

SIB EX5813R

P026972EP1-IT

Traduzione in lingua italiana del Brevetto Europeo

domanda n° **17173249.8**, pubblicazione n° **3228319**

a nome di **Oncopeptides AB**

di **Västra Trädgårdsgatan 15, 111 53 Stockholm, Svezia**

* * * * *

"PREPARAZIONE LIOFILIZZATA DI DIPEPTIDI CITOTOSSICI"

DESCRIZIONE

Campo tecnico

La presente invenzione è diretta a preparati farmaceutici liofilizzati comprendenti dipeptidi citotossici o loro sali accettabili farmaceuticamente, metodi per la loro preparazione, composizioni comprendenti i preparati farmaceutici liofilizzati e il loro uso nel trattamento del cancro.

Tecnica fondamentale

Il cancro è una malattia che è difficile da curare e che può essere fatale. Di conseguenza, gli sforzi per sviluppare nuove terapie per il cancro sono costantemente in corso nella società di ricerca. Le grandi maggioranze dei tumori sono presenti come tumori solidi, ad es. cancro al polmone, cancro al seno, cancro della prostata, mentre il resto sono neoplasie maligne ematologiche e linfoidi, ad es. leucemie e linfomi.

La chemioterapia viene spesso usata nei tentativi di curare o alleviare la malattia. Poiché le cellule tumorali generalmente si dividono in maniera rapida, la chemioterapia di solito agisce uccidendo le cellule che si dividono rapidamente. In senso ampio, la maggior parte dei farmaci chemioterapici funzionano compromettendo la mitosi (cioè la divisione cellulare), mirando in maniera efficace le cellule che si dividono velocemente. Poiché questi farmaci causano danni alle cellule sono chiamati citotossici. Alcuni farmaci fanno in modo che le cellule subiscano l'apoptosi (la cosiddetta "morte programmata della cellula"). Spesso si usa la chemioterapia di combinazione, quando due o più farmaci aventi diversi modi di azione vengono usati insieme al fine di ottimizzare l'effetto antitumorale, di minimizzare gli effetti collaterali, e di prevenire lo sviluppo della resistenza. I risultati ottenuti con la chemioterapia variano a seconda del tipo di tumore. Alcuni tumori sono molto sensibili e il trattamento ha quindi un'alta probabilità di portare alla cura.

I farmaci chemioterapici possono generalmente essere suddivisi in agenti alchilanti, antimetaboliti, antracicline, alcaloidi vegetali, inibitori della topoisomerasi, e altri agenti antitumorali. I farmaci incidono sulla divisione cellulare o sintesi del DNA.

Gli agenti alchilanti, come i farmaci derivati dalle mostarde azotate, cioè derivati di bis(2-cloroetil)ammina, vengono usati come farmaci chemioterapici nel trattamento di un'ampia varietà di malattie neoplastiche. Gli

agenti alchilanti hanno la capacità di fissare in maniera covalente gruppi alchilici a siti elettronegativi nelle cellule. Pertanto, questi agenti agiscono compromettendo la funzionalità cellulare mediante la formazione di legami covalenti con gli eteroatomi in molecole importanti a livello biologico come RNA, DNA e proteine. Esempi di agenti alchilanti sono mecloretammina, ciclofosfammide, clorambucile, ifosfamide, temozolomide e melfalan che modificano chimicamente il DNA di una cellula.

WO01/96367 descrive di- e tripeptidi alchilanti e uno o due amminoacidi aggiuntivi o derivati di amminoacidi. È stato dimostrato che questi derivati hanno un'efficacia migliorata su una varietà di tipi di tumore.

Melfalan, cioè *p*-[bis-(2-cloroetil)ammino]fenilalanina, è un coniugato di mostarda azotata e l'amminoacido fenilalanina, che è stato sintetizzato a metà degli anni 1950 (Brevetto U.S.A. N. 3.032.584). Questa sostanza alchilante classica divenne presto un valido farmaco nel campo chemioterapico ed è ancora importante per il trattamento del mieloma ad esempio. L'uso clinico di melfalan nel trattamento dei tumori solidi in stadio avanzato ha avuto, tuttavia, efficacia limitata. Nella ricerca di un'azione più selettiva sulle cellule maligne sono stati pertanto sintetizzati analoghi di melfalan.

Larionov L. F., *Cancer Res* (1961), 21, 99-104 descrive vari derivati correlati al melfalan.

Fascicoli del registro STN RN: 1060633-95-5, RN: 88 7609-28-1, RN 790650-89-4, RN: 781606-39-1, RN: 773046-98-3, RN: 767621-58-9, RN: 760165-58-0 e RN: 757941-61-0 descrivono vari derivati correlati a melfalan.

Koltun, M et al., *Biopharmaceutics & Drug disposition* (210), 31, 450-454 descrive forme di melfalan.

Ma D Q et al., *International Journal of Pharmaceutics* (1999), 189, 227-234 descrive forme di melfalan.

Murav'ev et al., *Farmatsiya* (1978), 27, (2), 13-15 (con abstract in *Chemical Abstracts* n. 1978:412066) descrive derivati correlati a melfalan.

Baheti et al., *Journal of Excipients and Food Chemicals*, 2010, 1(1), 41-54, descrive eccipienti usati in varie formulazioni liofilizzate di piccole molecole.

La liofilizzazione o essiccazione a freddo è un metodo per disidratare campioni usati per preservare o aumentare la stabilità o per arrestare la degradazione. A causa del basso contenuto di acqua dei prodotti liofilizzati,

generalmente intorno all'1-4%, l'azione di microrganismi ed enzimi è inibita e la vita del prodotto è pertanto aumentata. Nella liofilizzazione, il campione da liofilizzare viene disciolto in una soluzione acquosa e successivamente congelato dopo di che la pressione circostante viene ridotta. Il campione viene poi sottoposto a sublimazione, opzionalmente mediante l'applicazione di calore, al fine di sublimare l'acqua congelata direttamente dalla fase solida alla fase gassosa. Il contenuto finale di acqua nel prodotto è molto basso, generalmente intorno all'1% fino al 4%. La liofilizzazione viene comunemente usata nel settore farmaceutico al fine di aumentare la vita di scaffale dei prodotti farmaceutici.

Sommario dell'invenzione

In generale, i derivati dell'estere del dipeptide lipofilo soffrono di una scarsa solubilità nelle soluzioni acquose. Pertanto, è necessario l'uso di solventi organici, come DMA (dimetilacetammide), al fine di disciogliere tali dipeptidi. Tuttavia, i solventi organici sono spesso tossici e possono inoltre causare la distruzione dei dispositivi medici usati per la somministrazione dei dipeptidi ai soggetti, come pazienti affetti da cancro. Di conseguenza, per superare i problemi con il disciogliere e il fornire i dipeptidi citotossici in un solvente organico, vi è una necessità di preparati farmaceutici alternativi di dipeptidi citotossici aventi solubilità sufficiente in soluzioni accettabili fisiologicamente.

La presente invenzione si riferisce a preparati liofilizzati comprendenti l'estere etilico di melfalanil-L-p-fluorofenilalanina, noto anche come melfalan flufenamide, così come il suo sale accettabile farmaceuticamente, in particolare, estere etilico di melfenalil-L-p-fluorofenilalanina cloridrato, noto anche come melfalan flufenamide cloridrato, o J1.

Un aspetto della presente invenzione è diretto ad un preparato farmaceutico liofilizzato comprendente

- (i) melfalan flufenamide, o un suo sale accettabile farmaceuticamente; e
- (ii) almeno un eccipiente scelto dal gruppo comprendente β -ciclodestrina; α -ciclodestrina; idrossipropil- β -ciclodestrina; e solfobutilettere- β -ciclodestrina.

Ancora un aspetto della presente invenzione è un preparato farmaceutico liofilizzato che è solubile in una soluzione acquosa.

Ancora un aspetto della presente invenzione è un metodo per la preparazione di un preparato farmaceutico liofilizzato come descritto nella presente, mediante il quale:

a. melfalan flufenamide, o un suo sale accettabile farmaceuticamente, viene disciolto in un solvente organico per ottenere una soluzione di melfalan flufenamide;

b. si aggiunge acqua alla soluzione di melfalan flufenamide al fine di ottenere una soluzione acquosa di melfalan flufenamide, in una concentrazione di circa 0,2-3,0 mg/ml;

c. almeno un eccipiente scelto dal gruppo comprendente β -ciclodestrina; α -ciclodestrina; idrossipropil- β -ciclodestrina; e solfobutiletere- β -ciclodestrina viene aggiunto saccarosio alla soluzione di melfalan flufenamide;

e

d. la soluzione acquosa di melfalan flufenamide contenente eccipiente(i) viene sottoposta a liofilizzazione.

Ancora un aspetto dell'invenzione è un kit di parti, comprendente un primo contenitore comprendente un preparato farmaceutico liofilizzato come definito nella presente, e un secondo contenitore comprendente una soluzione accettabile fisiologicamente.

Ancora un aspetto della presente invenzione è un preparato farmaceutico liofilizzato come descritto nella presente, per uso come medicinale.

Nella presente viene descritto un kit di parti come descritto nella presente, per uso come medicinale.

Un aspetto della presente invenzione è un preparato farmaceutico liofilizzato come descritto nella presente, per uso nel trattamento e/o prevenzione del cancro, come cancro ovarico, cancro del polmone, cancro della vescica, mesotelioma, mieloma multiplo, cancro al seno, e/o qualsiasi cancro solido o ematologico.

Ancora un aspetto dell'invenzione è un kit di parti come descritto nella presente, per uso nel trattamento e/o prevenzione del cancro, come cancro ovarico, cancro del polmone, cancro della vescica, mesotelioma, mieloma multiplo, cancro al seno, e/o qualsiasi cancro solido o ematologico.

Nella presente viene descritto un metodo per il trattamento e/o prevenzione del cancro, come cancro ovarico, cancro del polmone, cancro della vescica, mesotelioma, mieloma multiplo, cancro al seno, e/o qualsiasi cancro solido o ematologico, mediante il quale un preparato farmaceutico liofilizzato come descritto nella presente,

viene somministrato in una dose efficace terapeuticamente ad un soggetto che ne ha bisogno.

Se non definiti diversamente, tutti i termini tecnici e scientifici usati nella presente hanno lo stesso significato comunemente compreso da una persona di ordinaria esperienza nella tecnica a cui la presente invenzione si rivolge. Sebbene metodi e materiali simili o equivalenti a quelli descritti nella presente possono essere usati nel praticare o provare la presente invenzione, di seguito sono descritti metodi e materiali idonei.

Altre caratteristiche e vantaggi dell'invenzione risulteranno evidenti dalla seguente descrizione dettagliata, disegni, esempi e dalle rivendicazioni.

Breve descrizione dei disegni

Fig. 1A-D contengono grafici di quattro misurazioni ripetute della velocità di dissoluzione di melfalan flufenamide liofilizzato senza eccipienti mediante il metodo A secondo Esempio 2. I campioni sono stati raccolti nei punti di tempo indicati e la quantità di melfalan flufenamide disciolto è stata determinata mediante HPLC. L'asse y mostra la quantità di melfalan flufenamide in mg/ml.

Fig. 2A-E contengono grafici di misurazione della velocità di dissoluzione di melfalan flufenamide liofilizzato in presenza di eccipienti come indicati nelle figure mediante il metodo A secondo Esempio 2. I campioni sono stati raccolti nei punti di tempo indicati e la quantità di melfalan flufenamide disciolto è stata determinata mediante HPLC. L'asse y mostra la quantità di melfalan flufenamide in mg/ml.

Fig. 3 è un grafico di misurazione della velocità di dissoluzione del melfalan flufenamide senza eccipienti mediante il metodo B secondo Esempio 2. I campioni sono stati raccolti nei punti di tempo indicati e la quantità di melfalan flufenamide disciolta è stata determinata mediante HPLC. L'asse y mostra la quantità di melfalan flufenamide in mg/ml.

Fig. 4A-E contengono grafici di misurazione della velocità di dissoluzione di melfalan flufenamide liofilizzato in presenza di eccipienti come indicati nelle figure mediante il metodo B. I campioni sono stati raccolti nei punti di tempo indicati e la quantità di melfalan flufenamide disciolto è stata determinata mediante HPLC. L'asse y mostra la quantità di melfalan flufenamide in mg/ml.

Fig. 5 contengono grafici di misurazione della velocità di dissoluzione come segue, A: melfalan flufenamide

liofilizzato senza Polisorbato 80; B melfalan flufenamide liofilizzato in presenza del 10% di Polisorbato 80; C melfalan flufenamide liofilizzato in presenza del 50% di Polisorbato 80; D melfalan flufenamide liofilizzato in presenza del 100% di Polisorbato 80. Le quantità sono relative alla quantità di melfalan flufenamide. L'asse y mostra la quantità di melfalan flufenamide disciolto rispetto allo standard interno come determinata mediante HPLC.

Fig. 6 è una fotografia di provette di vetro con melfalan flufenamide (J1) che in seguito alla liofilizzazione viene disciolto in una concentrazione di 1 mg/ml in una soluzione al 5% di glucosio contenente il 50% (moli) di Polisorbato 80 (sinistra) e senza Polisorbato 80 (destra).

Fig. 7 contiene formule strutturali per melfalan flufenamide (estere etilico di L-melfalanil-L-*p*-fluorofenilalanina), estere isopropilico di L-melfalanil-L-*p*-fluorofenilalanina (JV28), estere etilico di L-prolinil-L-melfalanil-L-*p*-fluorofenilalanina (J3).

Descrizione dettagliata dell'invenzione

Dipeptidi citotossici non liofilizzati o loro sali accettabili farmaceuticamente possono avere una bassa solubilità in soluzioni acquose, che possono richiedere l'uso di solventi organici, come DMA (dimetilacetammide), per disciogliere detti dipeptidi o loro sali accettabili farmaceuticamente. Pertanto, quando un dipeptide citotossico deve essere somministrato ad un paziente, la sostanza deve prima essere disciolta in un solvente organico, come DMA, e successivamente diluita in una soluzione per infusione prima della somministrazione al paziente. Il paziente mediante questo metodo è esposto a solventi organici, la quale esposizione può essere pericolosa per il paziente. Inoltre, il solvente organico può distruggere i dispositivi medici usati per la somministrazione di melfalan flufenamide ai soggetti, come pazienti affetti da cancro.

I presenti inventori hanno ora osservato in maniera sorprendente che quando alcuni dipeptidi citotossici o loro sali accettabili farmaceuticamente vengono liofilizzati in presenza di un eccipiente, il preparato farmaceutico liofilizzato risultante può avere una solubilità ancora maggiore in una soluzione accettabile fisiologicamente. Infatti, la solubilità può essere così alta che il passaggio di disciogliere il dipeptide citotossico o il suo sale accettabile farmaceuticamente in un solvente organico può essere omessa e il dipeptide citotossico può essere

disciolto direttamente in una soluzione acquosa, accettabile fisiologicamente e somministrato ad un paziente. Preferibilmente, detto dipeptide citotossico è melfalan flufenamide o un suo sale accettabile farmaceuticamente. Nei preparati precedenti, melfalan flufenamide è stato ottenuto dalla sintesi come polvere bianca in forma cristallina. Questa forma cristallina può essere disciolta solo in soluzioni acquose altamente acide, il che per scopi pratici di fabbricazione è impossibile. La presenza di eccipienti in quanto tale, non ha migliorato la solubilità in maniera sufficiente. Pertanto, in precedenza il melfalan flufenamide veniva invece disciolto in DMA (dimetilacetammide) in una soluzione di glucosio. La preparazione è fattibile ma è instabile: 7% di degradazione/h. Inoltre, si verifica la dimerizzazione e la soluzione diventa giallo brillante. Questa preparazione era, tuttavia, inaffidabile e la velocità di polimerizzazione variava in una maniera inaccettabile.

Di conseguenza, vi è una necessità di identificare modi alternativi per fornire un preparato comprendente melfalan flufenamide o un suo sale accettabile farmaceuticamente che sia solubile con stabilità aumentata. Inoltre, il preparato dovrebbe essere idrosolubile per evitare problemi negativi dell'avere un solvente organico nel prodotto che viene fornito al paziente (come DMA).

Un aspetto della presente invenzione è un preparato farmaceutico liofilizzato comprendente

- (i) melfalan flufenamide, o un suo sale accettabile farmaceuticamente; e
- (ii) almeno un eccipiente scelto dal gruppo comprendente β -ciclodestrina; α -ciclodestrina; idrossipropil- β -ciclodestrina; e solfobutilettere- β -ciclodestrina.

In un'altra realizzazione di questo aspetto, detto melfalan flufenamide è melfalan flufenamide cloridrato (J1).

In un altro aspetto dell'invenzione è fornita una preparazione farmaceutica comprendente

- (i) melfalan flufenamide cloridrato (J1); e
- (ii) almeno un eccipiente scelto dal gruppo comprendente β -ciclodestrina; α -ciclodestrina; idrossipropil- β -ciclodestrina; e solfobutilettere- β -ciclodestrina.

L'invenzione fornisce un preparato liofilizzato che è stabile in forma essiccata e solubile in una soluzione acquosa senza la presenza di un solvente organico. Mentre in precedenza era possibile preparare un preparato liofilizzato di melfalan flufenamide da solo, questo preparato si discioglieva troppo lentamente in soluzioni

acquose rispetto al tempo di degradazione. L'incorporazione di un eccipiente nel preparato liofilizzato di melfalan flufenamide (mediante la soluzione iniziale in un solvente organico) migliora notevolmente il tempo di ricostituzione, ma non altera in maniera significativa la stabilità del melfalan flufenamide ricostituito. Di conseguenza, la finestra temporale per il melfalan flufenamide ricostituito è ampliata, e questo migliora i trattamenti dei pazienti, ad es. permettendo tassi di infusione ridotti, ove necessari. Un preparato "senza la presenza di un solvente organico" potrebbe includere quantità in tracce di solvente organico, in genere meno dello 0,5% (p/p).

Il preparato farmaceutico liofilizzato di melfalan flufenamide o un suo sale accettabile farmaceuticamente come descritto nella presente, è una polvere bianca, soffice al contrario di un melfalan flufenamide non liofilizzato o un suo sale accettabile farmaceuticamente, che può essere sotto forma di polvere densa, leggermente giallognola. Generalmente, la liofilizzazione comprende quattro passaggi, pretrattamento, congelamento, essiccazione primaria, ed essiccazione secondaria. Nel passaggio di pretrattamento, la sostanza da liofilizzare viene preparata per la liofilizzazione ad es. mediante la preparazione di una soluzione avente la concentrazione desiderata o miscelando la sostanza con componenti aggiuntivi per ottenere un risultato accettabile. Il passaggio di congelamento può essere eseguito in un flacone per l'essiccazione a freddo in una vasca raffreddata ad es. mediante refrigerazione meccanica, ghiaccio secco e metanolo, o azoto liquido. Le macchine per l'essiccazione a freddo sono disponibili in una scala più ampia. Di solito, le temperature di congelamento sono tra -50°C e -80°C. Nel passaggio di essiccazione primaria, la pressione viene abbassata nell'intervallo di alcuni millibar, e può essere fornito calore affinché l'acqua sublimi dal materiale. La quantità di calore necessaria può essere calcolata usando il calore latente di sublimazione delle molecole in sublimazione. La durata di questo periodo dipende, ma può durare per giorni al fine di preservare la struttura dei materiali.

Lo scopo del passaggio finale di essiccazione secondaria è di rimuovere qualsiasi molecola di acqua non congelata. In questa fase, la temperatura può arrivare ad essere superiore a 0°C, per interrompere qualsiasi interazione fisico-chimica che si sia formata tra le molecole d'acqua e il materiale congelato.

Nel contesto della presente invenzione, si deve comprendere che il melfalan flufenamide o un suo sale

accettabile farmaceuticamente, è liofilizzato. Resta pertanto inteso che il termine “un preparato farmaceutico liofilizzato di un melfalan flufenamide o un suo sale accettabile farmaceuticamente”, indica che il melfalan flufenamide o un suo sale accettabile farmaceuticamente è liofilizzato.

Altri aspetti della presente invenzione forniscono melfalan flufenamide liofilizzato o un suo sale accettabile farmaceuticamente, un kit di parti comprendente tale melfalan flufenamide, metodi per la preparazione di tale melfalan flufenamide o un suo sale accettabile farmaceuticamente, composizioni che comprendono tale melfalan flufenamide liofilizzato o un suo sale accettabile farmaceuticamente e loro usi.

“Liofilizzazione”, “liofilizzato”, ecc. nel presente contesto possono essere usati in maniera intercambiabile con “essiccazione a freddo”, “essiccato a freddo” ecc.

Esempi di dipeptidi citotossici che possono essere liofilizzati come descritto nella presente ma che non rientrano tutti nelle rivendicazioni sono elencati in WO01/96367. L'estremità N-terminale di una molecola non dovrebbe preferibilmente essere protetta come ammidi o carbammato. Ciò significa che R₄ in formula I ivi preferibilmente non dovrebbe essere un gruppo protettivo, come formile, acetile o propionile, o benzoile, in quanto la forma protetta del composto in generale ha un'attività citotossica inferiore rispetto alla forma libera corrispondente. Gli amminoacidi naturali si riferiscono agli amminoacidi che esistono normalmente ed esercitano le loro funzioni in organismi viventi. Gli amminoacidi modificati si riferiscono ad amminoacidi che in qualche modo sono stati modificati in una struttura chimica e composizione chimica diversa rispetto ad un amminoacido naturale. Un esempio di un amminoacido ciclico naturale è la prolina. Esempi di amminoacidi aromatici sono fenilalanina, tirosina, triptofano, e istidina.

I dipeptidi citotossici, come melfalan flufenamide, possono anche contenere proporzioni non naturali di isotopi atomici in uno o più dei loro atomi. Ad esempio, i composti possono essere radiomarcati con isotopi radioattivi, come ad esempio trizio (³H), deuterio (²H), iodio-125 (¹²⁵I) o carbonio-14 (¹⁴C).

Il dipeptide citotossico melfalan flufenamide si differenzia chiaramente da melfalan:

- Differenza nella struttura (melfalan flufenamide è un estere etilico all'estremità C-terminale invece dell'acido carbossilico nel melfalan. Melfalan è pertanto uno zwitterione, ma melfalan flufenamide non lo è).

- Differenza nella dimensione (melfalan flufenamide è un dipeptide, cioè circa due volte la dimensione del melfalan).
- Differenza nella lipofilia, dove melfalan flufenamide è chiaramente più lipofilo.
- Differenza nella stabilità in soluzioni acquose. Melfalan è 10.000 volte più stabile nelle soluzioni acquose rispetto a J1. J1 si idrolizza rapidamente in acqua.
- Differenza nelle vie di degradazione. La via di degradazione principale nel melfalan flufenamide comporta l'idrolisi dell'estere etilico, mentre la degradazione principale nel melfalan è correlata alla reattività dei gruppi (cloro)alchilici.

Sulla base delle, ma non limitatamente alle, differenze di cui sopra, è chiaro che gli insegnamenti sul melfalan e, in particolare loro preparati e formulazioni, non si applicano al melfalan flufenamide e suoi preparati e formulazioni.

L'inclusione di almeno un eccipiente fornisce una preparazione liofilizzata che è stabile come tale e solubile in acqua senza la presenza di un solvente organico ad un tasso sufficiente rispetto al tasso di degradazione, ed è quindi utile in terapia e meno tossica.

Il preparato farmaceutico liofilizzato secondo l'invenzione può contenere solo melfalan flufenamide o un suo sale accettabile farmaceuticamente, o una miscela di melfalan flufenamide con uno o più dipeptidi citotossici diversi o loro sali accettabili farmaceuticamente. Inoltre, il preparato farmaceutico liofilizzato può contenere una miscela di due o più sali accettabili farmaceuticamente diversi.

Un aspetto dell'invenzione è un preparato farmaceutico liofilizzato, comprendente

(i) melfalan flufenamide; e

(ii) una combinazione di due o più eccipienti scelti dal gruppo comprendente un polisorbato; un polietilenglicole; β -ciclodestrina; α -ciclodestrina; idrossipropil- β -ciclodestrina; solfobutileter- β -ciclodestrina; lattosio; alcol benzilico; succinato disodico; propilenglicole; Cremophor EL; Dimetilsolfossido; D-mannitolo; Trealosio; Saccarosio; e un amminoacido.

Ancora un aspetto dell'invenzione è un preparato farmaceutico liofilizzato, comprendente:

(i) melfalan flufenamide cloridrato (J1); e

(ii) una combinazione di due o più eccipienti scelti dal gruppo comprendente un polisorbato; un polietilenglicole; β -ciclodestrina; α -ciclodestrina; idrossipropil- β -ciclodestrina; solfobutileter- β -ciclodestrina; lattosio; alcool benzilico; succinato disodico; propilenglicole; Cremophor EL; Dimetilsolfossido; D-mannitolo; Trealosio; Saccarosio; e un amminoacido.

I sali accettabili farmaceuticamente per tutti gli aspetti della presente invenzione possono essere, ad esempio, un sale con aggiunta di acido di un composto descritto nella presente che sia sufficientemente basico, ad esempio, un sale con aggiunta di acido con, ad esempio, un acido inorganico o organico, ad esempio acido cloridrico, bromidrico, nitrico, metansolfonico, solforico, fosforico, trifluoroacetico, paratoluensolfonico, 2-mesitilen solfonico, citrico, acetico, tartarico, fumarico, lattico, succinico, malico, malonico, maleico, 1,2-etandisolfonico, adipico, aspartico, benzensolfonico, benzoico, etansolfonico o acido nicotinico.

In questo documento, quando si usa il termine "melfalan flufenamide", si intende inoltre includere un suo sale(i) accettabile farmaceuticamente, anche se ciò non è espressamente indicato.

Come accennato in precedenza, quando melfalan flufenamide o un suo sale accettabile farmaceuticamente viene liofilizzato in presenza di un eccipiente accettabile farmaceuticamente, come uno qualsiasi scelto tra un polisorbato; un polietilenglicole; β -ciclodestrina; α -ciclodestrina; idrossipropil- β -ciclodestrina; solfobutiletere- β -ciclodestrina; lattosio; alcool benzilico; succinato disodico; glicole propilenico; Cremophor EL; Dimetilsolfossido; D-mannitolo; trealosio; Saccarosio; e un amminoacido; si può ottenere un aumento inaspettatamente elevato della solubilità della preparazione farmaceutica liofilizzata, che consente la dissoluzione diretta del melfalan flufenamide liofilizzato in una soluzione acquosa, come una soluzione fisiologicamente accettabile. Ciò è in contrasto con un melfalan flufenamide non liofilizzato che non è possibile sciogliere direttamente in una soluzione acquosa, ma che deve essere prima sciolto in un solvente organico prima della diluizione in una soluzione acquosa. Nella presente è pertanto descritto un preparato farmaceutico liofilizzato comprendente melfalan flufenamide o un suo sale accettabile farmaceuticamente, in cui il melfalan flufenamide è liofilizzato in presenza di un eccipiente.

Melfalan flufenamide o un suo sale accettabile farmaceuticamente possono essere liofilizzati in presenza di uno o più eccipienti (ad esempio uno, due, tre, quattro, cinque o più eccipienti). Esempi di eccipienti che possono essere usati come descritto nella presente includono, senza limitazione, polisorbati come polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60 e polisorbato 80; glicoli polietilenici come PEG 400 e PEG 300; β -ciclodestrina, α -ciclodestrina, solfobutiletere- β -ciclodestrina, idrossipropil- β -ciclodestrina, lattosio, alcol benzilico, sodio succinato, glicole propilenico, Cremophor EL, dimetil solfossido, D-mannitolo, trealosio, saccarosio e amminoacidi come istidina.

In un aspetto dell'invenzione, l'eccipiente è scelto da uno qualsiasi di β -ciclodestrina; α -ciclodestrina; idrossipropil- β -ciclodestrina; e solfobutiletere- β -ciclodestrina.

La quantità di eccipiente come β -ciclodestrina, è tipicamente di circa 10-100% in peso della quantità di melfalan flufenamide, come 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 o 10% in peso della quantità di melfalan flufenamide.

In ancora un aspetto dell'invenzione, la quantità dell'eccipiente, come β -ciclodestrina, è tipicamente di circa 10-50% in peso della quantità di melfalan flufenamide, come 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 o 10% in peso della quantità di melfalan flufenamide.

Ancora un aspetto dell'invenzione è una preparazione farmaceutica liofilizzata comprendente

- (i) melfalan flufenamide o un suo sale accettabile farmaceuticamente; e
- (ii) almeno un eccipiente scelto dal gruppo comprendente β -ciclodestrina; α -ciclodestrina; idrossipropil- β -ciclodestrina; e solfobutiletere- β -ciclodestrina;

in cui la quantità dell'eccipiente è circa il 10-100% in peso di melfalan flufenamide.

In un'altra realizzazione di questo aspetto, melfalan flufenamide è rappresentato da melfalan flufenamide cloridrato (J1).

Ancora un aspetto dell'invenzione è una preparazione farmaceutica liofilizzata comprendente

- (i) melfalan flufenamide o un suo sale accettabile farmaceuticamente; e
- (ii) almeno un eccipiente scelto dal gruppo comprendente β -ciclodestrina; α -ciclodestrina; idrossipropil- β -ciclodestrina; e solfobutiletere- β -ciclodestrina;

in cui la quantità dell'eccipiente è circa il 10-50% in peso di melfalan flufenamide cloridrato (J1).

In un'altra realizzazione di questo aspetto, il melfalan flufenamide è rappresentato da melfalan flufenamide cloridrato (J1).

Ancora un aspetto dell'invenzione è una preparazione farmaceutica liofilizzata comprendente

(i) melfalan flufenamide cloridrato (J1); e

(ii) almeno un eccipiente scelto dal gruppo comprendente β -ciclodestrina; α -ciclodestrina; idrossipropil- β -ciclodestrina; e solfobutiletere- β -ciclodestrina;

in cui la quantità dell'eccipiente è di circa il 10-100% in peso di melfalan flufenamide cloridrato (J1).

Ancora un aspetto dell'invenzione è una preparazione farmaceutica liofilizzata comprendente

(i) melfalan flufenamide cloridrato (J1); e

(ii) almeno un eccipiente scelto dal gruppo comprendente β -ciclodestrina; α -ciclodestrina; idrossipropil- β -ciclodestrina; e solfobutiletere- β -ciclodestrina;

in cui la quantità dell'eccipiente è di circa 10-50% in peso di melfalan flufenamide cloridrato (J1).

In una realizzazione dell'invenzione, la quantità di eccipiente può essere fino alla quantità clinicamente accettabile.

Un aspetto dell'invenzione è una combinazione degli eccipienti Polisorbato 80, PEG 400 e β -ciclodestrina, come 80% in peso di polisorbato 80, 80% in peso di PEG 400 e 50% in peso di β -ciclodestrina, della quantità di melfalan flufenamide. Una preparazione farmaceutica liofilizzata di un derivato del melfalan o di un suo sale accettabile farmaceuticamente, secondo l'invenzione può comprendere uno o più derivati del melfalan o un suo sale(i) accettabile farmaceuticamente, e uno o più eccipienti come definiti nella presente.

Come accennato in precedenza nella presente, un effetto della presenza di un eccipiente durante la liofilizzazione è che il preparato farmaceutico liofilizzato risultante comprendente melfalan flufenamide, ha una solubilità aumentata in soluzioni acquose, come una soluzione accettabile fisiologicamente, rispetto a quando il melfalan flufenamide viene liofilizzato senza un eccipiente come descritto nella presente. In particolare, la solubilità in soluzioni acquose di melfalan flufenamide quando liofilizzato in presenza di un eccipiente(i) è maggiore rispetto

alla solubilità del prodotto non liofilizzato. Questa solubilità aumentata di melfalan flufenamide, in particolare quando liofilizzato in presenza di un eccipiente come descritto nella presente, rispetto al prodotto non liofilizzato, ha vantaggi sostanziali quando si tratta della somministrazione di melfalan flufenamide ad un paziente.

A causa di una bassa solubilità di melfalan flufenamide non liofilizzato in soluzioni acquose accettabili fisiologicamente usate per somministrare il farmaco ad un paziente, è necessario prima disciogliere il melfalan flufenamide non liofilizzato in un solvente organico, come DMA. Melfalan flufenamide viene quindi spesso conservato disciolto in DMA. In precedenza non è stato possibile disciogliere direttamente il melfalan flufenamide in una soluzione acquosa, ma è stato necessario usare solventi organici. Una volta disciolta nel solvente organico, questa soluzione di melfalan flufenamide e solvente organico può essere disciolta in soluzioni accettabili fisiologicamente per la somministrazione ad un soggetto.

Poiché il melfalan flufenamide è molto tossico, al fine di minimizzare l'esposizione del personale medico a tali farmaci, vengono usati dispositivi speciali per trasferire i farmaci dopo la dissoluzione in solventi organici alla soluzione per la somministrazione. Questi dispositivi di trasferimento sono spesso provette di plastica comprendenti policarbonato. Tuttavia, tali provette sono sensibili ai e possono essere distrutte dai solventi organici, come DMA. Pertanto, nei casi in cui il farmaco da somministrare viene disciolto in tale solvente organico, potrebbe non essere possibile usare il dispositivo di trasferimento, e il farmaco disciolto invece deve essere aggiunto direttamente alla soluzione accettabile fisiologicamente usata per la somministrazione appena prima del momento della somministrazione al paziente. Questo può essere pericoloso per il personale medico, che pertanto rischia di essere esposto al farmaco tossico.

Come accennato in precedenza, la liofilizzazione di melfalan flufenamide aumenta la sua solubilità in soluzioni accettabili fisiologicamente. Questo aumento può essere ancora più pronunciato quando melfalan flufenamide viene liofilizzato in presenza di uno o più eccipienti. Come descritto nella presente, quando il melfalan flufenamide viene liofilizzato in presenza di un eccipiente come descritto nella presente, la solubilità di melfalan flufenamide può essere aumentata, rispetto al melfalan flufenamide non liofilizzato. L'uso di un solvente

organico, come DMA, per disciogliere in primo luogo il melfalan flufenamide può essere evitato.

Il melfalan flufenamide che è stato liofilizzato in presenza di almeno un eccipiente, come un polisorbato che ad esempio può essere Polisorbato 80; un polietilenglicole che ad esempio può essere PEG 400 o PEG 300; β -ciclodestrina; α -ciclodestrina; idrossipropil- β -ciclodestrina; solfobutileter- β -ciclodestrina; lattosio; alcool benzilico; succinato disodico; propilenglicole; Cremophor EL; Dimetilsolfossido; D-mannitolo; Trealosio; Saccarosio; o un amminoacido come istidina; o una combinazione di due o più di questi eccipienti; può essere disciolto direttamente in una soluzione accettabile fisiologicamente, come soluzione di circa 4,5-5,5% in peso, ad es. circa 5%, di glucosio o una soluzione acquosa di NaCl (ad es. circa 0,9% in peso di NaCl). In questo modo, possono essere usati dispositivi comprendenti policarbonato e che vengono usati per la somministrazione di melfalan flufenamide, riducendo al minimo il rischio di esporre il personale medico al farmaco. Inoltre, in questo modo si evita di somministrare DMA tossica al paziente. Ciò permette di preparare direttamente la soluzione comprendente melfalan flufenamide ad una concentrazione idonea per la somministrazione al paziente. In alternativa, una soluzione concentrata comprendente un preparato farmaceutico liofilizzato di melfalan flufenamide in una soluzione accettabile fisiologicamente può essere prima preparata e poi trasferita alla sacca per l'infusione usando i dispositivi di trasferimento comunemente usati.

Inoltre, quando il melfalan flufenamide viene disciolto in DMA, si può formare un addotto tra melfalan flufenamide e DMA. Mediante l'uso di un preparato farmaceutico liofilizzato fornito secondo l'invenzione, è possibile disciogliere il melfalan flufenamide liofilizzato direttamente in una soluzione accettabile fisiologicamente, evitando di disciogliere prima il melfalan flufenamide in DMA. Pertanto, la formazione di un addotto DMA-melfalan flufenamide può essere evitata e né l'addotto né la DMA devono essere somministrati al paziente.

È inoltre fornita una composizione farmaceutica comprendente un preparato farmaceutico liofilizzato di melfalan flufenamide o suo sale accettabile farmaceuticamente come definito nella presente, opzionalmente ottenibile mediante il metodo per la preparazione di tale preparato liofilizzato descritto nella presente. Tale composizione farmaceutica può inoltre comprendere una soluzione accettabile fisiologicamente, come una soluzione acquosa

di NaCl (ad es. circa 0,9% in peso) o di glucosio (ad es. circa 4,5-5,5% in peso, come circa 5% in peso, di glucosio). Questa composizione farmaceutica può essere una soluzione concentrata destinata alla diluizione prima della somministrazione ad un soggetto o come soluzione che consente la somministrazione diretta ad un paziente.

A causa dell'aumentata solubilità di melfalan flufenamide dopo la liofilizzazione in presenza di uno o più eccipienti come descritti nella presente, è possibile preparare una soluzione di melfalan flufenamide disciolto, come una composizione farmaceutica comprendente un melfalan flufenamide o un suo sale accettabile farmaceuticamente, che è sostanzialmente priva di solventi organici come DMA, diclorometano, tetraidrofurano, 2-metil tetraidrofurano, acetato di etile, acetone, dimetilformamide, acetonitrile, dimetilsolfossido, diossano, dietilere, acido acetico, n-butanolo, isopropanolo, butanolo, terz-butanolo, sec-butanolo, metanolo, etanolo, e acido acetico. Con "sostanzialmente privo" si intende in questo documento che la composizione farmaceutica comprende solo quantità in tracce di un solvente organico, come meno di circa un totale di circa 0,1% in peso di un solvente organico. In un aspetto, il preparato liofilizzato o la composizione farmaceutica non contiene alcuna quantità misurabile di un solvente organico. Tali preparati sarebbero meno tossici e quindi più tollerati da un paziente, cioè dando meno effetti collaterali come vomito, nausea o altri sintomi generali una volta infusi.

In un aspetto dell'invenzione, viene fornito un preparato farmaceutico liofilizzato dell'invenzione, che è privo, o sostanzialmente privo di solventi organici.

L'invenzione fornisce una composizione farmaceutica costituita da un preparato farmaceutico liofilizzato dell'invenzione, comprendente melfalan flufenamide o suo sale accettabile farmaceuticamente, e la soluzione accettabile fisiologicamente, come una soluzione di glucosio. Come descritto in precedenza, il derivato di melfalan può essere melfalan flufenamide o una miscela di melfalan flufenamide e uno o più dipeptidi citotossici differenti, liofilizzati insieme o separatamente.

La composizione farmaceutica può essere ottenibile sciogliendo melfalan flufenamide o un suo sale accettabile farmaceuticamente in una soluzione accettabile fisiologicamente. Nella presente viene pertanto descritto anche un metodo per preparare una composizione farmaceutica comprendente il passaggio di sciogliere il preparato

farmaceutico liofilizzato comprendente melfalan flufenamide o un suo sale accettabile farmaceuticamente in una soluzione accettabile fisiologicamente.

La dicitura una “soluzione accettabile fisiologicamente” come definita nella presente, è una soluzione acquosa, come una soluzione di NaCl (come circa 0,9% in peso di NaCl) o soluzione di glucosio, come circa 4,5-5,5% in peso di glucosio, ad es. circa 5% in peso, o un'altra soluzione accettabile fisiologicamente. Qualsiasi soluzione tale può opzionalmente essere tamponata.

Una composizione farmaceutica comprendente melfalan flufenamide liofilizzato e una soluzione accettabile fisiologicamente per la somministrazione diretta ad un soggetto, generalmente comprende melfalan flufenamide ad una concentrazione di circa 1 mg/ml o meno, come circa 0,2 mg/ml. Tuttavia, la composizione farmaceutica può comprendere melfalan flufenamide in una concentrazione fino a circa 4 mg/ml per la diluizione in una soluzione accettabile fisiologicamente prima della somministrazione ad un paziente.

Un aspetto dell'invenzione fornisce un metodo per preparare un preparato farmaceutico liofilizzato, mediante il quale:

- a) melfalan flufenamide, o un suo sale accettabile farmaceuticamente, viene disciolto in un solvente organico per ottenere una soluzione di melfalan flufenamide;
- b) viene aggiunta acqua alla soluzione di melfalan flufenamide al fine di ottenere una soluzione acquosa di melfalan flufenamide, in una concentrazione di circa 0,2-3,0 mg/ml;
- c) almeno un eccipiente scelto dal gruppo comprendente β -ciclodestrina; α -ciclodestrina; idrossipropil- β -ciclodestrina; e solfobutiletere- β -ciclodestrina viene aggiunto alla soluzione di melfalan flufenamide; e
- d) la soluzione acquosa di melfalan flufenamide contenente eccipiente(i) viene sottoposta a liofilizzazione.

In una realizzazione di questo aspetto, viene fornito un metodo, mediante il quale:

- a) melfalan flufenamide, o un suo sale accettabile farmaceuticamente, viene disciolto in un solvente organico;
- b) viene aggiunta acqua alla soluzione ottenuta in passaggio a) al fine di ottenere una soluzione di detto melfalan flufenamide, in una concentrazione di circa 0,2-3,0 mg/ml;
- c) almeno un eccipiente scelto dal gruppo comprendente β -ciclodestrina; α -ciclodestrina; idrossipropil- β -

ciclodestrina; e solfobutiletere- β -ciclodestrina viene aggiunto saccarosio viene aggiunto alla soluzione ottenuta in passaggio b); e

d) la soluzione ottenuta in passaggio c) viene sottoposta a liofilizzazione.

Il solvente organico può essere scelto tra uno qualsiasi di etanolo, acido contenente etanolo, glicerina, propilenglicole, alcool benzilico, dimetilacetammide (DMA), N-metil-2-pirrolidone, isopropanolo, n-butanolo, terz-butanolo, metil terz-butil etere, propilenglicole, dimetilsolfossido, tetraidrofurano, 2-metil tetraidrofurano, acetone, dimetilformammide, acetonitrile, diossano, acido acetico, acido lattico, acido propionico, n-butanolo, isopropanolo, n-propanolo, terz-butanolo, sec-butanolo, metanolo, e una miscela di etanolo e acqua. Preferibilmente, detto solvente organico è etanolo.

L'eccipiente può essere scelto dal gruppo comprendente β -ciclodestrina; α -ciclodestrina; idrossipropil- β -ciclodestrina; e solfobutiletere- β -ciclodestrina.

Il melfalan flufenamide in detti metodi è preferibilmente melfalan flufenamide cloridrato (J1).

Nella presente viene descritto un metodo per la preparazione di un preparato farmaceutico liofilizzato come descritto nella presente, mediante il quale

- a) melfalan flufenamide, o un suo sale accettabile farmaceuticamente, viene disciolto in un solvente organico;
- b) viene aggiunta acqua alla soluzione ottenuta in passaggio a) al fine di ottenere una soluzione di detto melfalan flufenamide o un suo sale accettabile farmaceuticamente, in una concentrazione di circa 0,2-3,0 mg/ml;
- c) almeno un eccipiente come definito nella presente, viene aggiunto alla soluzione ottenuta in passaggio b); e
- d) la soluzione ottenuta in passaggio c) viene sottoposta a liofilizzazione.

Preferibilmente, detto solvente organico è etanolo.

Nella presente viene descritto un metodo per la preparazione di un preparato farmaceutico liofilizzato come descritto nella presente, mediante il quale

- a) melfalan flufenamide cloridrato (J1), viene disciolto in un solvente organico;
- b) viene aggiunta acqua alla soluzione ottenuta in passaggio a) al fine di ottenere una soluzione di detto melfalan flufenamide cloridrato (J1), o un suo sale accettabile farmaceuticamente, in una concentrazione di circa 0,2-3,0

mg/ml;

- c) almeno un eccipiente come definito nella presente, viene aggiunto alla soluzione ottenuta in passaggio b); e
- d) la soluzione ottenuta in passaggio c) viene sottoposta a liofilizzazione.

Esempi di solventi organici utili per disciogliere melfalan flufenamide, o un suo sale accettabile farmaceuticamente in passaggio a), possono essere uno qualsiasi scelto tra etanolo, acido contenente etanolo, glicerina, propilenglicole, alcool benzilico, dimetilacetammide (DMA), N-metil-2-pirrolidone, isopropanolo, n-butanolo, terz-butanolo, metil terz-butil etere, propilenglicole, dimetilsolfossido, tetraidrofurano, 2-metil tetraidrofurano, acetone, dimetilformammide, acetonitrile, diossano, acido acetico, acido lattico, acido propionico, n-butanolo, isopropanolo, n-propanolo, terz-butanolo, sec-butanolo, metanolo, e una miscela di etanolo e acqua.

Nella presente viene descritto un metodo per la preparazione di un preparato farmaceutico liofilizzato come descritto nella presente, mediante il quale

- a) melfalan flufenamide, o un suo sale accettabile farmaceuticamente, viene disciolto in un solvente organico scelto da uno qualsiasi di etanolo, acido contenente etanolo, glicerina, propilenglicole, alcool benzilico, dimetilacetammide (DMA), N-metil-2-pirrolidone, isopropanolo, n-butanolo, terz-butanolo, metil terz-butil etere, propilenglicole, dimetilsolfossido, tetraidrofurano, 2-metil tetraidrofurano, acetone, dimetilformammide, acetonitrile, diossano, acido acetico, acido lattico, acido propionico, n-butanolo, isopropanolo, n-propanolo, terz-butanolo, sec-butanolo, metanolo, e una miscela di etanolo e acqua;
- b) viene aggiunta acqua alla soluzione ottenuta in passaggio a) al fine di ottenere una soluzione di detto melfalan flufenamide o un suo sale accettabile farmaceuticamente, in una concentrazione di circa 0,2-3,0 mg/ml;
- c) almeno un eccipiente come definito nella presente, viene aggiunto alla soluzione ottenuta in passaggio b); e
- d) la soluzione ottenuta in passaggio c) viene sottoposta a liofilizzazione.

Nella presente viene descritto un metodo per la preparazione di un preparato farmaceutico liofilizzato come descritto nella presente, mediante il quale

- a) melfalan flufenamide cloridrato (J1), viene disciolto in un solvente organico scelto tra uno qualsiasi di

etanolo, acido contenente etanolo, glicerina, propilenglicole, alcool benzilico, dimetilacetammide (DMA), N-metil-2-pirrolidone, isopropanolo, n-butanolo, terz-butanolo, metil terz-butil etere, propilenglicole, dimetilsolfossido, tetraidrofurano, 2-metil tetraidrofurano, acetone, dimetilformammide, acetonitrile, diossano, acido acetico, acido lattico, acido propionico, n-butanolo, isopropanolo, n-propanolo, terz-butanolo, sec-butanolo, metanolo, e una miscela di etanolo e acqua;

b) viene aggiunta acqua alla soluzione ottenuta in passaggio a) al fine di ottenere una soluzione di detto melfalan flufenamide cloridrato (J1), o un suo sale accettabile farmaceuticamente, in una concentrazione di circa 0,2-3,0 mg/ml;

c) almeno un eccipiente come definito nella presente, viene aggiunto alla soluzione ottenuta in passaggio b); e

d) la soluzione ottenuta in passaggio c) viene sottoposta a liofilizzazione.

Quando l'acido contenente etanolo viene usato per disciogliere melfalan flufenamide o un suo sale accettabile farmaceuticamente in passaggio a) nel metodo di cui sopra, l'acido può essere HCl, in una concentrazione di ad esempio 5-20 mM, o la concentrazione di HCl può essere ad esempio di 10 mM, nell'etanolo.

Quando melfalan flufenamide o un suo sale accettabile farmaceuticamente viene disciolto in etanolo e acqua, la concentrazione di etanolo può essere di circa 10-100% in volume, come 10-90% in volume, 50-90% in volume, o circa 70% in volume.

L'acqua usata per disciogliere e/o diluire campioni di un preparato farmaceutico liofilizzato secondo la presente invenzione, è acqua sterile o purificata, o acqua per iniezione (WFI).

Quando viene usato l'etanolo per disciogliere melfalan flufenamide o un suo sale accettabile farmaceuticamente, la soluzione ottenuta in passaggio a) viene diluita in passaggio b) in modo che la concentrazione di etanolo, sia di circa 2%-100% in volume, come circa 2, 5, 10 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100%, o come 5-15%, o come 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15%. Generalmente, la concentrazione di etanolo dopo il passaggio di diluizione b) è di circa 9%.

La soluzione ottenuta in passaggio b) può essere filtrata in maniera sterile prima del passaggio di liofilizzazione c).

Il passaggio di liofilizzazione c) comprende i passaggi tipici di congelamento ed essiccazione primaria e secondaria come descritti nella presente. Le informazioni su come si esegue la liofilizzazione possono essere trovate ad es. in Rey, L. e May, J. *Freeze Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products* (2010), ISBN 978-1439B2575-4. Nel passaggio di congelamento, il campione viene ad esempio congelato in una vasca di ghiaccio secco-acetone ad una temperatura di circa -70°C fino a -90°C, come circa -70°C, -75°C, -78°C, -80°C, -82°C, -85°C, -88°C o -90°C ad esempio per 10 minuti fino a 120 minuti.

In alternativa, il campione può essere congelato in un congelatore ad una temperatura da circa -14°C a -25°C, come -14°C, -16°C, -18°C, -20°C, -22°C, o -25°C, ad esempio per circa 10 minuti fino a 24 ore. È inoltre possibile congelare il campione in azoto liquido.

Passaggio c) può essere eseguito mediante l'applicazione di tecniche convenzionali per la liofilizzazione, si veda ad es. Rey, L. e May, J. *Freeze Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products* (2010), ISBN 978-1439B2575-4.

Ad esempio, nel passaggio di essiccazione primaria, la pressione può essere abbassata fino a circa 0,1 millibar fino a 50 millibar, ad esempio da 1 millibar a 10 millibar. La temperatura è generalmente inferiore a 0°C, come da -50 a 0°C, o da -20 a -1°C, ad es. -50, -40, -30, -20, -10, o -5°C. Questa fase può durare ad esempio da 4 ore a 48 ore, ad es. da 12 ore a 24 ore.

Nel passaggio finale di essiccazione secondaria, quando la maggior parte dell'acqua è evaporata, la temperatura può essere come nel passaggio di essiccazione primaria o superiore a 0°C.

Quando uno o più eccipienti come definiti nella presente devono essere presenti durante la liofilizzazione, questi possono essere aggiunti in passaggio b) prima o dopo aver diluito la soluzione ottenuta in passaggio a) e prima di eseguire la liofilizzazione. Gli eccipienti possono essere aggiunti sotto forma di polvere ma vengono generalmente aggiunti come soluzione acquosa. Gli eccipienti possono quindi essere presenti durante la liofilizzazione.

Nella presente viene inoltre descritto un preparato farmaceutico liofilizzato come definito nella presente ottenibile mediante il metodo sopra descritto.

Nella presente è inoltre fornito un kit di parti comprendente:

(i) un primo contenitore comprendente un preparato farmaceutico liofilizzato comprendente melfalan flufenamide come descritto nella presente; e

(ii) un secondo contenitore comprendente una soluzione accettabile fisiologicamente, ad esempio una soluzione di NaCl (come circa 0,9% in peso di NaCl) o una soluzione di glucosio, come una soluzione di glucosio di circa 4,5-5,5% in peso, ad es. soluzione a circa 5% in peso di glucosio, o altra soluzione accettabile fisiologicamente.

Tale kit può inoltre comprendere un dispositivo per miscelare i contenuti dei due contenitori l'uno con l'altro e/o per trasferire la miscela risultante ad un dispositivo, come una sacca comprendente una soluzione di glucosio, per la somministrazione ad un paziente.

Tale kit può essere costituito dal primo contenitore comprendente un preparato farmaceutico liofilizzato comprendente melfalan flufenamide come descritto nella presente e il secondo contenitore comprendente la soluzione accettabile fisiologicamente. Il melfalan flufenamide nel kit può anche essere in miscela con un veicolo e/o eccipiente accettabile farmaceuticamente. Un esempio è il 5% di glucosio con ad es. 1% di albumina o un'altra proteina o composto. La quantità di soluzione accettabile fisiologicamente può essere una piccola quantità al fine di preparare una soluzione concentrata del preparato farmaceutico liofilizzato comprendente melfalan flufenamide, o una quantità maggiore al fine di consentire la preparazione di una soluzione avente la concentrazione desiderata per la somministrazione ad un paziente. In alternativa, il kit può comprendere sia un contenitore comprendente una soluzione accettabile fisiologicamente per preparare una soluzione concentrata del preparato farmaceutico liofilizzato e un secondo contenitore, come una sacca per l'infusione, comprendente una quantità maggiore di una soluzione accettabile fisiologicamente per la preparazione della soluzione più diluita per la somministrazione ad un soggetto.

Un preparato farmaceutico liofilizzato, composizione farmaceutica o kit fornito nella presente può comprendere solo melfalan flufenamide o un suo sale accettabile farmaceuticamente come agente antitumorale. Tuttavia, il melfalan flufenamide può anche essere combinato con uno o più agenti antitumorali, come altre sostanze antitumorali come gemcitabina, etoposide, doxorubicina o taxani o altre sostanze efficaci terapeutamente.

Quando combinati con altri agenti antitumorali questi possono essere miscelati con melfalan flufenamide o un suo sale accettabile farmaceuticamente prima della liofilizzazione e di conseguenza liofilizzati insieme a melfalan flufenamide o un suo sale accettabile farmaceuticamente o combinati con melfalan flufenamide liofilizzato o un suo sale accettabile farmaceuticamente dopo la liofilizzazione, come in un kit o una composizione farmaceutica. Anche il melfalan flufenamide liofilizzato può essere miscelato con una o più sostanze antitumorali in forma essiccata, anche se non liofilizzata, dopo la liofilizzazione di melfalan flufenamide o un suo sale accettabile farmaceuticamente.

Melfalan flufenamide fornito nella presente ha un'attività citotossica e può quindi essere usato nella prevenzione e/o trattamento del cancro come descritto altrove (si veda ad es. WO 01/96367). Una riduzione della sopravvivenza delle cellule tumorali del composto veniva dimostrata in WO 01/96367 per diversi tumori ematologici e/o solidi, ad es. cancro del polmone, mieloma, linfoma, leucemia, cancro al seno, e carcinoma ovarico. Inoltre, in WO 01/96367 veniva dimostrato che il composto evitava la resistenza al melfalan. Il composto può quindi essere usato nella prevenzione e/o trattamento del cancro, riducendo la crescita del tumore e/o uccidendo le cellule tumorali. Pertanto, il composto può essere usato per curare e/o prolungare la sopravvivenza di pazienti affetti da malattie tumorali.

Nella presente è inoltre fornito il preparato farmaceutico liofilizzato, kit o composizione farmaceutica come descritti e rivendicati nella presente, per uso come medicinale. L'invenzione è inoltre diretta a tale preparato farmaceutico liofilizzato, kit o composizione farmaceutica, per uso nel trattamento e/o prevenzione del cancro, come cancro ovarico, cancro al polmone, cancro della vescica, mesotelioma, mieloma multiplo, cancro al seno e/o qualsiasi altro cancro solido o ematologico.

Nella presente viene inoltre descritto l'uso di un preparato farmaceutico liofilizzato, kit o composizione farmaceutica, come descritti e rivendicati nella presente, per la preparazione di un medicinale per il trattamento e/o prevenzione del cancro, come cancro ovarico, cancro al polmone, cancro della vescica, mesotelioma, mieloma multiplo, cancro al seno e/o qualsiasi altro tumore solido o ematologico.

Ancora un aspetto della presente invenzione è un preparato farmaceutico liofilizzato, o composizione

farmaceutica comprendente melfalan flufenamide cloridrato (J1) in combinazione con un altro farmaco utile nel trattamento del cancro, per uso nel trattamento e/o prevenzione del cancro, come cancro ovarico, cancro al polmone, cancro della vescica, mesotelioma, mieloma multiplo, cancro al seno e/o qualsiasi altro tumore solido o ematologico.

Nella presente è inoltre descritto un metodo per il trattamento e/o prevenzione del cancro, come cancro ovarico, cancro al polmone, cancro della vescica, mesotelioma, mieloma multiplo, cancro al seno e/o qualsiasi altro tumore solido o ematologico. Il metodo può comprendere la somministrazione di un preparato farmaceutico liofilizzato, un kit o una composizione farmaceutica come forniti nella presente in una dose efficace terapeuticamente ad un soggetto che ne ha bisogno. Il soggetto è generalmente un umano o un animale domestico.

Nella presente viene inoltre descritto un metodo per il trattamento e/o prevenzione del cancro, come cancro ovarico, cancro al polmone, cancro della vescica, mesotelioma, mieloma multiplo, cancro al seno e/o qualsiasi altro tumore solido o ematologico, in cui il preparato farmaceutico liofilizzato, un kit o una composizione farmaceutica comprendente melfalan flufenamide cloridrato (J1) vengono forniti in una dose efficace terapeuticamente ad un soggetto che ne ha bisogno, in combinazione con un altro farmaco, utile nel trattamento del cancro. Il soggetto è generalmente un umano o un animale domestico.

La somministrazione di un preparato farmaceutico liofilizzato, un kit o una composizione farmaceutica ad un soggetto che ne ha bisogno può avvenire mediante iniezioni endovenose. È inoltre possibile somministrare melfalan flufenamide liofilizzato o una composizione farmaceutica comprendente tale melfalan flufenamide liofilizzato nelle cavità del corpo, come l'instillazione nella vescica, o nelle cavità peritoneali o della pleura.

Melfalan flufenamide o un suo sale accettabile farmaceuticamente possono essere somministrati in una quantità di circa 20-130 mg, come ad esempio 30-75 mg, ad esempio una quantità totale di 50 mg di melfalan flufenamide per somministrazione. La composizione farmaceutica o kit fornito nella presente comprendente melfalan flufenamide può quindi avere una quantità di melfalan flufenamide liofilizzato tale che questa quantità possa essere somministrata.

Melfalan flufenamide liofilizzato o un suo sale accettabile farmaceuticamente può essere somministrato quotidianamente, a giorni alterni o ogni tre giorni, settimanalmente, ogni due, tre o 4 settimane o addirittura come singola dose elevata (ad es. prima del trapianto) a seconda del soggetto e forma di cancro da trattare.

La dicitura "prevenzione", come usata nella presente, è destinata ad includere la terapia in un paziente che è stato sottoposto a chemioterapia contro qualsiasi forma di cancro come descritta nella presente, e che è sottoposto a terapia continua allo scopo di prevenire qualsiasi metastasi che si presenta da detto cancro.

Nella presente è descritto l'uso di un eccipiente scelto dal gruppo comprendente polisorbato 80; PEG 400; β -ciclodestrina; α -ciclodestrina; idrossipropil- β -ciclodestrina; solfobutiletere- β -ciclodestrina; lattosio; alcol benzilico; succinato disodico; glicole propilenico; PEG 300; Cremophor EL; Dimetilsolfossido; D-mannitolo; trealosio; Saccarosio; e istidina, in un preparato liofilizzato di melfalan flufenamide, o un suo sale accettabile farmaceuticamente, per ridurre il tempo di ricostituzione del preparato liofilizzato di melfalan flufenamide, o un suo sale accettabile farmaceuticamente, quando ricostituito in un solvente acquoso.

Detto melfalan flufenamide, o un suo sale accettabile farmaceuticamente, è ad esempio melfalan flufenamide cloridrato (J1).

Detto melfalan flufenamide, o un suo sale accettabile farmaceuticamente, viene ad esempio sciolto in etanolo prima di sottoporre detto melfalan flufenamide a detto eccipiente.

In questo documento "liofilizzazione", "essiccazione per congelamento", "liofilizzato", "essiccato per congelamento" e simili possono essere usati in modo equivalente.

Il polisorbato 80 (avente il nome chimico poliossietilene 20 sorbitano monoleato e il numero di registro CAS 9005-65-6) è disponibile in commercio ad es. da Fluka o Sigma-Aldrich.

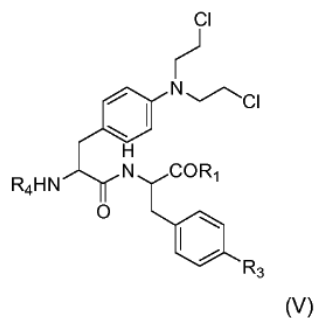
PEG 400 ha la formula empirica $\text{HOCH}_2(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_m\text{CH}_2\text{OH}$, dove m è 8,7 e il peso molecolare medio è di 380-420, ed è disponibile in commercio ad es. da Fluka o Sigma-Aldrich.

PEG 300 ha la formula empirica $\text{HOCH}_2(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_m\text{CH}_2\text{OH}$, dove m è 6,4, e il peso molecolare medio è di 285-315, ed è disponibile in commercio ad es. da Fluka o Sigma-Aldrich.

Cremophor EL® è un marchio venduto da Sigma-Aldrich, ed è olio di ricino poliossietilenato avente **Numero di**

registro CAS 61791-12-6.

Dipeptidi citotossici illustrativi che possono essere usati come descritto nella presente sono anche descritti in WO01/96367 e possono avere la formula V



in cui

R_1 è alchilossile, cicloalchilossile, arilossile, arilalchilossile, NH_2 , gruppo alchilamminico, cicloalchilamminico o arilamminico;

R_3 è NH_2 , OH, O-alchile, N-alchile, O-acile, NH-acile, $N(CH_2CH_2Cl)_2$, NO_2 , F, CF_3 o H; e

R_4 è un amminoacido ciclico o aromatico naturale o modificato, o H; così come i suoi sali accettabili farmaceuticamente.

Inoltre, peptidi citotossici che possono essere usati come descritto nella presente includono peptidi di formula I o V, in cui R_3 è F. I dipeptidi sono esempi di peptidi di formula I o V, in cui R_1 è alchilossile; R_3 è F, CF_3 , H, OH, O-alchile, NO_2 , $N(CH_2CH_2Cl)_2$, NH-acile o NH_2 ; e R_4 è H.

I tripeptidi sono esempi di peptidi di formula I o V, in cui R_1 è alchilossile; R_3 è F, CF_3 , H, OH, O-alchile, NH-acile, NO_2 , $N(CH_2CH_2Cl)_2$ o NH_2 ; e R_4 è un amminoacido ciclico o aromatico naturale o modificato.

Melfalan flufenamide, o un suo sale accettabile farmaceuticamente, può essere preparato come descritto in WO 01/96367. Esempio 1 di WO 01/96367 descrive una procedura sintetica per produrre melfalan flufenamide (estere etilico di L-melfalanil-L-p-fluorofenilalanina), così come il suo sale cloridrato - melfalan flufenamide cloridrato J1 (estere etilico di L-melfalanil-L-p-fluorofenilalanina, composto J1).

I derivati dipeptidici descritti in WO01/96367 possono essere sintetizzati da melfalan protetto da *terz*-

butossicarbonile (Boc) come ivi descritto e possono essere liofilizzati e usati come descritto nella presente. Inoltre, WO01/96367 descrive la preparazione di derivati tripeptidici, in cui gli amminoacidi protetti da Boc sono stati accoppiati al derivato dipeptidico contenente melfalan usando EDC/NMM/HOBt come reagenti di accoppiamento (EDC è trietilammina o 1-[3-dimetilammino]propil]-3-etilcarbodiimmide cloridrato, NMM è N-metilmorfolina e HOBt è 1-idrossibenzotriazolo). Nella presente viene descritto che tali derivati tripeptidici possono essere liofilizzati e usati come descritto nella presente.

Nella presente è descritto che esempi di derivati di melfalan che possono essere liofilizzati e usati come descritto nella presente includono melfalan flufenamide, estere isopropilico di L-melfalanil-L-*p*-fluorofenilalanina (JV28), estere etilico di L-prolinil-L-melfalanil-L-*p*-fluorofenilalanina (J3) (Fig. 7) e loro sali accettabili farmaceuticamente. Questi composti sono descritti in precedenza in WO01/96367, che fornisce inoltre metodi per la loro preparazione. Melfalan flufenamide, JV28 e J3 possono essere trasformati in melfalan nel corpo. In WO 01/96367, è stato dimostrato che questi derivati hanno un'attività aumentata di uccisione delle cellule contro i tumori, anche quando usati a concentrazioni inferiori rispetto al melfalan. Inoltre, la resistenza a melfalan potrebbe essere evitata.

L'invenzione verrà inoltre descritta per mezzo dei seguenti esempi.

Sezione sperimentale

Esempio 1: Liofilizzazione di melfalan flufenamide cloridrato (J1) in condizioni diverse

In questo esperimento è stata provata la liofilizzazione di melfalan flufenamide cloridrato (J1), in varie condizioni.

Esempio 1A

Quantità pesate di J1 sono state disciolte in vari volumi di acqua deionizzata in vasca ad ultrasuoni con leggero riscaldamento per ottenere soluzioni chiare. I campioni sono stati congelati in una vasca di ghiaccio secco - acetone (-78°C, campioni A1-A3) o in un congelatore a -16°C (campioni B1-B3). L'essiccazione a freddo è stata quindi condotta per 16 h ad una pressione di 1 millibar a temperatura ambiente con sifone di ghiaccio secco-acetone (-78°C) tra il flacone di essiccazione e la pompa.

L'aspetto visivo dopo l'essiccazione era come riassunto in Tabella 1.

Tabella 1. Sei diverse soluzioni di J1 a diverse concentrazioni a freddo o temperature.

Esp. N.	mg di J1	mL di acqua	conc. (mg/mL)	aspetto dopo l'essiccazione
J1A1	2,4	6	0,4	bianco soffice
J1A2	2,7	27	0,1	bianco soffice – una parte essiccata in maniera incompleta
J1A3	2,5	10	0,25	bianco soffice
J1B1	2,7	6,75	0,4	bianco solido
J1B2	2,5	25	0,1	polvere gialla chiara
J1B3	2,8	11,2	0,25	bianco soffice

Esempio 1B

Campioni dei composti essiccati sono stati disciolti in acetonitrile acquoso al 50% e analizzati mediante HPLC (colonna ACE, C8, 50x3 mm, 10-97% di CH₃CN in 3 min., 1 mL/min). In un caso (J1A1) la soluzione acquosa è stata analizzata mediante HPLC prima dell'essiccazione a freddo (J1A1-inizio). Le purezze dopo l'essiccazione erano come riassunte in Tabella 2.

Tabella 2. Purezza dopo l'essiccazione a freddo. Rt = Tempo di ritenzione

Esp. N.	J1: Rt 2,27 (%)	Rt 1,87 (%)	Rt 1,44 (%)
J1A1-inizio	88	12	
J1A1	79	21	
J1A2	80	20	

J1A3	41	45	14
J1B1	34	42	25
J1B2	36	43	21
J1B3	79	21	

Esempio 1C

Successivamente è stata provata all'uso acqua leggermente acida (ad esempio 0,01% di HCl) per aumentare la velocità di dissoluzione o per disciogliere prima J1 in etanolo, prima di aggiungere acqua (neutra o leggermente acida).

Tre campioni di J1 sono stati preparati mediante la dissoluzione di melfalan flufenamide (circa 3 mg) in etanolo acquoso al 70% (0,5 mL). Le soluzioni sono state diluite con 5 mM di HCl per dare una concentrazione di 0,4 mg/mL. Poiché melfalan flufenamide si è disciolto rapidamente in etanolo acquoso non è stato necessario usare la vasca ad ultrasuoni o il riscaldamento per ottenere una soluzione chiara. Le soluzioni sono state poi congelate in una vasca del sifone di ghiaccio secco - acetone (-78°C) tra il flacone di essiccazione e la pompa. L'aspetto visivo dopo l'essiccazione era come riassunto in Tabella 3.

Tabella 3. Tre replicati di J1 disciolti in etanolo e acido.

Esp. N.	mg di J1	mL di HCl	conc. (mg/mL)	aspetto dopo l'essiccazione
J1C1	3,0	7,0	0,4	bianco solido una parte del quale ha aderito al vetro
J1C2	3,2	7,	0,4	bianco solido una parte del quale ha aderito al vetro
J1C3	2,9	6,75	0,4	bianco solido una parte del quale ha aderito al vetro

Esempio 1 D

Su ciascun campione sono state effettuate due esecuzioni di HPLC: una dal composto solido che è stato possibile rimuovere dal flacone e una mediante la dissoluzione del resto del composto nel flacone (tabella 4).

Tabella 4. Purezza dopo l'essiccazione a freddo.

Esecuzione 1

Esp. N.	J1: Rt (%)	Rt (%)	Rt (%)
J1C1	2,25 (97%)	2,32 (3%)	
J1C2	2,24 (97%)	1,87 (1%)	1,98 (1%)
J1C3	2,22 (99%)	1,87 (1%)	

Esecuzione 2

Esp. N.	J1: Rt (%)	Rt (%)	Rt (%)
J1C1	2,25 (100%)		
J1C2	2,25 (95%)	1,88 (3%)	1,98 (2%)
J1C3	2,25 (97%)	1,87 (3%)	

In conclusione, mediante la dissoluzione di J1 in etanolo al 70%, diluizione con 5 mM di HCl ed essiccazione a freddo sono stati ottenuti tre campioni con purezza > 95%.

Esempio 1E

Si è poi provato ad omettere l'acido e invece diluire l'etanolo con acqua deionizzata. Tre campioni di J1 sono stati preparati mediante la dissoluzione di J1 (circa 3 mg) in etanolo acquoso al 70% (0,5 mL) a temperatura ambiente. Le soluzioni sono state diluite con acqua deionizzata per dare una concentrazione di 0,4 mg/mL. Le soluzioni sono state poi congelate in una vasca di ghiaccio secco-acetone (-78°C). L'essiccazione a freddo è stata quindi condotta per 16 h ad una pressione di 1 millibar a temperatura ambiente con un sifone di ghiaccio secco-acetone (-78°C) tra il flacone di essiccazione e la pompa. L'aspetto visivo dopo l'essiccazione era come riassunto in Tabella 5 e le purezze in Tabella 6.

Tabella 5. Tre replicati di J1 disciolti in etanolo e acqua.

Esp. N.	mg di J1	mL di acqua	conc. (mg/mL)	aspetto dopo l'essiccazione
J1D1	3,15	7,37	0,4	bianco solido soffice
J1D2	3,11	7,27	0,4	bianco solido soffice
J1D3	3,17	7,42	0,4	bianco solido soffice

Tabella 6. Purezza dopo l'essiccazione a freddo.

Esp. N.	J1: Rt (%)
J1D1	2,26 (circa 100%)
J1D2	2,26 (circa 100%)
J1D3	2,25 (circa 100%)

Mediante la dissoluzione di J1 in etanolo al 70%, la diluizione con acqua e l'essiccazione a freddo; sono stati ottenuti tre campioni replicati con la stessa purezza del materiale di partenza.

Esempio 2: Effetto degli eccipienti sulla velocità di dissoluzione di melfalan flufenamide liofilizzato

In questo esperimento è stato provato l'effetto sulla velocità di dissoluzione mediante l'aggiunta di eccipienti al processo di essiccazione a freddo di melfalan flufenamide cloridrato (J1). Sono stati usati i seguenti eccipienti, dei quali tutti sono agenti di formulazione comuni Generalmente Considerati Come Sicuri (GRAS) secondo la FDA (US Food and Drug Administration):

- D-mannitolo, trealosio e saccarosio;
- Trizma cloridrato e L-istidina;
- Polisorbato 80, β -ciclodestrina;

J1 è stato usato in tutti gli esperimenti.

D-Mannitolo, è stato acquistato da Sigma n. 33440;

D-(+)-Trealosio diidrato, è stato acquistato da Sigma n. T9449-25 g;

Trizma cloridrato, è stato acquistato da Sigma n. T3253-100 g;

β -Ciclodestrina cloridrato, è stato acquistato da Sigma n. 856088-5 g;

Polisorbato 80, è stato acquistato da Fluka 59924-100 g.

L'essiccazione a freddo è stata eseguita su un'apparecchiatura Leybold Lyovac GT2. La LCMS (Cromatografia liquida-spettrometria di massa) è stata eseguita su un sistema HP1100 usando acetonitrile-0,1% di acido trifluoroacetico in acqua come eluente. È stata usata una colonna ACE C8, 50 x 3 mm e un gradiente del 10-97% di acetonitrile in 3 min. Le fiale con filtro provenivano da Whatman, Mini-UniPrep, 0,45 μ m.

(i) Metodo A, essiccazione a freddo

Melfalan flufenamide (30,1 mg) è stato disciolto in 5 mL di etanolo al 70% con 1 mM di HCl, dissoluzione totale entro 12 min. a 18-19°C. La soluzione è stata diluita con acqua (70 mL) e distribuita (10 mL) in flaconi da 250 mL a fondo rotondo con e senza eccipiente (ad es. β -ciclodestrina, 9 mg). Quando tutto il materiale si è disciolto, le soluzioni sono state congelate per immersione in una vasca di ghiaccio secco/acetone a -78°C. Le soluzioni congelate sono state poi liofilizzate a <0,1 millibar per una notte e temperatura ambiente, con l'evaporazione che manteneva i campioni congelati fino all'essiccazione.

(ii) Metodo A, misurazione della velocità di dissoluzione

Una soluzione al 5% di glucosio (10 mL) è stata aggiunta in una porzione a 18,5-19°C al materiale essiccato a freddo e agitata con un magnete. Sono state prelevate aliquote (circa 0,3 mL) con siringa da 1 mL in vari momenti e filtrate attraverso una fiala con filtro (0,45 μ m). Il filtrato (8 μ L) è stato analizzato mediante HPLC.

(iii) Metodo B, essiccazione a freddo

Melfalan flufenamide (10,2 mg) è stato disciolto in 1,67 mL di etanolo al 70% con 5 mM di HCl, dissoluzione totale entro 5 minuti a 25°C. La soluzione è stata diluita con acqua (23,3 mL) e distribuita (10 mL) in flaconi con e senza eccipienti (ad es. β -ciclodestrina, 9 mg). La soluzione di J1 ed eccipiente è stata erogata in fiale di plastica con un filtro di inserto adatto da 0,45 μ m (0,25 mL per ciascuna fiala). Le fiale sono state congelate per immersione in una vasca di ghiaccio secco/acetone a -78°C e poi mantenute a -20°C per una notte in un

portaprovette adatto alle fiale. Le fiale congelate sono state ricoperte con un foglio di alluminio per evitare la contaminazione incrociata e mantenute nel portaprovette pre-raffreddato a -20°C, esponendo nel contempo il portaprovette in un essiccatore a <0,1 millibar per una notte, con l'evaporazione che manteneva i campioni congelati fino all'essiccazione.

(iv) Metodo B, misurazione della velocità di dissoluzione

È stata aggiunta una soluzione al 5% di glucosio (0,5 mL), che conteneva uno standard interno (acido 3-metossibenzoico, 0,08 mg/mL). Dopo diversi momenti (15 s - 12 min.) il contenuto delle fiale è stato filtrato, il filtrato trasferito direttamente in fiale di vetro per evitare la perdita di materiale non disciolto nel filtrato e 8 µl di filtrato iniettati nella LCMS.

Determinazione della velocità di dissoluzione

In un primo approccio, Metodo A, soluzioni acquose di J1 con diversi additivi sono state essiccate a freddo in flaconi a fondo rotondo. A ciascun composto essiccato a freddo, è stata aggiunta una soluzione di glucosio con agitazione controllata. Sono state prelevate piccole aliquote con una siringa in momenti specifici e filtrate attraverso un filtro GHP per siringa da 0,45 µm. Il grado di dissoluzione di J1 nel filtrato è stato poi determinato mediante HPLC. Questo metodo è stato usato con melfalan flufenamide essiccato a freddo da solo e insieme a D-mannitolo, trealosio, saccarosio, Polisorbato 80 e β-ciclodestrina. Il risultato di queste prove ha dimostrato che J1 si è completamente disciolto entro 2-4 minuti indipendentemente dall'eccipiente (si veda Fig. 1, senza eccipienti, e Fig. 2, con eccipienti. Si veda anche Tabella 7). Infatti, il tasso di dissoluzione per J1 liofilizzato con eccipienti era in realtà più veloce di quanto sia stato possibile misurare usando questo metodo.

Tabella 7. Aggiunte di eccipiente a J1 (4 mg) durante l'essiccazione a freddo, Metodo A.

Materiale essiccato a freddo	Rapporto J1: additivo (mg di J1: mg di additivo)	Numero di esperimenti
D-Mannitolo *	4:2	1
D-Mannitolo *	4:10	2

Trealosio *	4:2	1
Trealosio *	4:10	2
Saccarosio*	4:10	1
β-Ciclodestrina	4:9	1
β- Ciclodestrina	4:18	2
Polisorbato 80 *	4:0,05	1
Polisorbato 80 *	4:0,265	2

* Esempio al di fuori delle rivendicazioni

Per migliorare la precisione e permettere la misurazione della dissoluzione a intervalli più brevi, è stato sviluppato il Metodo B. In questo metodo, soluzioni acquose di melfalan flufenamide ed eccipienti (si veda Tabella 2) sono state aggiunte a fiale di plastica da 2 mL ed essiccate a freddo. Poi è stata aggiunta una soluzione di glucosio con acido 3-metossibenzoico come standard interno senza agitazione. Dopo periodi variabili (15 s-6 min.) il contenuto della fiala è stato filtrato con un inserto GHP per fiala da 0,45 µm, il filtrato trasferito in una fiala di vetro e il grado di dissoluzione di melfalan flufenamide cloridrato (J1) determinato mediante HPLC con standard interno. La mancanza di agitazione ha reso possibile un processo di dissoluzione più lento, più rilevante a livello clinico e la cui cinetica è più facile da misurare.

Con questo metodo è stato possibile seguire la cinetica di dissoluzione di J1 essiccato a freddo fino alla completa dissoluzione dopo 3-4 min. (si veda Fig. 3, senza eccipienti e Fig. 4, con eccipienti, si veda inoltre Tabella 8).

Tabella 8. Aggiunte di eccipienti a J1 (4 mg) durante l'essiccazione a freddo, Metodo B.

Materiale essiccato a freddo	Rapporto J1: additivo (mg di J1: mg di additivo)	Numero di esperimenti
J1: Mannitolo *	4:20	1
J1: Trealosio *	4:20	1

J1: β -Ciclodestrina	4:9	1
J1-Polisorbato *	4:5	1
J1: Trizma HCL *	4:8	1

* Esempio al di fuori delle rivendicazioni

La velocità di dissoluzione di J1, con e senza additivi, determinata con Metodo A e Metodo B, è riassunta in Tabella 9.

Tabella 9. Sommario dei tempi di dissoluzione di J1 con e senza additivi, Metodi A e B.

Materiale essiccato a freddo	Rapporto J1: additivo (mg di J1: mg di additivo)	Tempo (min.)	
		Metodo A	Metodo B
J1 senza additivi *		<2	3-4
J1: Trealosio *	4:2	<2	
J1: Trealosio *	4:10	<2	
J1: Trealosio *	4:20		0,5-1
J1:Saccarosio*	4:10	<2	
J1: Mannitolo *	4:2	<2	
J1: Mannitolo *	4:10	<2	
J1: Mannitolo *	4:20		0,5-0,75
J1: β -Ciclodestrina	4:9	<2	0,75-1
J1: β - Ciclodestrina	4:18	<2	
J1: Polisorbato *	4:0,05	<2	

J1: Polisorbato *	4:0,265	<2	
J1: Polisorbato *	4:5		0,25-0,5
J1: Trizma HCL *	4:8		>12

* Esempio al di fuori delle rivendicazioni

Purezza e recupero di J1

Un campione di melfalan flufenamide cloridrato (J1) è stato disciolto in 50% di acetonitrile acquoso e analizzato immediatamente con LCMS (Cromatografia liquida-spettrometria di massa), mostrando solo un picco (>99%). È stato osservato che la purezza di J1 subito dopo la dissoluzione in etanolo al 70% contenente 1 mM di HCl o 5 mM di HCl era di circa il 97%, con un sottoprodotto minore di circa il 3%. La quantità di questo sottoprodotto aumentava se la soluzione veniva lasciata a temperatura ambiente.

I risultati dimostrano che la velocità di dissoluzione di J1 essiccato a freddo in soluzione di glucosio con agitazione è stata più veloce di quanto si possa misurare (Metodo A), non consentendo di vedere l'effetto delle aggiunte di eccipienti. Usando un Metodo B più rilevante a livello clinico senza agitazione, è stato possibile seguire la dissoluzione di melfalan flufenamide essiccato a freddo nella soluzione di glucosio fino al completamento dopo 3-4 minuti. Le aggiunte di eccipienti β -ciclodestrina*, Polisorbato 80*, Mannitolo* e Trealosio* alla soluzione di melfalan flufenamide prima dell'essiccazione a freddo hanno tutte prodotto dissoluzione completa al di sotto di 1 minuto. La dissoluzione più veloce è stata data dall'aggiunta di Polisorbato 80*, che ha prodotto dissoluzione completa al primo punto di tempo di 15 secondi. [* = Esempio al di fuori delle rivendicazioni]

Esempio 3: Prova dell'effetto della concentrazione dell'eccipiente Polisorbato 80 sulla velocità di dissoluzione di melfalan flufenamide [Esempio al di fuori delle rivendicazioni]

Quanto segue è stato eseguito per provare la quantità di Polisorbato 80 dell'eccipiente da aggiungere nel processo di essiccazione a freddo di melfalan flufenamide e per massimizzare la velocità di dissoluzione in una soluzione al 5% di glucosio. È stato usato lo 0, 10, 50 e 100% in peso di Polisorbato 80, in relazione a melfalan

flufenamide. Gli esperimenti sono stati eseguiti in duplicato.

Melfalan flufenamide cloridrato (J1) è stato usato in tutti gli esperimenti. Il Polisorbato 80 usato è stato acquistato da Fluka, 59924-100 g.

L'essiccazione a freddo è stata eseguita su un'attrezzatura Leybold Lyovac GT2. La LCMS è stata eseguita su un sistema HP1100 usando acetonitrile-0,1% di acido trifluoroacetico in acqua come eluente. È stata usata una colonna ACE C8, 50 x 3 mm e un gradiente del 10-97% di acetonitrile in 3 min. Le fiale con filtro provenivano da Whatman, Mini-UniPrep, 0,45 µm.

La preparazione generale di 2 mg/mL di soluzione madre di melfalan flufenamide prima dell'essiccazione a freddo è stata effettuata come segue:

11,0 mg di melfalan flufenamide sono stati sospesi in 10 mM di HCl in EtOH assoluto (0,5 mL). La miscela è stata agitata per 30 minuti prima di aggiungere 0,2 mL di acqua. La miscela è stata agitata per 10 minuti a temperatura ambiente (soluzione chiara) prima di essere aggiunta ad una soluzione a 0°C di acqua (4,8 mL). 0,25 mL della soluzione sono stati trasferiti in una fiala di plastica contenente il 10%, 50% o 100% in peso di Polisorbato 80. La fiala è stata agitata, raffreddata ed essiccata a freddo.

È stata preparata una soluzione al 5% di glucosio con acido 3-metossibenzoico come standard interno sciogliendo l'acido 3-metossibenzoico (1,2 mg) in acqua (15 mL). La miscela è stata agitata per 1 ora prima che si aggiungessero 750 mg di glucosio in agitazione. Sono stati aggiunti 0,5 mL della soluzione al 5% di glucosio a ciascuna fiala di plastica essiccata a freddo e le miscele sono state filtrate, in diversi punti temporali, trasferite in una fiala di vetro e la dissoluzione di J1 è stata determinata mediante HPLC.

Determinazione del tasso di dissoluzione

J1 (11 mg) è stato sospeso in EtOH (0,5 mL) e agitato per 30 minuti a temperatura ambiente prima di aggiungere acqua (5 mL). La soluzione è stata divisa in 4 diversi flaconi contenenti lo 0%, 10%, 50% o 100% in peso (in relazione a J1) di Polisorbato 80. Le soluzioni sono state trasferite in fiale di plastica da 2 mL ed essiccate a freddo durante la notte.

Una soluzione al 5% di glucosio con acido 3-metossibenzoico come standard interno è stata aggiunta a ciascuna

fiala senza agitazione e le miscele sono state filtrate attraverso un inserto GHP per fiala da 0,45 µm in diversi punti di tempo (2-300 secondi). Il filtrato è stato immediatamente trasferito in una fiala di vetro per evitare la perdita di materiale non disciolto. La quantità di J1 disciolto rispetto allo standard interno è stata determinata usando HPLC.

Risultati

La velocità di dissoluzione di J1 (1 mg/mL in soluzione al 5% di glucosio) con, e senza Polisorbato 80, è riassunta in Tabella 10 e raffigurata in Fig. 5.

Tabella 10.

Materiale essiccato a freddo (1 mg/mL)	Tempo per raggiungere la dissoluzione allo stato stazionario (secondi)
J1 senza additivo	300-600
J1 con 10% di Polisorbato 80	30-60
J1 con 50% di Polisorbato 80	30-60
J1 con 100% di Polisorbato 80	30-60

Tabella 10 mostra che tutti i campioni contenenti J1 liofilizzato e l'eccipiente Polisorbato 80 si dissolvono molto più velocemente di J1 essiccato a freddo in assenza di eccipiente. Particolare attenzione è stata dedicata al campione contenente il 10% di Polisorbato 80 e i punti temporali di questo esperimento sono stati:

filtrazione immediata, 2 secondi, 15 secondi, 30 secondi e 5 minuti. Nel primo punto temporale in cui il campione è stato filtrato immediatamente, si era disciolto circa il 40% e dopo 2 secondi si era disciolto circa il 70%. La dissoluzione completa è stata raggiunta dopo 30-60 secondi.

Il tasso di dissoluzione di J1 essiccato a freddo a 1 mg/mL contenente quantità variabili di Polisorbato 80 in una soluzione al 5% di glucosio è stato inferiore a 1 minuto per tutti i campioni. La quantità minima di Polisorbato 80 per una dissoluzione rapida era tra il 10 e il 50% in peso.

Esempio 4: Prova dell'effetto delle concentrazioni degli eccipienti Polisorbato 80, PEG 400 e β -ciclodestrina sul tasso di dissoluzione di melfalan flufenamide

Questo esempio è stato condotto per studiare l'effetto di diverse concentrazioni degli eccipienti Polisorbato 80, PEG 400 e β -ciclodestrina aggiunti nel processo di essiccazione a freddo di melfalan flufenamide per massimizzare la solubilità e velocità di dissoluzione in una soluzione al 5% di glucosio verso l'obiettivo a lungo termine di sviluppare un materiale liofilizzato, stabile per la conservazione e con preparazione facile per il dosaggio.

Melfalan flufenamide cloridrato (J1) è stato usato in tutti gli esperimenti.

Polisorbato 80 usato è stato acquistato da Fluka (59924-100 g), β -ciclodestrina da Aldrich (856088) e PEG 400 da Clariant (100316).

L'essiccazione a freddo è stata eseguita su un'attrezzatura Leybold Lyovac GT2. La LCMS è stata eseguita su un sistema HP1100 usando acetonitrile-0,1% di acido trifluoroacetico in acqua come eluente. È stata usata una colonna ACE C8, 50 x 3 mm e un gradiente del 10-97% di acetonitrile in 3 min. Le fiale con filtro provenivano da Whatman, Mini-UniPrep, 0,45 μ m.

Preparazione generale di 2 mg/mL di soluzione madre di melfalan flufenamide per l'essiccazione a freddo

11,1 mg di melfalan flufenamide sono stati sospesi in 10 mM di HCl in EtOH assoluto (0,5 mL). La miscela è stata agitata per 30 minuti prima di aggiungere 0,2 mL di acqua. La miscela è stata agitata per 10 minuti a temperatura ambiente (soluzione chiara) prima di essere aggiunta in gocce ad una soluzione di acqua a 0°C (4,8 mL). 0,25 mL o 0,5 mL della soluzione sono stati trasferiti in una fiala di plastica contenente gli eccipienti. La fiala è stata agitata, raffreddata ed essiccata a freddo.

Esperimento di solubilità

Una soluzione al 5% di glucosio con uno standard interno è stata preparata mediante la dissoluzione di acido 3-metossibenzoico (1,2 mg) in acqua (15 mL). La miscela è stata agitata per 1 ora prima di aggiungere 750 mg di glucosio agitando. 0,2 mL della soluzione al 5% di glucosio sono stati aggiunti a ciascuna fiala di plastica essiccata a freddo e le miscele sono state agitate per 10-15 secondi e filtrate dopo 5 minuti. Il filtrato è stato

trasferito in una fiala di vetro e la solubilità di melfalan flufenamide è stata determinata mediante HPLC e una curva di calibrazione.

Determinazione della solubilità

È stata usata una soluzione madre da 2 mg/mL di melfalan flufenamide cloridrato (J1) come negli esperimenti precedenti.

Per una solubilità di 2,5 mg/mL di J1 nella soluzione al 5% di glucosio, 0,25 mL della soluzione madre sono stati erogati in fiale di plastica da 2 mL contenenti una miscela degli eccipienti determinati mediante progettazione sperimentale e le miscele sono state immediatamente raffreddate ed essiccate a freddo.

I livelli alti/bassi di ciascuno degli eccipienti (in % in peso rispetto al melfalan flufenamide) sono i seguenti: Polisorbato 80 (8%-80%), PEG 400 (80%-400%) e β -ciclodestrina (10%-50%). La quantità più alta di ciascun eccipiente è stata determinata dalla banca dati degli Ingredienti Inattivi della FDA dei farmaci registrati somministrati per via EV. β -ciclodestrina si trova nell'elenco GRAS (Generalmente Riconosciuto Come Sicuro) della FDA, ma non viene fornita nessuna raccomandazione per le iniezioni endovenose a nostra conoscenza, il che ha causato l'impostazione di un livello alto abbastanza conservativo. La percentuale in peso di ciascun eccipiente in relazione al melfalan flufenamide cloridrato (J1) (in peso) è mostrata in Tabella 11.

Tabella 11. Peso percentuale di ciascun eccipiente rispetto a J1.

Esperimento N.	Polisorbato 80 [%]	PEG 400 [%]	β -ciclodestrina [%]
1	8	400	10
2	8	80	10
3	8	400	50
4	8	80	50
5	80	400	10

6	80	80	10
7	80	400	50
8	80	80	50
9	44	240	30
10	44	240	30
11	44	240	30

Come è dimostrato in altri esperimenti nella presente, il tasso di dissoluzione di J1 è aumentato notevolmente con l'aggiunta di Polisorbato 80 nel processo di essiccazione a freddo. Sono stati eseguiti tre esperimenti per tentare di raggiungere una solubilità di 5 mg/mL. Una soluzione madre di J1 è stata aggiunta a 3 fiale di plastica diverse (esp. 12, 13 e 14) contenenti Polisorbato 80 (10%, 50% e 100% in peso rispetto a melfalan flufenamide). Le miscele sono state immediatamente raffreddate ed essiccate a freddo.

Una soluzione di glucosio al 5% con uno standard interno (acido 3-metossibenzoico) è stata aggiunta a ciascuna fiala e le fiale sono state agitate e lasciate riposare per 5 minuti. Le miscele sono state filtrate attraverso una fiala con filtro GHP da 0,45 µm e il filtrato è stato immediatamente trasferito ad una fiala di vetro per evitare la perdita di materiale non disciolto. La quantità di J1 disciolto è stata determinata usando HPLC e una curva di calibrazione.

Risultati

Le solubilità di J1 in mg/mL con livelli alti/bassi degli eccipienti Polisorbato 80, PEG 400 e β-ciclodestrina sono riassunte in Tabella 12.

Tabella 12. Solubilità di J1 in mg/mL.

Esperimento	Polisorbato 80 [%]	PEG 400 [%]	β-ciclodestrina [%]	Solubilità di J1 [mg/ml]
1	8	400	10	1,9

2	8	80	10	0,9
3	8	400	50	2
4	8	80	50	1,4
5	80	400	10	2
6	80	80	10	1,5
7	80	400	50	2
8	80	80	50	1,9
9	44	240	30	1,9
10	44	240	30	1,8
11	44	240	30	1,7
12**	10	x	x	1
13**	50	x	x	1,2
14**	100	x	x	1,4
15*	x	x	x	0,67
16*	x	x	x	0,25
17	50	80	100	1,2

**Esperimenti 15-16 non hanno usato J1 essiccato a freddo, in Esperimento 15 è stata usata polvere fine e in Esperimento 16 sono stati usati granuli più grandi; esempio al di fuori delle rivendicazioni.*

***Esempio al di fuori delle rivendicazioni.*

I risultati forniti in Tabella 12 dimostrano che la solubilità di J1 è aumentata in tutti gli esperimenti contenenti

eccipienti rispetto a J1 non essiccato a freddo (15 e 16). La grande discrepanza nella solubilità di J1 non essiccato a freddo è probabilmente dovuta a diverse grandezze di particelle nel lotto, poiché la voce 15 era una sospensione di polvere bianca fine, mentre la voce 16 era a granuli più grandi che forniscono un basso tasso di dissoluzione e pertanto minore solubilità di J1 in 5 minuti. La precisione dell'analisi è mostrata negli esperimenti centrali 9-11 (1,9, 1,8 e 1,7) con concentrazioni di eccipienti identiche. I 3 campioni con Polisorbato 80 come eccipiente (10, 50 e 100%) hanno mostrato una solubilità di 1,0, 1,2 e 1,4 mg/mL, rispettivamente.

Le voci con una miscela degli eccipienti Polisorbato 80, Peg 400 e β -ciclodestrina hanno mostrato diverse combinazioni con solubilità di o vicine a 2,0 mg/mL. Le solubilità più alte determinate di 2,0 (voci 3, 5 e 7) erano raggiungibili solo con alti livelli di PEG 400, che producevano liquidi o semisolidi dopo l'essiccazione a freddo.

I campioni con minore quantità di PEG 400 (voci 2, 4, 6 e 8) hanno formato una polvere bianca soffice dopo l'essiccazione a freddo, con la solubilità più alta determinata di 1,9 mg/mL nella voce 8. Questo ha indotto a provare se fosse possibile ottenere una solubilità maggiore abbassando la quantità di PEG 400 e aumentando la quantità di β -ciclodestrina. È stato essiccato a freddo un campione aggiuntivo (riga 17 in Tabella 12) contenente 50% di Polisorbato 80, 80% di PEG 400 e 100% di β -ciclodestrina. La solubilità di J1 con questa miscela di eccipienti è stata di 1,2 mg/mL.

I risultati dimostrano che la solubilità massima di J1 con combinazioni di eccipienti è vicina a 2 mg/mL.

Con esperimento 13 (esempio al di fuori delle rivendicazioni) è stato mostrato che una soluzione di J1 con il 50% di Polisorbato ha dato una solubilità di circa 1,2 mg/mL da sola, sufficiente per una formulazione da 1,0 mg/mL e che permette l'esclusione di PEG 400 e β -ciclodestrina.

Esperimenti di conferma visiva

Per confermare la dissoluzione in un contesto più rilevante a livello clinico, è stato eseguito un esperimento su più larga scala in fiale di vetro trasparente anziché fiale di plastica. Fiala 1 conteneva una soluzione di 4,8 mg di melfalan flufenamide cloridrato (J1) e 2,4 mg di Polisorbato 80. Come controllo fiala 2 conteneva 4,8 mg di melfalan flufenamide cloridrato (J1) e non Polisorbato 80. Le fiale sono state essiccate a freddo durante la notte.

A ciascuna fiala contenente melfalan essiccato a freddo J1 come materiale bianco soffice, sono stati aggiunti 4,70 mL di una soluzione al 5% di glucosio per dare una concentrazione di J1 di 1,02 mg/mL. Le miscele sono state agitate per 10-15 secondi e la provetta di prova contenente J1 e 50% di Polisorbato 80 ha mostrato una soluzione chiara dopo 15 secondi, si veda Fig. 6, fiala a sinistra. La provetta di riferimento con J1 essiccato a freddo senza il Polisorbato ha mostrato piccole particelle e non si è completamente disciolta dopo 30 minuti, si veda Fig. 6, fiala a destra. L'analisi LC-MS ha rivelato che la purezza di melfalan flufenamide dopo 30 minuti era >95%, in entrambe le fiale.

I risultati forniti nella presente dimostrano che la solubilità di J1 nella soluzione al 5% di glucosio potrebbe essere migliorata usando una miscela degli eccipienti Polisorbato 80, Peg 400 e β -ciclodestrina a 1,9 mg/mL. Tale miscela di eccipienti con J1 ha prodotto un solido bianco soffice in seguito alla liofilizzazione.

La liofilizzazione di J1 con 50% in peso di Polisorbato 80, ha prodotto un solido bianco soffice che si è disciolto rapidamente nella soluzione al 5% di glucosio. La concentrazione di saturazione di 1,2 mg/mL è sufficiente per uso in un contesto clinico per la preparazione del dosaggio a 1,0 mg/mL.

Esempio 5: Prova di stabilità [Esempio al di fuori delle rivendicazioni]

Lo scopo della prima parte di questo studio era di indagare il tasso di dissoluzione di melfalan flufenamide cloridrato (J1) (essiccato a freddo insieme a Polisorbato 80) in soluzione al 5% di glucosio.

La velocità di dissoluzione di J1 (essiccato a freddo) nella soluzione al 5% di glucosio contenente Polisorbato 80 sarà misurata in un altro esperimento.

Verrà infine misurata la velocità di dissoluzione di J1 non essiccato a freddo in soluzione al 5% di glucosio contenente Polisorbato 80.

La seconda parte è uno studio della degradazione di J1 in due differenti preparati a temperatura elevata. Il primo preparato era un solido essiccato a freddo contenente polisorbato 80 e il secondo era una soluzione da 25 mg/ml di J1 in N,N-dimetilacetammide (DMA). La degradazione è stata seguita per 1 mese a +40°C, usando due preparati.

(i) Determinazione del tasso di dissoluzione.

Una soluzione al 5% di glucosio è stata aggiunta a ciascuna fiala di plastica contenente J1. Le fiale sono state agitate e filtrate in diversi punti di tempo. Il filtrato è stato trasferito in fiale di vetro e la quantità di J1 disciolto è stata determinata mediante HPLC.

(ii) Progettazione dello studio di stabilità accelerata.

10 fiale con J1 essiccato a freddo e Polisorbato 80, e 10 fiale di soluzione di J1 in DMA, sono state conservate a 40°C per 1 mese. Due fiale del materiale essiccato a freddo (denominate essiccato a freddo 1 e 2 in tabella di seguito) e una fiala della soluzione di DMA (denominata DMA in tabella 1 di seguito) sono state prelevate dalla camera a 40°C e conservate a -20°C e analizzate contemporaneamente per il saggio e purezza di J1. I tempi di campionamento erano 0, 1, 3, 10 e 30 giorni. Ciascuna fiala essiccata a freddo conteneva 0,25 mg di J1. La soluzione da 25 mg/ml in DMA proveniva da Oncopeptides.

(iii) Analisi e risultati

I campioni essiccati a freddo sono stati disciolti in 500 µl di DMA in fiale con filtro Whatman da 0,45 µm. I campioni sono stati vorticati brevemente prima di premere insieme le due parti della fiala e quindi filtrare il campione. I campioni di soluzione da 25 mg/ml sono stati diluiti con DMA dividendo in aliquote da 20 µl di soluzione in fiale per HPLC e diluendo con 980 µl di DMA. 4 µl sono stati iniettati nel sistema cromatografico.

La stabilità è stata valutata come purezza relativa, in quanto vi era una leggera variazione nella quantità di J1 nelle fiale essiccate a freddo. Mediante l'uso della purezza relativa, ciascun campione viene standardizzato contro se stesso e l'effetto della quantità variabile di J1 viene minimizzato in seguito al risultato di stabilità.

La velocità di dissoluzione di J1 nel 5% di glucosio in presenza di PS è riassunta in tabella 13:

Tabella 13: Sommario degli esperimenti di dissoluzione.

	Tempo (min.) per raggiungere la dissoluzione allo stato stazionario	Contenuto nella fiala di plastica	Soluzione
--	--	--	------------------

Esp. di dissoluzione 1	1	J1 + Polisorbato 80 essiccato a freddo	5% di glucosio
Esp. di dissoluzione 2	1	J1 essiccato a freddo	5% di glucosio + Polisorbato 80
Esp. di dissoluzione 3	1 - 2	J1 non essiccato a freddo	5% glucosio + Polisorbato 80

Risultati della prova di stabilità

Tabella 14. Risultati della prova di stabilità a 40°C, confronto tra soluzione di DMA e J1 essiccato a freddo a +40°C/Umidità Relativa dell'Ambiente

Giorno	Essiccato a freddo 2 relativo [%]	Essiccato a freddo 2 relativo [%]	Media di essiccato a freddo relativa [%]	DMA Relativa [%]
0	98,80	98,74	98,77	96,81
1	98,77	98,69	98,73	95,76
3	98,71	98,77	98,74	95,43
10	98,55	98,66	98,61	92,22
30	98,32	98,42	98,37	86,90

I risultati in tabella 14 mostrano che il materiale essiccato a freddo è sostanzialmente invariato durante il periodo di prova. Può essere osservata solo una piccola variazione nella purezza. Anche il tasso di dissoluzione di J1 essiccato a freddo a 1 mg/mL in una soluzione al 5% di glucosio era inferiore a 1 min. in presenza di Polisorbato 80. Il tasso di dissoluzione di J1 non essiccato a freddo a 1 mg/ml in una soluzione al 5% di glucosio contenente Polisorbato 80 è stato stimato a 1-2 min.

J1 nella soluzione di DMA si è degradato in maniera significativa durante la conservazione a +40°C per un

mese. La quantità relativa è diminuita da circa 96,8% a 86,9%. J1 conservato come solido essiccato a freddo ha mostrato solo una piccola degradazione dal 98,7% al 98,3% durante lo stesso periodo di tempo.

RIVENDICAZIONI

1. Preparazione farmaceutica liofilizzata comprendente
 - (i) melfalan flufenamide, o un suo sale accettabile farmaceuticamente; e
 - (ii) almeno un eccipiente scelto dal gruppo comprendente β -ciclodestrina; α -ciclodestrina; idrossipropil- β -ciclodestrina; e solfobutilettere- β -ciclodestrina.
2. Preparazione farmaceutica liofilizzata secondo la rivendicazione 1, in cui la quantità di eccipiente è di circa 10-100% in peso di detto melfalan flufenamide.
3. Preparazione farmaceutica liofilizzata secondo la rivendicazione 2, in cui la quantità dell'eccipiente è di 10-50% in peso di detto melfalan flufenamide.
4. Preparazione farmaceutica liofilizzata secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3, in cui detto melfalan flufenamide è melfalan flufenamide cloridrato (J1).
5. Preparazione farmaceutica liofilizzata secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4, comprendente inoltre una soluzione fisiologicamente accettabile.
6. Preparazione farmaceutica liofilizzata secondo la rivendicazione 5, in cui detta soluzione fisiologicamente accettabile è una soluzione di glucosio.
7. Preparazione farmaceutica liofilizzata secondo la rivendicazione 6, in cui la quantità di glucosio è di 4,5-5,5% in peso della preparazione liofilizzata.
8. Preparazione farmaceutica liofilizzata secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7, che è priva, o sostanzialmente priva di solventi organici.
9. Kit di combinazione di parti comprendente
 - (i) una preparazione farmaceutica liofilizzata secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4; e
 - (ii) una soluzione fisiologicamente accettabile.
10. Preparazione farmaceutica liofilizzata secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4, per uso come medicamento.
11. Preparazione farmaceutica liofilizzata secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4, per uso nel

trattamento e/o prevenzione del cancro.

12. Preparazione farmaceutica liofilizzata per l'uso, secondo la rivendicazione 11, in cui detto cancro è uno qualsiasi di cancro ovarico, cancro polmonare, cancro della vescica, mesotelioma, mieloma multiplo, cancro mammario o cancro ematologico.

13. Kit di combinazione di parti secondo la rivendicazione 9, per uso nel trattamento del cancro.

14. Metodo per preparare una preparazione farmaceutica liofilizzata secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3, per cui:

a. melfalan flufenamide, o un suo sale accettabile farmaceuticamente, viene sciolto in un solvente organico per ottenere una soluzione di melfalan flufenamide;

b. acqua viene aggiunta alla soluzione di melfalan flufenamide al fine di ottenere una soluzione acquosa di melfalan flufenamide, in una concentrazione di circa 0,2-3,0 mg/ml;

c. almeno un eccipiente scelto dal gruppo comprendente β -ciclodestrina; α -ciclodestrina; idrossipropil- β -ciclodestrina; e solfobutiletere- β -ciclodestrina viene aggiunto alla soluzione di melfalan flufenamide; e

d. la soluzione acquosa di melfalan flufenamide contenente eccipiente(i) viene sottoposta a liofilizzazione.

15. Metodo secondo la rivendicazione 14, per cui:

a. melfalan flufenamide, o un suo sale accettabile farmaceuticamente, viene sciolto in un solvente organico;

b. acqua viene aggiunta alla soluzione ottenuta nel passaggio a) per ottenere una soluzione di detto melfalan flufenamide o un suo sale accettabile farmaceuticamente, in una concentrazione di circa 0,2-3,0 mg/ml;

c. almeno un eccipiente scelto dal gruppo comprendente β -ciclodestrina; α -ciclodestrina; idrossipropil- β -ciclodestrina; e solfobutiletere- β -ciclodestrina viene aggiunto alla soluzione ottenuta nel passaggio b); e

d. la soluzione ottenuta nel passaggio c) viene sottoposta a liofilizzazione.

16. Metodo secondo la rivendicazione 14 o 15, in cui il solvente organico è scelto tra uno qualsiasi di etanolo, etanolo contenente acido, glicerina, propilenglicole, alcol benzilico, dimetilacetammide (DMA), N-metil-2-pirrolidone, isopropanolo, n-butanolo, terz-butanolo, metil terz-butil etere, propilenglicole, dimetilsolfossido, tetraidrofurano, 2-metil tetraidrofurano, acetone, dimetilformammide, acetonitrile, diossano, acido acetico, acido

lattico, acido propionico, n-butanolo, isopropanolo, terz-butanolo, sec-butanolo, metanolo, e una miscela di etanolo e acqua.

17. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 14 a 16, in cui detto melfalan flufenamide è melfalan flufenamide cloridrato (J1).

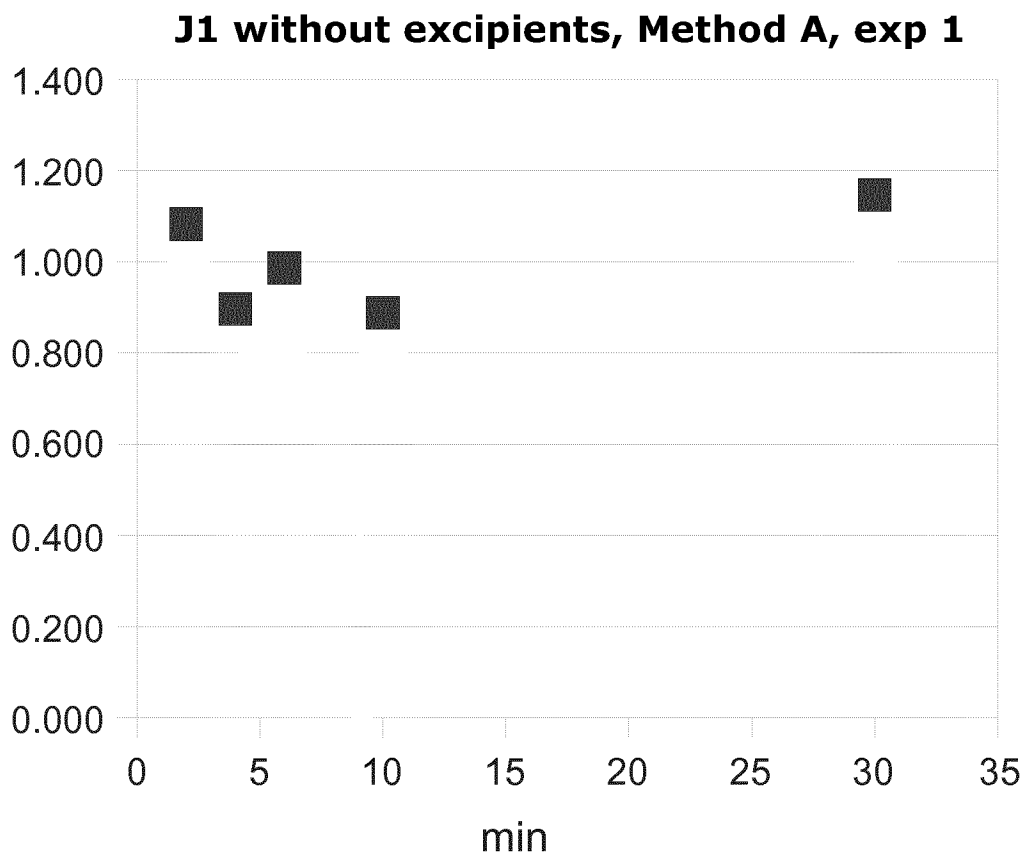


Fig. 1A

2/21

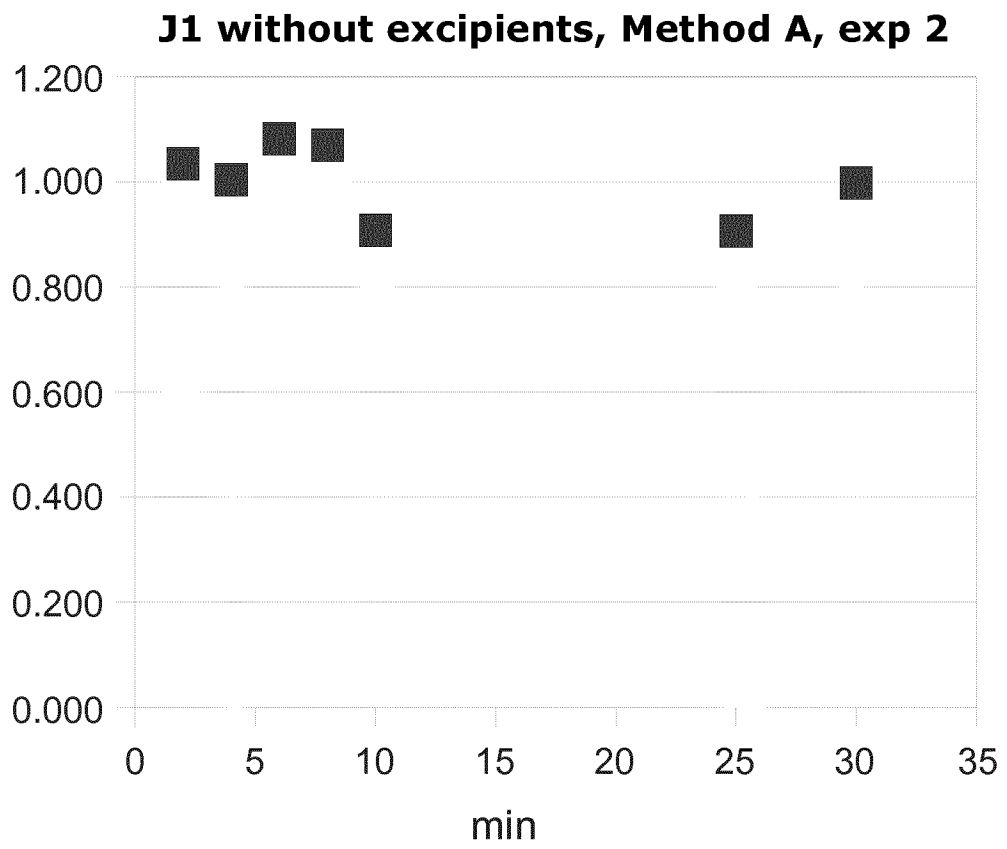


Fig. 1B

3/21

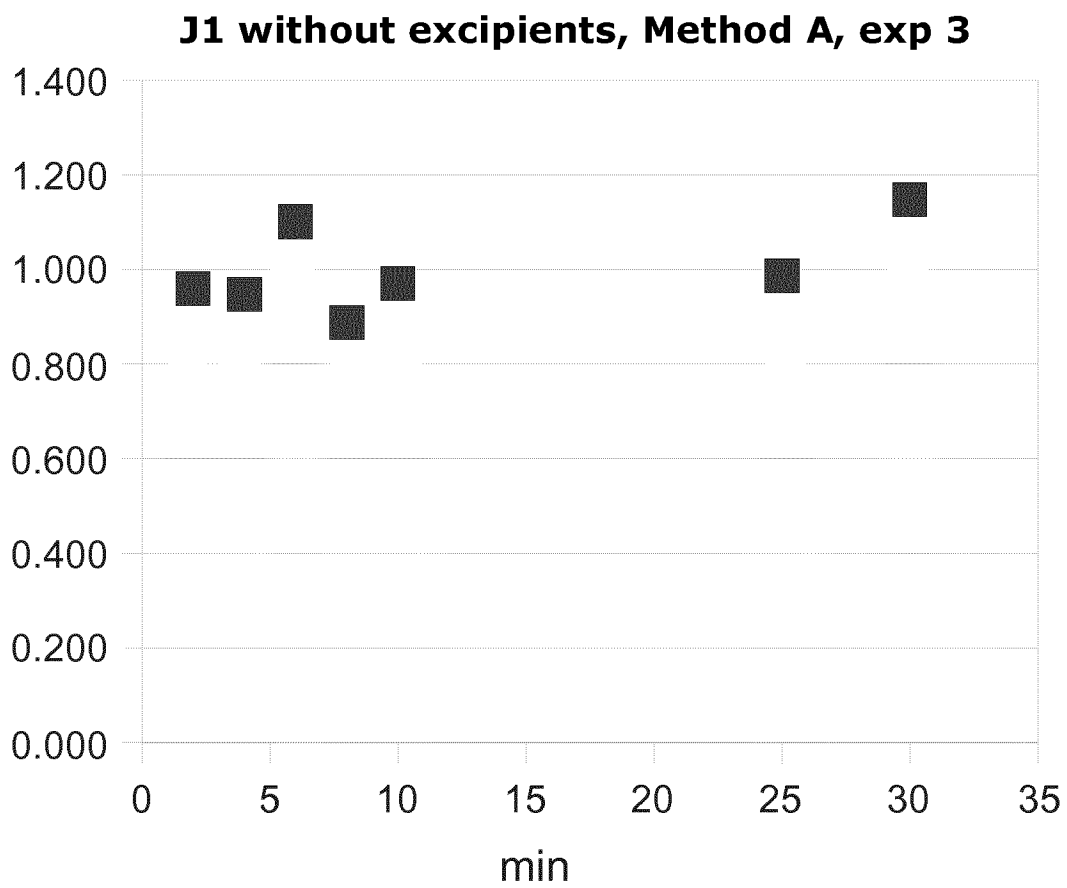


Fig. 1C

4/21

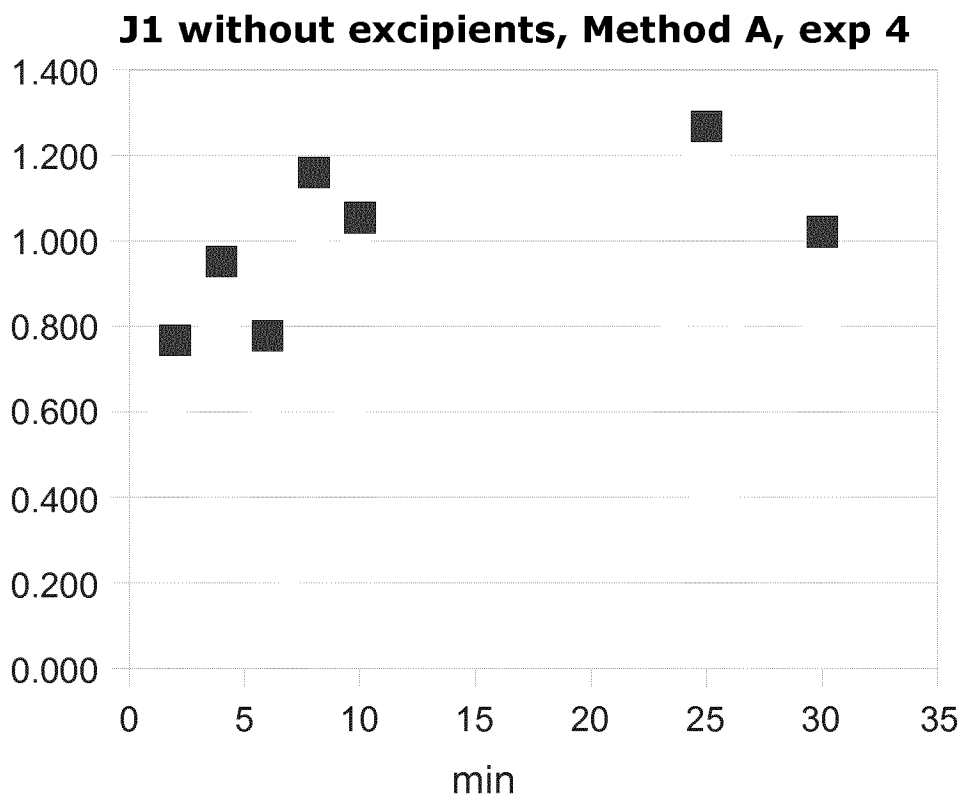


Fig. 1D

5/21

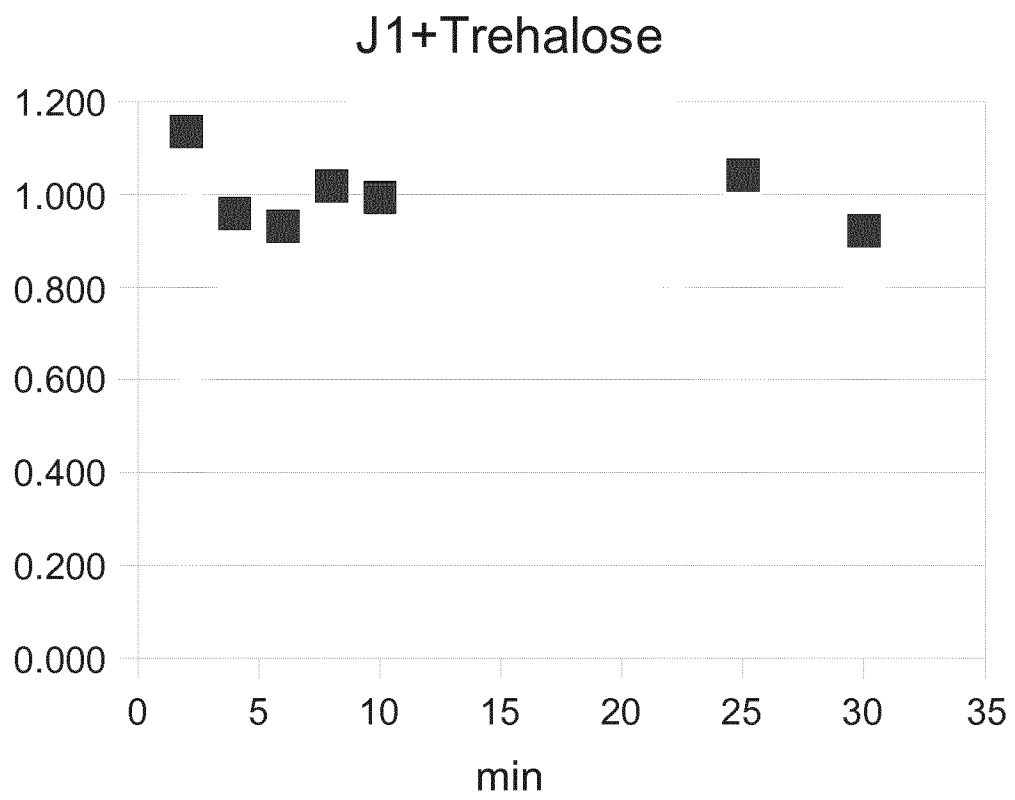


Fig. 2A

6/21

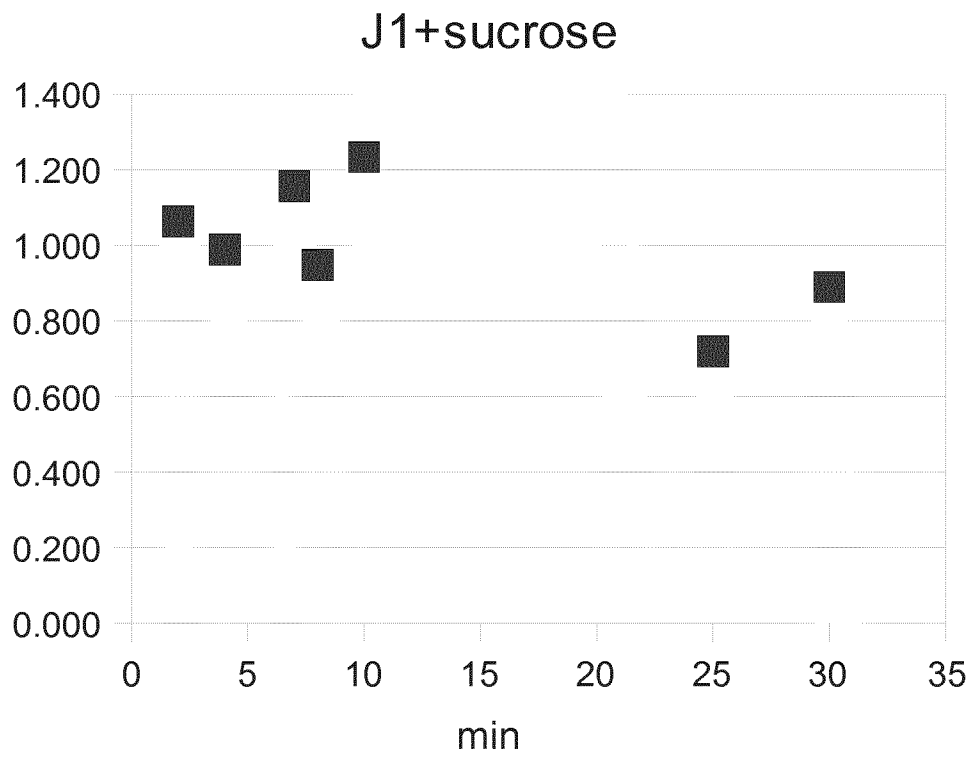


Fig. 2B

7/21

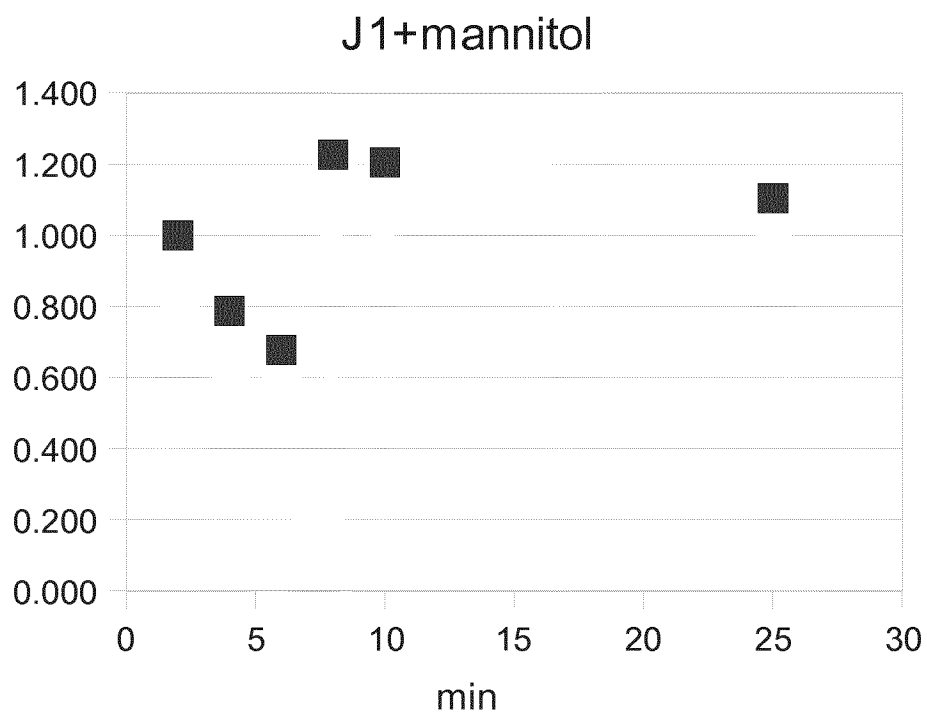


Fig. 2C

8/21

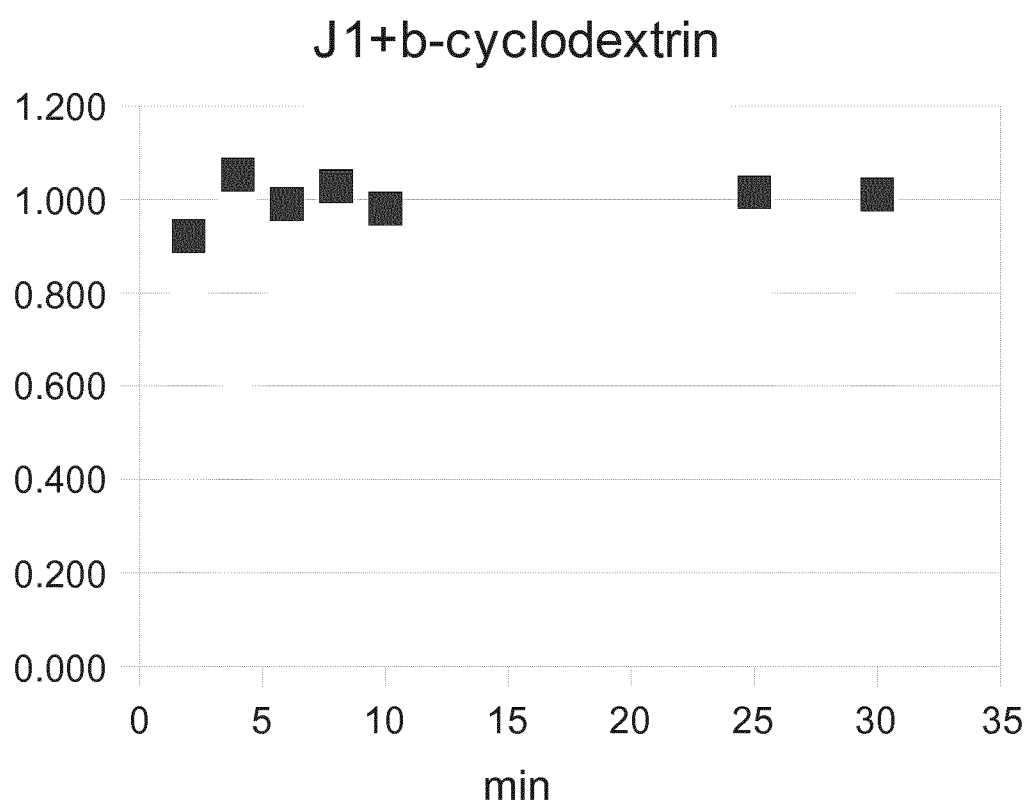


Fig. 2D

9/21

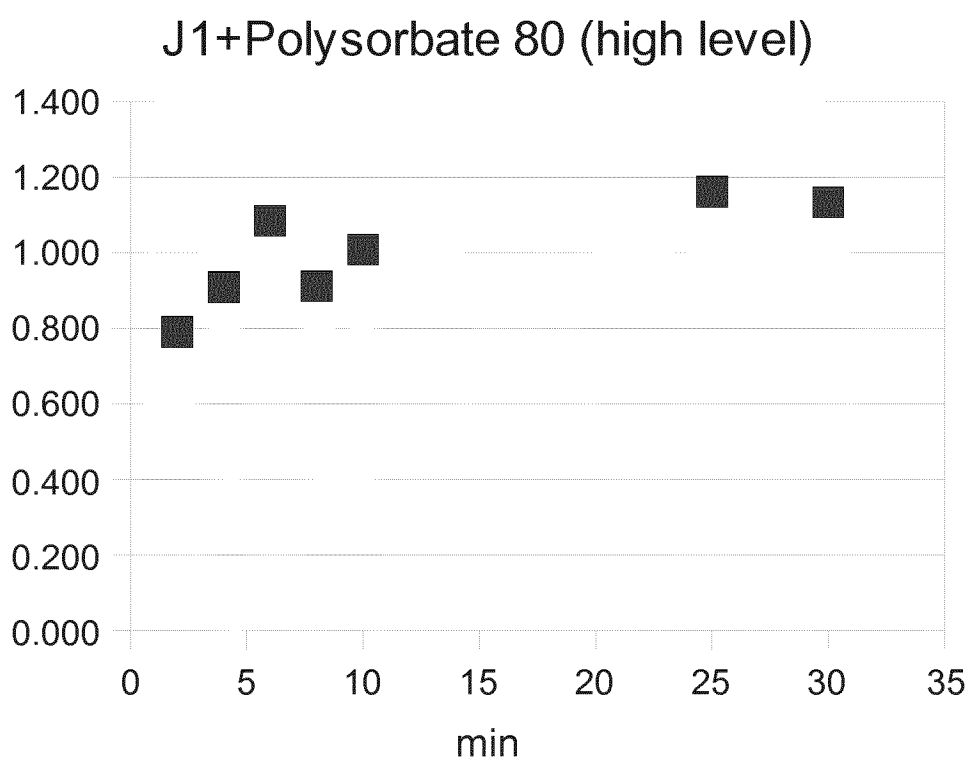


Fig. 2E

10/21

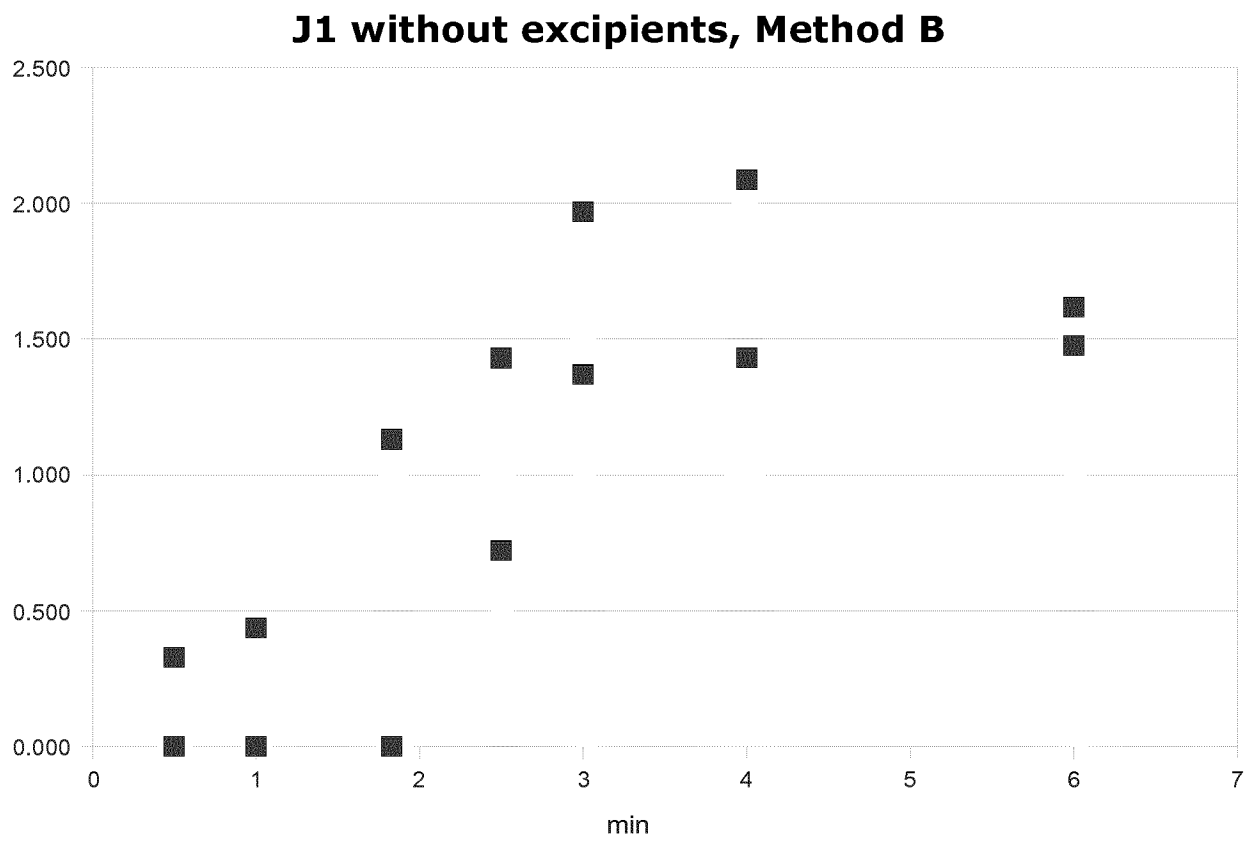


Fig. 3

11/21

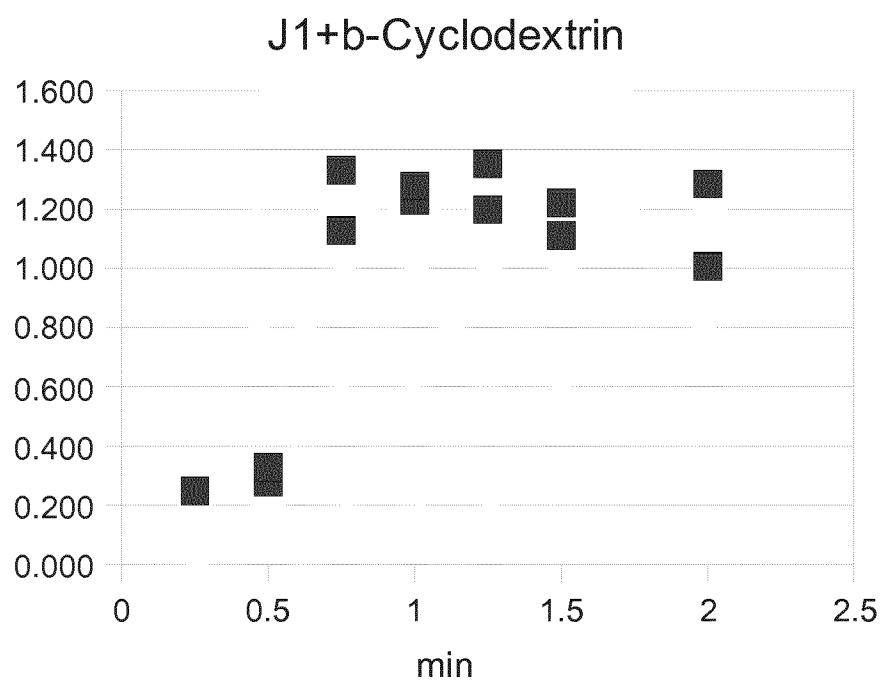


Fig. 4A

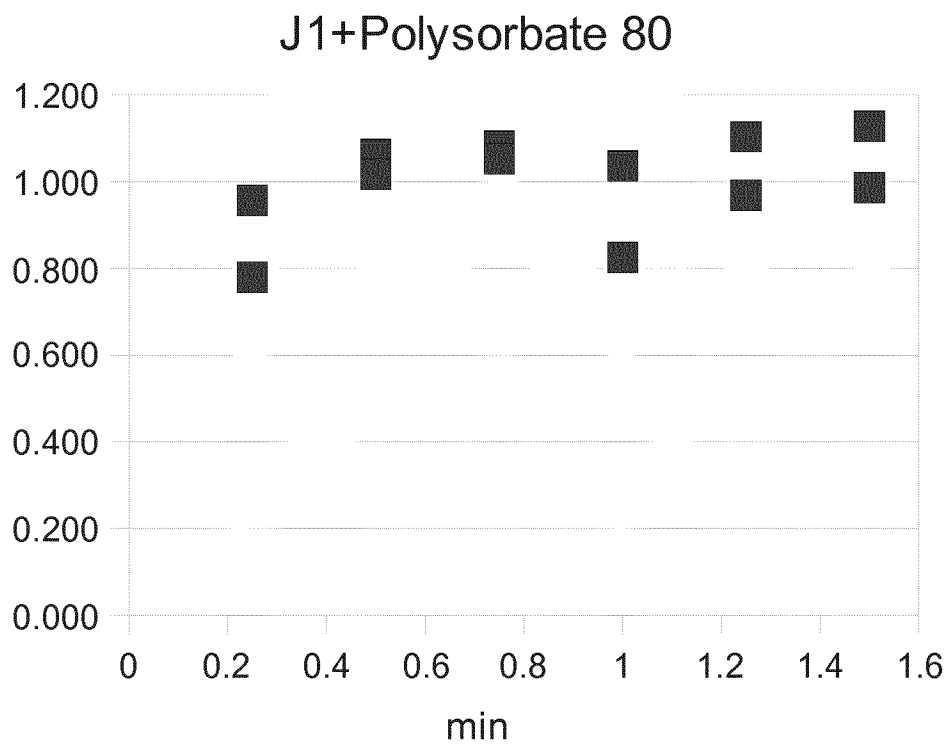


Fig. 4B

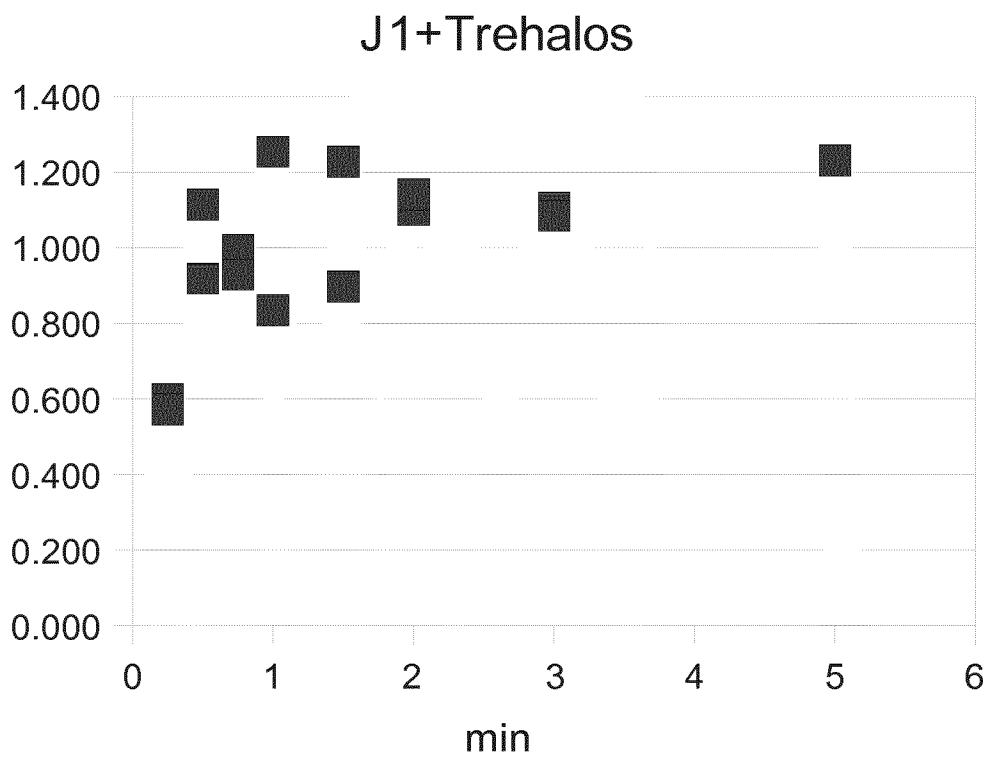


Fig. 4C

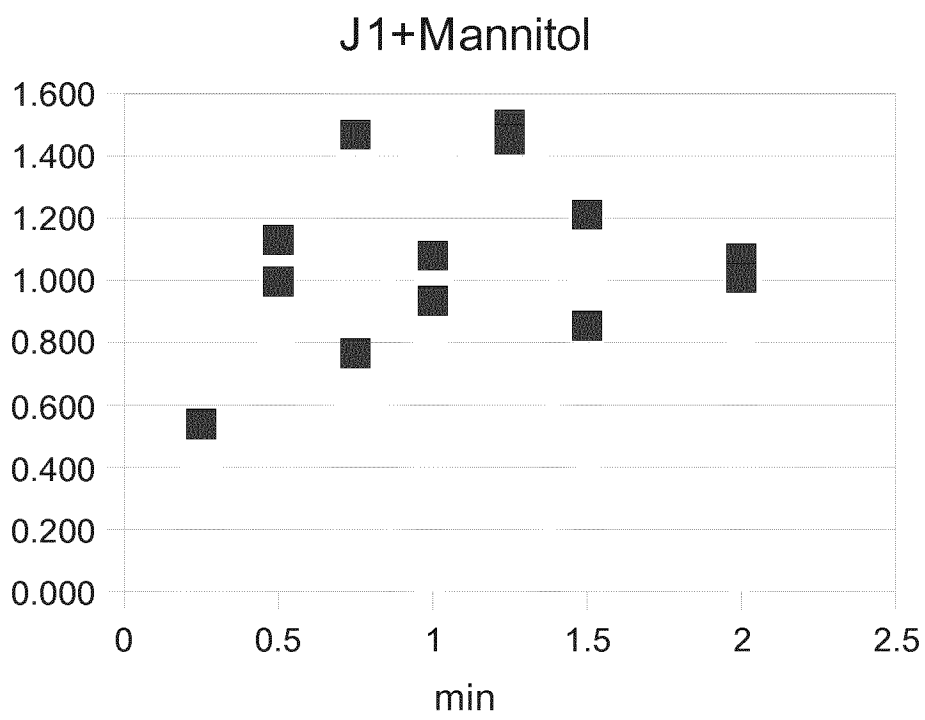


Fig. 4D

15/21

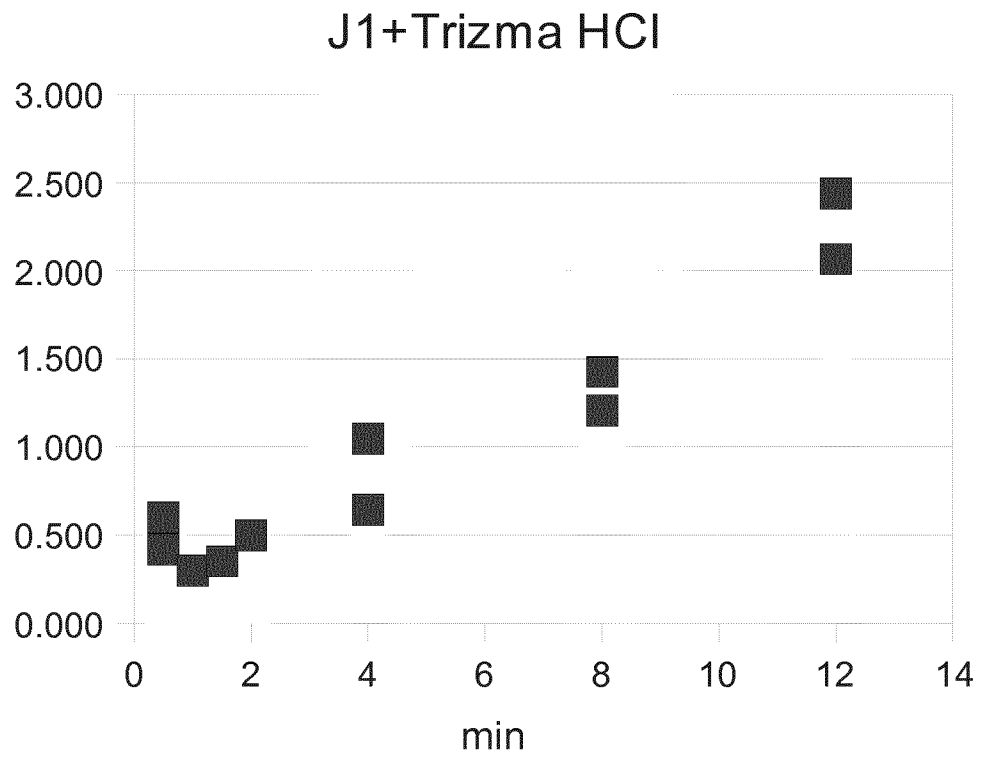


Fig. 4E

16/21

J1 without polysorbate 80

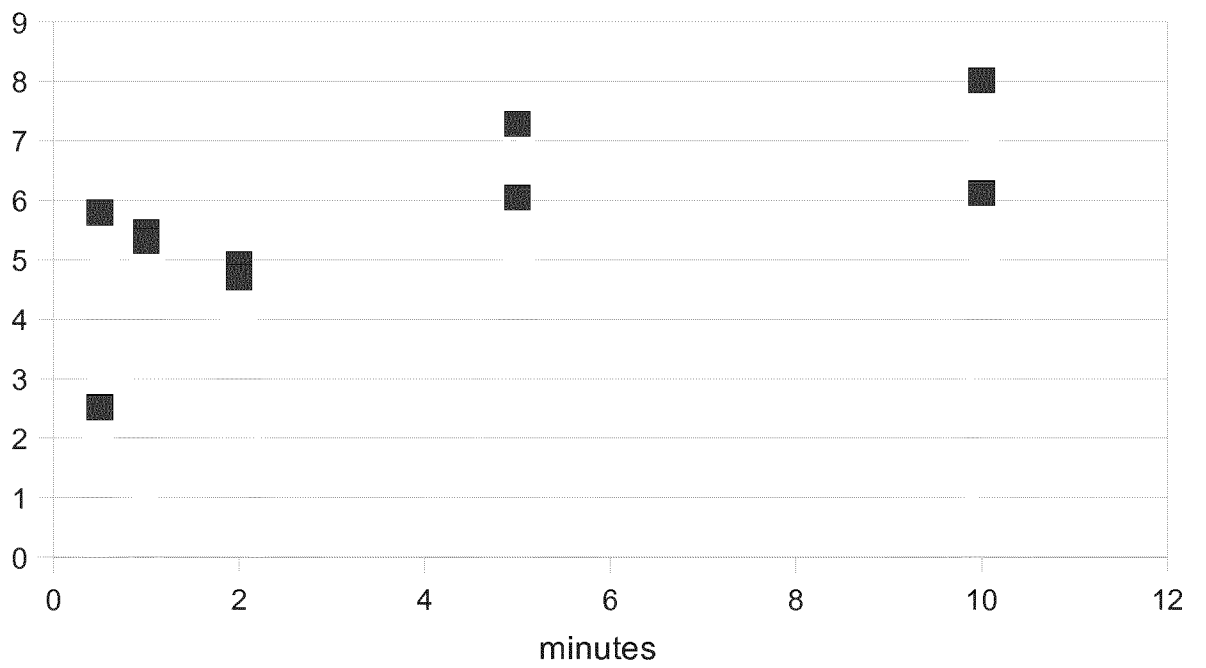


Fig. 5A

17/21

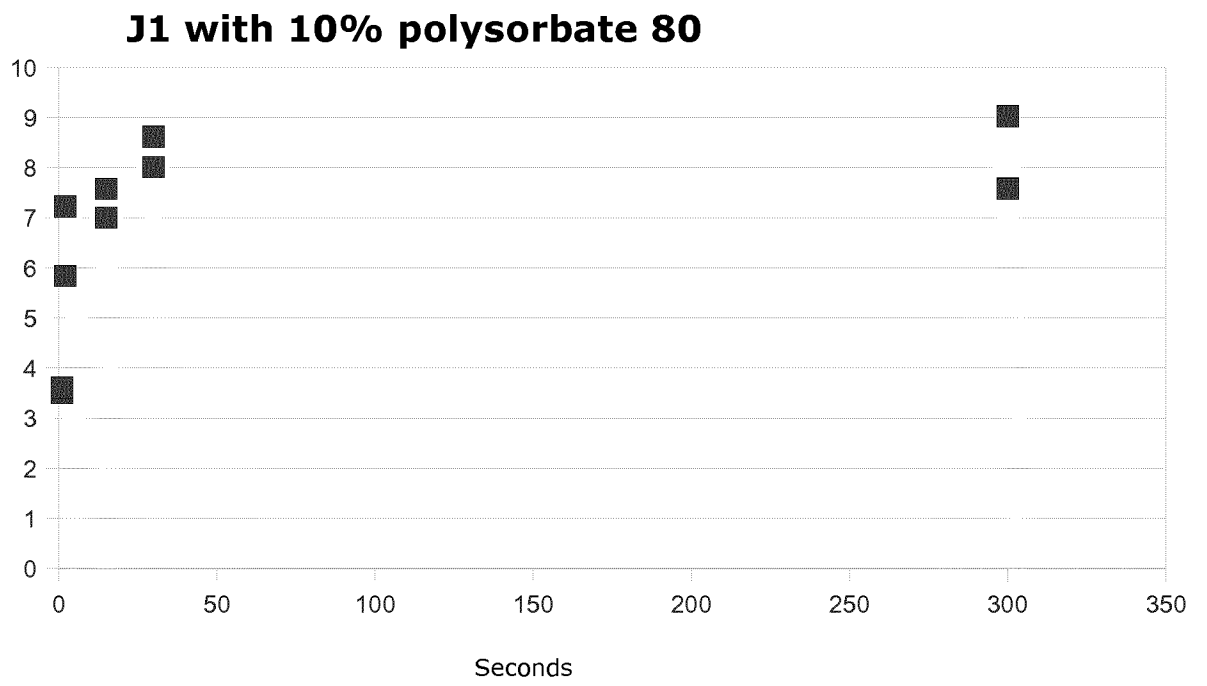


Fig. 5B

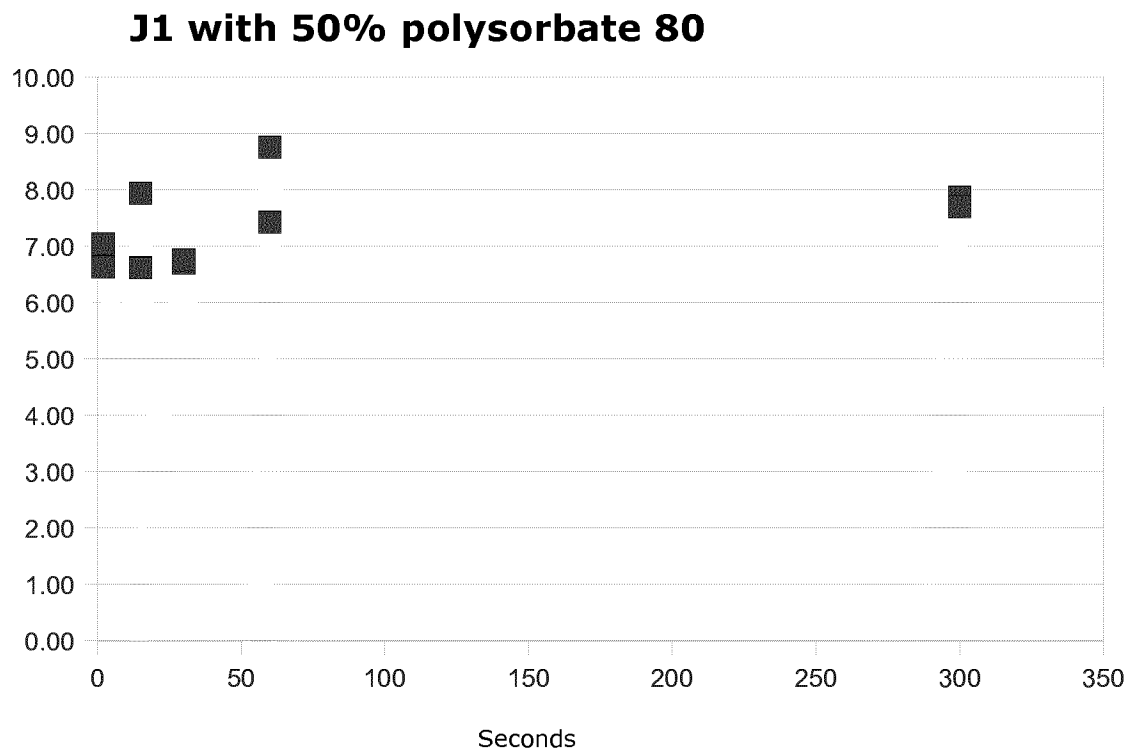


Fig. 5C

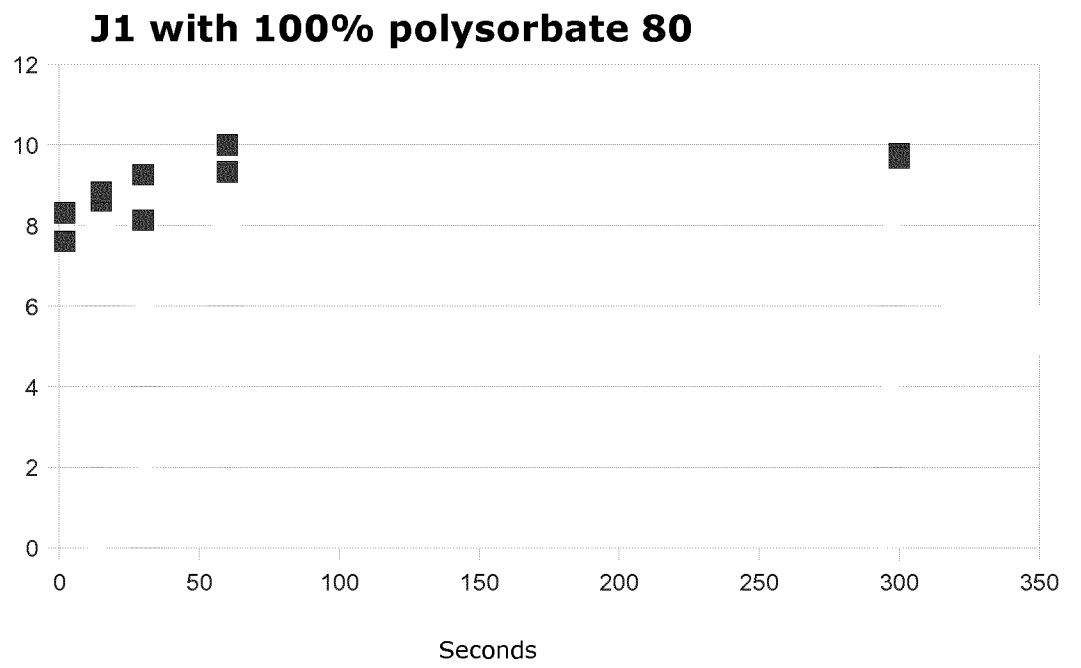


Fig. 5D

20/21

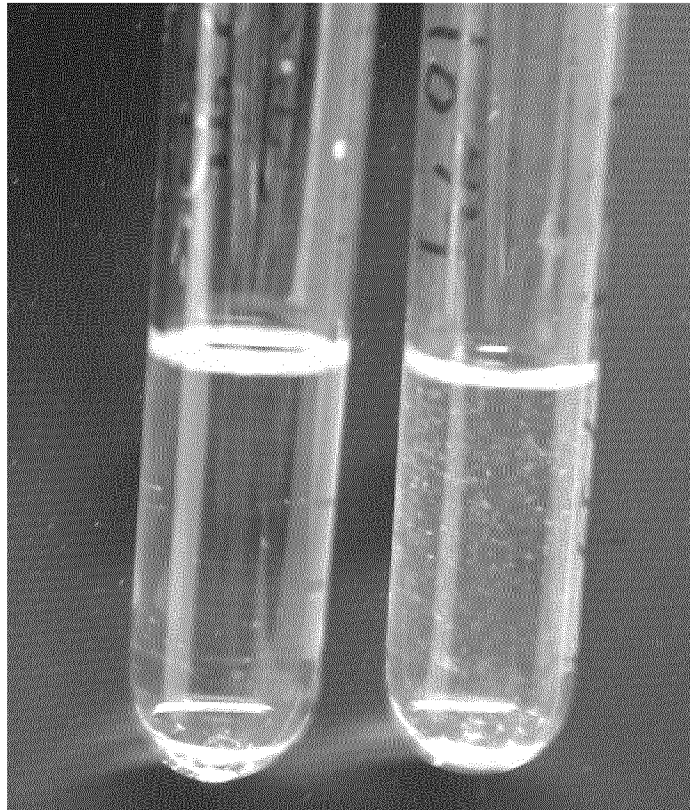
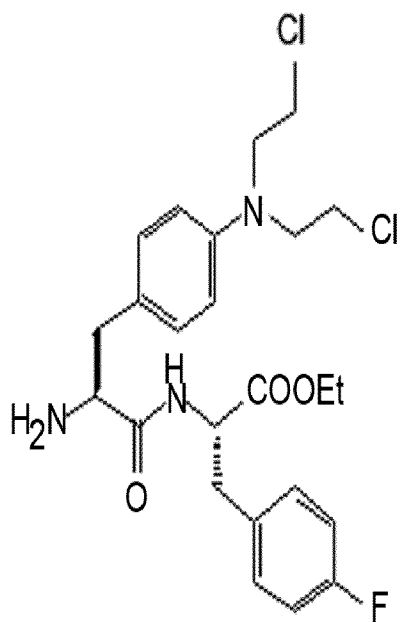
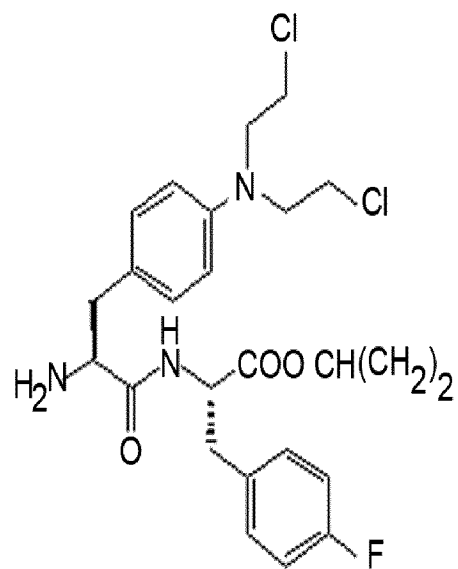


Fig. 6

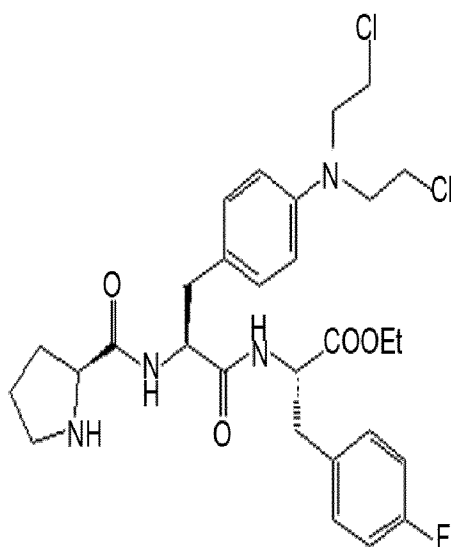
21/21



J1



JV28



J3

Fig. 7

EX5813R – TRADUZIONE LEGENDE

FIG. 1A

J1 without excipients, Method A, exp 1	J1 senza eccipienti, Metodo A, esp. 1
--	---------------------------------------

FIG. 1B

J1 without excipients, Method A, exp 2	J1 senza eccipienti, Metodo A, esp. 2
--	---------------------------------------

FIG. 1C

J1 without excipients, Method A, exp 3	J1 senza eccipienti, Metodo A, esp. 3
--	---------------------------------------

FIG. 1D

J1 without excipients, Method A, exp 4	J1 senza eccipienti, Metodo A, esp. 4
--	---------------------------------------

FIG. 2A

J1+Trehalose	J1+Trealosio
--------------	--------------

FIG. 2B

J1+sucrose	J1+saccarosio
------------	---------------

FIG. 2C

J1+mannitol	J1+mannitolo
-------------	--------------

FIG. 2D

J1+b-cyclodextrin	J1+b-ciclodestrina
-------------------	--------------------

FIG. 2E

J1+Polysorbate 80 (high level)	J1+Polisorbato 80 (livello alto)
--------------------------------	----------------------------------

FIG. 3

J1 without excipients, Method B	J1 senza eccipienti, Metodo B
---------------------------------	-------------------------------

FIG. 4A

J1+b-Cyclodextrin	J1+b-Ciclodestrina
-------------------	--------------------

FIG. 4B

J1+Polysorbate 80	J1+Polisorbato 80
-------------------	-------------------

FIG. 4C

J1+Trehalose	J1+Trealosio
--------------	--------------

FIG. 4D

J1+Mannitol	J1+Mannitolo
-------------	--------------

FIG. 4E

J1+Trizma HCl	J1+Trizma HCl
---------------	---------------

FIG. 5A

J1 without Polysorbate 80	J1 senza Polisorbato 80
minutes	minuti

FIG. 5B

J1 with 10% Polysorbate 80	J1 con 10% di Polisorbato 80
Seconds	Secondi

FIG. 5C

J1 with 50% Polysorbate 80	J1 con 50% di Polisorbato 80
Seconds	Secondi

FIG. 5D

J1 with 100% Polysorbate 80	J1 con 100% di Polisorbato 80
Seconds	Secondi