelerata a 40 °C/75% UR sono stati anch'essi continuati fino al sesto mese. I risultati di questi sono mostrati nella Tabella 25 (per 0,5 mg/ml), nella Tabella 26 (per 2,5 mg/ml) e nella Tabella 27 (per 10 mg/ml).

(Come osservato nell'Esempio 8, i picchi di impurità marcati con * sono stati osservati come doppietto, ma erano stati osservati come picco singolo al punto temporale iniziale. Questo è probabilmente dovuto a una nuova colonna usata che ha fornito una migliore separazione e non si ritiene sia un segno di degradazione).

I risultati hanno mostrato che non vi era essenzialmente alcuna variazione in nessuno dei lotti testati al punto temporale del 6° mese e hanno confermato che le sospensioni di RPL554 per la nebulizzazione hanno una stabilità eccellente, rimanendo stabili per 6 mesi a 40 °C/75% UR.

Tabella 25 (0,5 mg/mL) Test	Iniziale	1 mese	3 mesi	6 mesi
Condizioni di conservazione	N/A	40°C/75%UR	40°C/75%UR	40°C/75%UR
Aspetto	Sospensioni prive di agglomerati visibili di colore giallo chiaro	Sospensioni prive di agglomerati visibili di colore giallo chiaro	Sospensioni prive di agglomerati visibili di colore giallo chiaro	Sospensioni prive di agglomerati visibili di colore giallo chiaro
pH	6,7	6,7	6,6	6,6
Saggio medio (n=2) (mg/ml)	0,51	0,51	0,52	0,52
Impurità medie (n=2) (%LC)				
Totale	0,98	0,9	0,9	0,98
Maggiore	0,39 (RRT 1,11)	0,23 (RRT 0,92)	0,37 (RRT 1,10)	0,37 (RRT 1,10)
Secondo maggiore	0,23 (RRT 0,92)	0,20 (RRT 1,11)* 0,18 (RRT 1,10)*	0,22 (RRT 0,92)	0,22 (RRT 0,93)
PSD (µm)	Dv10= 0,7646	Dv10= 0,7902	Dv10= 0,7749	Dv10= 0,8324
	Dv50= 1,534	Dv50= 1,56	Dv50= 1,586	Dv50= 1,573
	Dv90= 2,999	Dv90= 3,026	Dv90= 3,335	Dv90= 2,899
FPD media (mg)	0,4	0,6	0,7	0,6
FPD media/massa rilasciata (n=3) (mg/g)	0,1	0,2	0,2	0,1
MMAD medio (n=3)	5,4	5,8	5,3	5,5
GSD media (n=3)	2	1,9	2	2,1
Uniformità media contenuto fiala (n=10)	Pass EP 2.9.6 e 2.9.40	N/A	N/A	N/A
Peso medio riempimento fiala (n=5) (g)	5,0 (n=10)	5,1	5,1	5,1
Dose rilasciata totale media (n=3) (mg)	1,1	1,1	1,2	1,1
Tasso rilascio medio (n=3) (mg/min) (nei primi due min)	0,1	0,1	0,1	0,1
% Efficienza media (n=3)	53,8	55,1	54,3	53,4

Tabella 26 (2,5 mg/mL) Test	Iniziale	1 mese	3 mesi	6 mesi
Condizioni di conservazione	N/A	40°C/75%UR	40°C/75%UR	40°C/75%UR
Aspetto	Sospensioni prive di agglomerati visibili di colore giallo	Sospensioni prive di agglomerati visibili di colore giallo	Sospensioni prive di agglomerati visibili di colore giallo	Sospensioni prive di agglomerati visibili di colore giallo
pH	6,7	6,7	6,6	6,6
Saggio medio (n=2) (mg/ml)	2,6	2,58	2,64	2,63
Impurità medie (n=2) (%LC)				
Totale	1,02	0,92	0,9	0,99
Maggiore	0,41 (RRT 1,10)	0,23 (RRT 0,92)	0,38 (RRT 1,10)	0,40 (RRT 1,10)
Secondo maggiore	0,23 (RRT 0,92)	0,20 (RRT 1,11)* 0,18 (RRT 1,10)*	0,22 (RRT 0,93)	0,23 (RRT 0,93)
PSD (µm)	Dv10=0,7964	Dv10=0,7861	Dv10=0,7994	Dv10=0,7997
	Dv50=1,586	Dv50=1,563	Dv50=1,577	Dv50=1,614
	Dv90=3,075	Dv90=3,023	Dv90=3,058	Dv90=3,183
FPD media (mg)	3	3,2	3,6	3,6
FPD media/massa rilasciata (n=3) (mg/g)	0,7	0,8	0,8	0,8
MMAD medio (n=3)	6	6	5,7	5,9
GSD media (n=3)	1,9	1,9	2	2
Uniformità media contenuto fiala (n=10)	Pass EP 2.9.6 e 2.9.40	N/A	N/A	N/A
Peso medio riempimento fiala (n=5) (g)	5,1 (n=10)	5,3	5,3	5,3
Dose rilasciata totale media (n=3) (mg)	6	6,1	5,6	6,4
Tasso rilascio medio (n=3) (mg/min) (nel primo minuto)	0,3	0,3	0,3	0,4
% Efficienza media (n=3)	56,3	56,1	50,5	56,3

Tabella 27 (10 mg/mL) Test	Iniziale	1 mese	3 mesi	6 mesi
Condizioni di conservazione	N/A	40°C/75%UR	40°C/75%UR	40°C/75%UR
Aspetto	Sospensioni prive di agglomerati visibili di colore giallo	Sospensioni prive di agglomerati visibili di colore giallo	Sospensioni prive di agglomerati visibili di colore giallo	Sospensioni prive di agglomerati visibili di colore giallo
pH	6,7	6,7	6,6	6,6
Saggio medio (n=2) (mg/ml)	10,24	10,1	10,41	10,37
Impurità medie (n=2) (%LC)				
Totale	0,98	0,97	0,89	0,98
Maggiore	0,40 (RRT 1,11)	0,23 (RRT 0,92)	0,38 (RRT 1,10)	0,40 (RRT 1,10)
Secondo maggiore	0,23 (RRT 0,92)	0,21 (RRT 1,11)* 0,18 (RRT 1,10)*	0,23 (RRT 0,93)	0,23 (RRT 0,93)
PSD (µm)	Dv10= 0,7884	Dv10= 0,7906	Dv10= 0,7882	Dv10= 0,7757
	Dv50= 1,564	Dv50= 1,554	Dv50= 1,565	Dv50= 1,553
	Dv90= 3,02	Dv90= 2,971	Dv90= 3,024	Dv90= 3,015
FPD media (mg)	12,2	13,1	14,5	13,4
FPD media/massa rilasciata (n=3) (mg/g)	2,9	3,1	3,4	3,1
MMAD medio (n=3)	6,1	5,8	5,8	5,7
GSD media (n=3)	1,9	1,9	2	2
Uniformità media contenuto fiala (n=10)	Pass EP 2.9.6 e 2.9.40	N/A	N/A	N/A
Peso medio riempimento fiala (n=5) (g)	5,2 (n=10)	5,2	5,1	5,1
Dose rilasciata totale media (n=3) (mg)	25,5	24,1	26,9	22,8
Tasso rilascio medio (n=3) (mg/min) (nel primo minuto)	1,3	1,3	1,2	1,3
% Efficienza media (n=3)	57,3	54,3	56,2	51,6

RIVENDICAZIONI

1. Composizione farmaceutica liquida idonea alla somministrazione mediante inalazione comprendente un diluente e una sospensione di particelle di 9,10-dimetossi-2-(2,4,6-trimetilfenilimmino)-3-(N-carbamoil-2-amminoetil)-3,4,6,7-tetraidro-2H-pirimido[6,1-a]isochinolin-4-one (RPL554) o di un sale farmaceuticamente accettabile di questo,

in cui le particelle di RPL554 hanno una distribuzione granulometrica con un valore Dv_{50} (dimensione media di particella in volume) da 0,2 μm a 5 μm e

in cui (a) il diluente è acqua e/o (b) la composizione farmaceutica liquida comprende inoltre uno o più tamponi.

2. Composizione farmaceutica liquida secondo la rivendicazione 1, in cui le particelle di RPL554 hanno una distribuzione granulometrica con un valore Dv da 0,7 μm a 2,5 μm .

3. Composizione farmaceutica liquida secondo la rivendicazione 1 o la rivendicazione 2, in cui la concentrazione di particelle di RPL554 nella composizione farmaceutica liquida va da 0,01 mg/ml a 40 mg/ml.

4. Composizione farmaceutica liquida secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui la composizione ha un pH che va da 6 a 8.

5. Composizione farmaceutica liquida secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, la quale comprende inoltre uno o più tensioattivi, preferibilmente in cui l'uno o i più tensioattivi sono scelti da uno o più tensioattivi non ionici, più preferibilmente in cui l'uno o i più tensioattivi sono scelti fra poliossietilen glicole sorbitano alchil esteri e sorbitano alchil esteri.
6. Composizione farmaceutica liquida secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, la quale comprende inoltre uno o più tamponi, preferibilmente in cui gli uno o i più tamponi sono scelti fra tamponi di citrato o di fosfato.
7. Composizione farmaceutica liquida secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, la quale composizione comprende:
- (a) le particelle di RPL554 a una concentrazione da 0,01 mg/ml a 40 mg/ml;
 - (b) uno o più tensioattivi a una concentrazione da 0,01 mg/ml a 5 mg/ml;
 - e
 - (c) un tampone a una concentrazione da 5 mg/ml a 20 mg/ml.
8. Composizione farmaceutica liquida secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui la composizione comprende inoltre un regolatore di tonicità, facoltativamente in cui il regolatore di tonicità è cloruro di sodio.

9. Composizione farmaceutica liquida secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui il diluente è acqua.

10. Composizione farmaceutica liquida secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, la quale composizione comprende:

- (a) le particelle di RLP554 a una concentrazione da 0,01 mg/ml a 30 mg/ml;
- (b) un poliossietilenglicole sorbitano alchil estere a una concentrazione da 0,1 mg/ml a 2 mg/ml;
- (c) un sorbitano alchil estere a una concentrazione da 0,01 mg/ml a 0,1 mg/ml;
- (d) un primo componente di tampone fosfato a una concentrazione da 5 mg/ml a 10 mg/ml;
- (e) un secondo componente di tampone fosfato a una concentrazione da 5 mg/ml a 10 mg/ml; e
- (f) un regolatore di tonicità a una concentrazione da 2 mg/ml a 8 mg/ml,

preferibilmente la quale composizione comprende:

- (a) le particelle di RLP554 a una concentrazione da 0,05 mg/ml a 25 mg/ml;
- (b) poliossietilene (20) sorbitano monolaurato (polisorbato 20, Tween 20) a una concentrazione da 0,1 mg/ml a 2 mg/ml;
- (c) sorbitano monolaurato (Span 20) a una concentrazione da 0,01 mg/ml a 0,1 mg/ml;

- (d) fosfato monosodico monoidrato a una concentrazione da 5 mg/ml a 10 mg/ml;
- (e) fosfato di sodico bibasico anidro a una concentrazione da 5 mg/ml a 10 mg/ml; e
- (f) cloruro di sodio a una concentrazione da 2 mg/ml a 8 mg/ml.

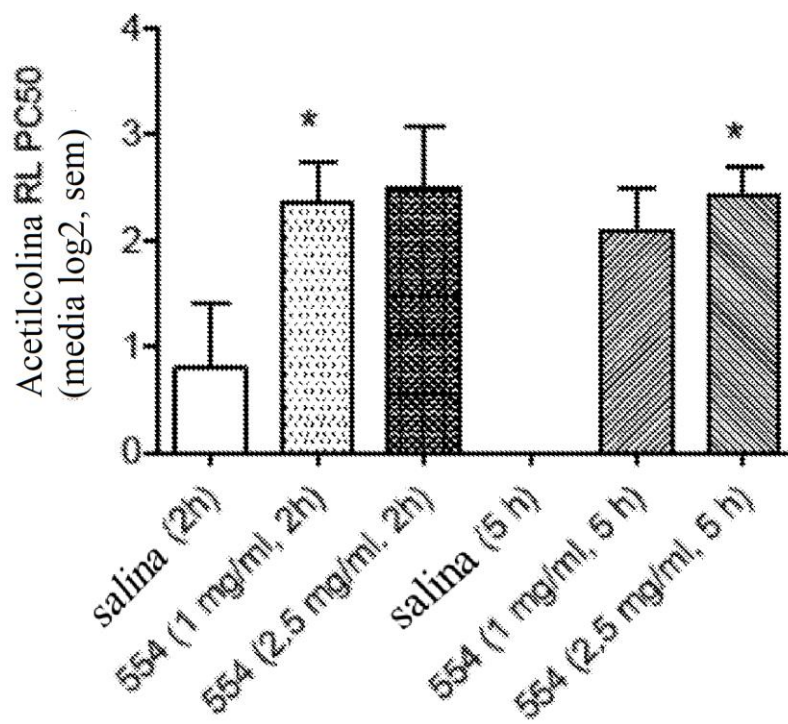
11. Composizione farmaceutica liquida secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, che è idonea alla somministrazione mediante nebulizzatore.

12. Nebulizzatore comprendente una composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti.

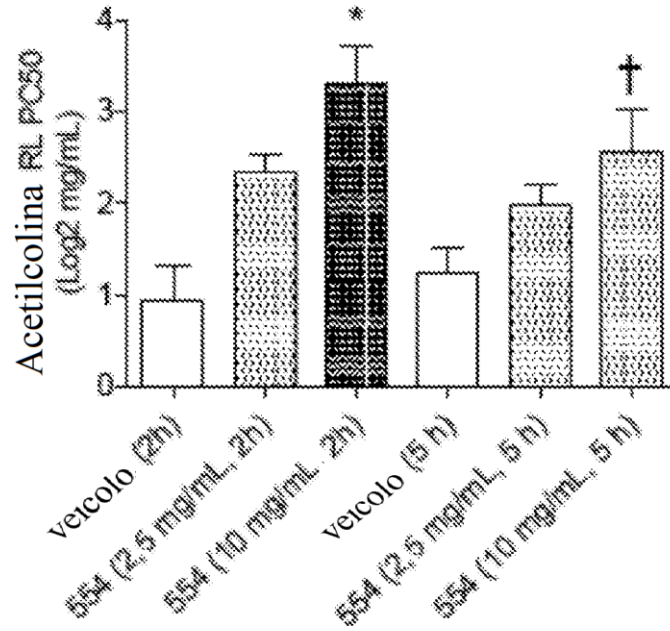
13. Composizione farmaceutica liquida secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 11 per l'uso nel trattamento del corpo umano o di animale.

14. Composizione farmaceutica liquida secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 11 per l'uso nel trattamento o nella prevenzione di una malattia o condizione scelta tra asma, asma allergica, raffreddore da fieno, rinite allergica, bronchite, enfisema, bronchiectasia, broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO), sindrome da sofferenza respiratoria dell'adulto (ARDS), asma resistente agli steroidi, asma grave, asma pediatrica, fibrosi cistica, fibrosi del polmone, fibrosi polmonare, malattia polmonare interstiziale, disturbi cutanei, dermatite atopica, psoriasi, infiammazione oculare, ischemia cerebrale, malattie infiammatorie e malattie auto-immuni.

15. Composizione farmaceutica liquida per l'uso secondo la rivendicazione 14, in cui la malattia o condizione è la broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO).

Trasformazione di RL PC50 a 2h e 5h**Figura 1**

Trasformazione di RL PC50 per gruppo



Dati combinati di controllo Log RL PC50

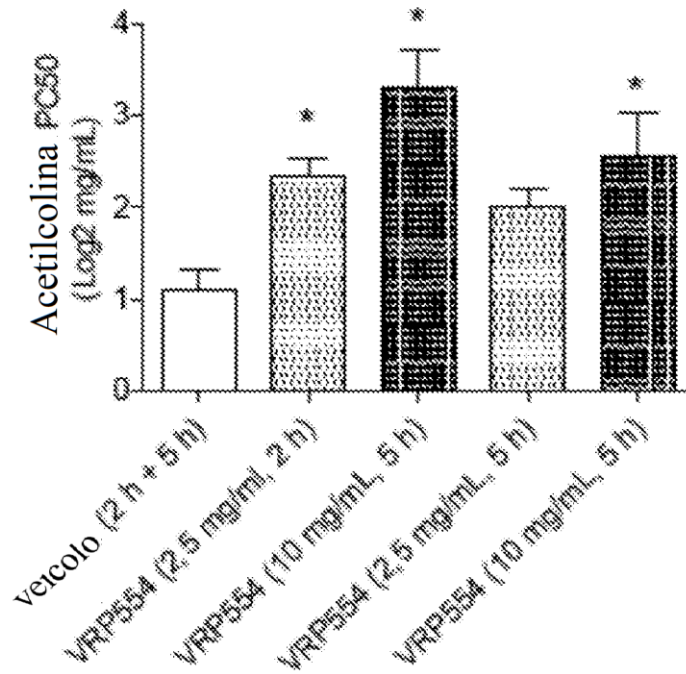


Figura 2

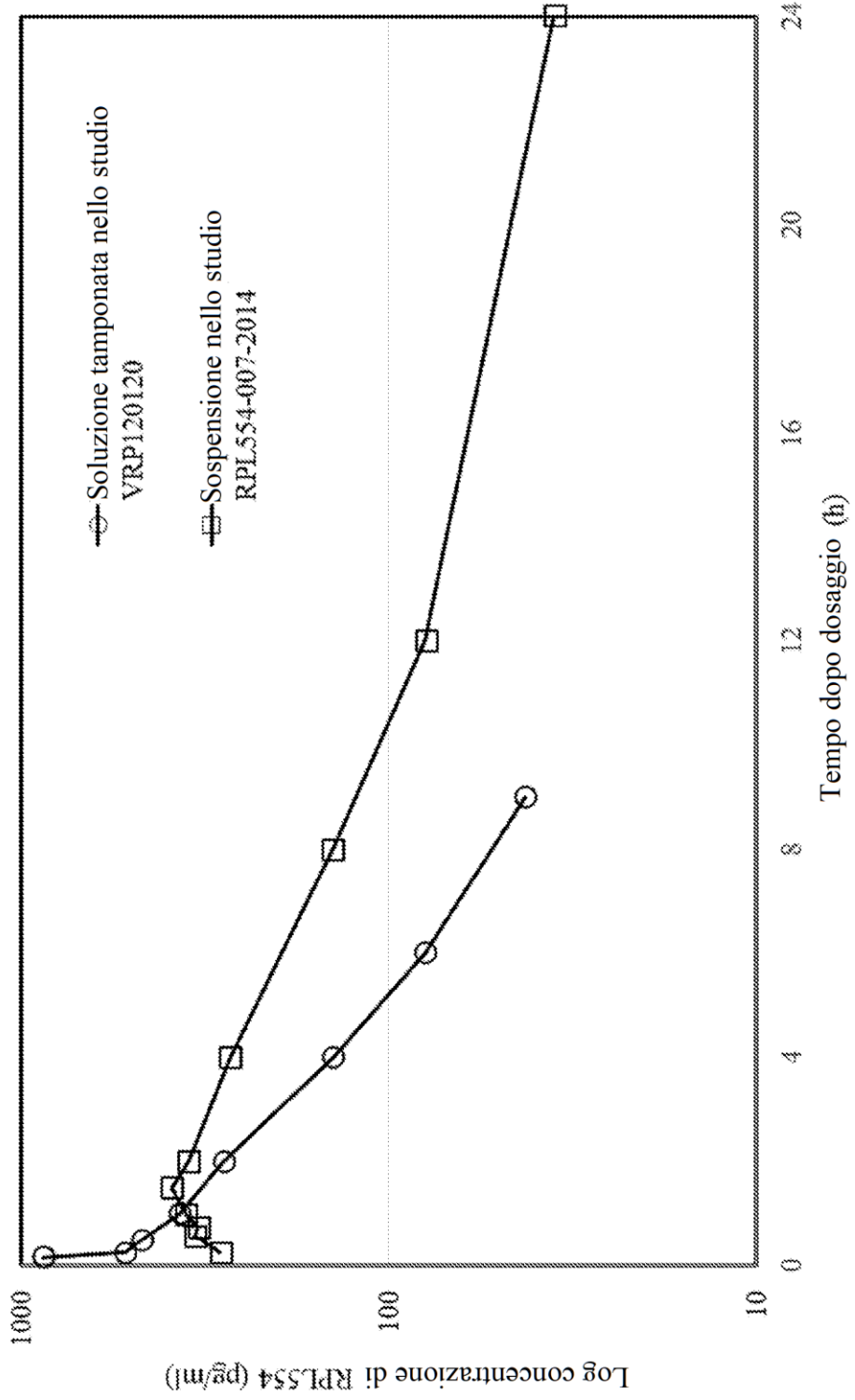


Figura 3