

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 3222272

DAL TITOLO:

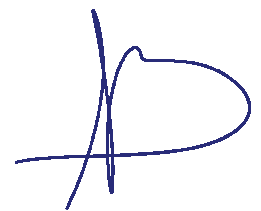
“COMPOSIZIONE FARMACEUTICA DI CARBETOCINA”

*** **

Descrizione

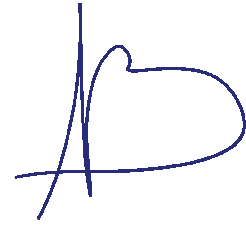
La presente invenzione si riferisce a composizioni farmaceutiche, per esempio composizioni farmaceutiche per il trattamento dell'emorragia post-partum (PPH) o altre applicazioni mediche. In particolare, si riferisce a composizioni farmaceutiche aventi stabilità migliorata, per esempio a temperatura ambiente.

L'emorragia post-partum (PPH) è una delle principali cause di mortalità correlata alla gravidanza e grave morbidità nei paesi in via di sviluppo e nel mondo industrializzato. Si tratta di una condizione potenzialmente pericolosa per la vita che è dimostrata da circa 140.000 decessi all'anno, uno ogni quattro minuti, la stragrande maggioranza tra le donne che non hanno accesso a un'adeguata assistenza sanitaria ostetrica. Sebbene il problema sia numericamente importante, non tutte le regioni del mondo industrializzato sono colpite allo stesso modo e in Europa, i tassi di mortalità associati all'emorragia materna variano ampiamente da un paese all'altro. Un'indagine basata sulla popolazione in 11 regioni all'interno dei paesi europei ha mostrato che i tassi di emorragia grave variavano da 0,1% a 0,9% delle gravidanze (gruppo MOMS-B, 1999). Vi sono buone ragioni per credere che le differenze nella pratica clinica possano essere di grande importanza per le



differenze nella morbilità/mortalità. Nel Regno Unito, l'indagine confidenziale sulle morti materne, che copre gli anni 1994-1996, ha mostrato che dopo che erano state intraprese azioni in tutte le unità di maternità per stabilire linee guida per la gestione dell'emorragia di terza fase e post-partum, non vi erano morti per emorragia in nascite vaginali non complicate (Department of Health et al, 1998). Questo risultato supporta l'ipotesi che la gestione clinica abbia un ruolo chiave nella prevenzione dell'emorragia materna grave.

La PPH è difficile da gestire perché la valutazione della perdita di sangue nell'unità di parto è inaffidabile. L'azione è spesso intrapresa in risposta allo sviluppo di segni materni come ipotensione o malessere piuttosto che sulla base della perdita di sangue stimata. L'azione ritardata è responsabile di molti casi di emorragia grave, e può essere necessario un intervento chirurgico immediato poiché il tempo trascorso usando altri metodi di trattamento sarebbe pericoloso per il paziente. Queste considerazioni parlano a favore dell'applicazione di una politica di somministrazione profilattica di routine di un uterotonico a tutte le partorienti. Il caso di una tale politica è aggravato dal fatto che l'atonia uterina è il contributore più significativo alla PPH. L'atonia uterina è una perdita di tono nella muscolatura uterina. Normalmente, la contrazione del muscolo uterino comprime i vasi e riduce il flusso. Questo aumenta la probabilità di coagulazione e previene le emorragie. Pertanto, la mancanza di contrazione muscolare uterina può causare un'emorragia acuta. Clinicamente, il 75-80% delle emorragie post-partum è dovuto ad



atonia uterina.

Le revisioni hanno mostrato prove convincenti a sostegno della somministrazione profilattica di routine di un uterotonico, sia isolata che come parte dell'entità Active Management of the Third Stage of Labor (AMTSL); AMTSL è solitamente definito come un intervento con tre componenti: una somministrazione profilattica di un agente uterotonico, clampaggio precoce del cordone e trazione controllata del cordone. Inoltre, l'AMTSL ha dimostrato di essere ugualmente efficace nelle donne a "basso rischio" e "ad alto rischio". Oggi, l'uso di un farmaco uterotonico come profilassi in tutti i parti ospedalieri vaginali per prevenire emorragie gravi è una gestione clinica di routine nella maggior parte dell'Europa, e la pratica sta aumentando a livello globale.

I farmaci uterotonici attualmente disponibili sono ossitocina, ergometrina, Syntometrine[®] (una combinazione di ossitocina ed ergometrina) e misoprostolo. Tuttavia, questi non sono privi di svantaggi. Il misoprostolo è somministrato per via orale o vaginale ed è meno efficace rispetto agli uterotonici iniettabili; si raccomanda generalmente di non utilizzarlo quando sono disponibili uterotonici iniettabili. Syntometrine[®] è concesso in licenza solo in pochi paesi in Europa. È probabilmente più efficace dell'ossitocina da sola, ma è associato a più effetti collaterali, in particolare nausea e vomito. Inoltre, non è adatto per l'uso in donne con ipertensione, preeclampsia e malattia cardiaca, riducendo in tal modo la sua idoneità per l'uso profilattico di routine. L'ossitocina stessa ha lo svantaggio di una breve

emivita. Sebbene questo possa essere aggirato mediante somministrazione come infusione endovenosa continua per fornire attività uterotonica prolungata, questo è più scomodo di una singola iniezione. Se somministrata come una singola dose in bolo, sia che si tratti di iniezione endovenosa o intramuscolare, è necessario un attento monitoraggio del tono uterino e può essere necessario un medicinale uterotonico aggiuntivo a causa della breve emivita.

Carbetocina [(1-desammino-1-monocarpa-2(O-metil)-tirosina)ossitocina] è un analogo sintetico a lunga durata d'azione dell'ossitocina, con azione agonista. La carbetocina (PABAL[®], DURATOCIN[®]) è attualmente approvata per la prevenzione dell'atonia uterina dopo il parto del neonato mediante taglio cesareo in anestesia epidurale o spinale. Nel suo attuale uso commerciale, la somministrazione endovenosa di carbetocina fornisce un'emivita di circa 40 minuti, che è da 4 a 10 volte più lunga dell'emivita riportata dell'ossitocina (da 4 a 10 minuti). Tuttavia, usando iniezione intramuscolare, la carbetocina raggiunge concentrazioni plasmatiche di picco in meno di trenta minuti e ha una biodisponibilità dell'80% (W Rath, European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology 147 (2009) 15-20). Pertanto, la carbetocina ha il potenziale per essere un farmaco quasi ideale per la profilassi dell'emorragia post-partum di routine, offerta in tutti i parti vaginali ospedalieri, poiché è adatta sia per iniezione intramuscolare che per somministrazione endovenosa, offrendo comodità e semplice

implementazione; ha un rapido inizio di azione; è a lunga durata d'azione, in particolare rispetto all'ossitocina; è raramente associata a reazioni avverse al farmaco; e ha eccellente tollerabilità. In studi clinici pubblicati, la carbetocina ha mostrato efficacia simile a ossitocina e Syntometrine[®] o anche una tendenza verso una migliore efficacia, dimostrata su svariati esiti: perdita di sangue (misurata o stimata), incidenza di perdita di sangue >500 ml, uso aggiuntivo di medicinale uterotonico o interventi uterotonici totali. Pertanto, la carbetocina dovrebbe offrire un miglioramento rispetto alle opzioni attualmente disponibili per la prevenzione di atonia uterina e sanguinamento eccessivo dopo il parto vaginale. Rispetto all'ossitocina, il suo vantaggio è principalmente quello di sostituire la necessità di infusione continua o intervento uterotonico aggiuntivo. In pratica, la carbetocina ha il potenziale per sostituire 2-4 ore di terapia infusione di routine post-partum, e/o per migliorare l'esito rispetto all'iniezione in bolo di ossitocina. Inoltre, qualsiasi riduzione degli interventi aggiuntivi rappresenta un caso farmaco-economico favorevole per l'uso di carbetocina. Rispetto a Syntometrine[®], il suo vantaggio è principalmente migliore tollerabilità e sicurezza e mancanza di controindicazioni importanti. In entrambi i casi, la carbetocina è più adatta per, ed è probabile che faciliti, l'implementazione dell'uso profilattico di routine.

L'attuale formulazione di carbetocina (PABAL[®] 100 microgrammi/mL soluzione per iniezione, Ferring Pharmaceuticals

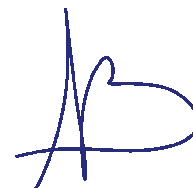


Limited) non è stabile a temperatura ambiente (RT) e richiede conservazione refrigerata a una temperatura di 2-8 °C. Vi è, pertanto, la necessità di una formulazione di carbetocina che sia stabile a temperatura ambiente (per esempio a 25 °C e 60% di umidità relativa) fino a due anni, consentendo, per esempio, l'uso nelle ambulanze. Ciò fornirebbe un vantaggio nella zona climatica I/II. Ancora più importante, vi è la necessità di una formulazione che possa essere conservata non refrigerata in regioni di zona climatica III/IV (alte temperature, ad esempio tropicali) - che soddisfi i requisiti di stabilità alla temperatura e all'umidità per queste zone, ad esempio, una stabilità alla temperatura a lungo termine documentata a 30 °C e umidità relativa fino al 75%. La terminologia della zona climatica è usata dalla FDA e dall'EMA ed è familiare ai tecnici del ramo. Pertanto, la zona climatica I è un clima temperato; la zona climatica II è un clima subtropicale e mediterraneo; la zona climatica III è calda e secca; e la zona climatica IV è calda e umida.

WO 2008/150303 descrive metodi e composizioni contenenti ossitocina o un analogo di ossitocina, come carbetocina.

Secondo la presente invenzione viene fornita una composizione liquida (ad esempio una composizione farmaceutica liquida) comprendente carbetocina o un suo sale farmaceuticamente attivo; in cui il pH della composizione è da 5,26 a 5,65, per esempio da 5,4 a 5,65.

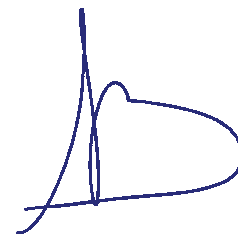
Preferibilmente la composizione è una composizione acquosa



(ad esempio una composizione farmaceutica acquosa) comprendente carbetocina o un suo sale farmaceuticamente attivo; in cui il pH della composizione è da 5,26 a 5,65, per esempio da 5,4 a 5,65. Si apprezzerà che la composizione dell'invenzione è preferibilmente una soluzione acquosa. Sebbene l'acqua (ad esempio acqua per iniezione o WFI) sia il solvente preferito, possono essere usati altri solventi (miscele di acqua con altri solventi farmaceuticamente accettabili, alcoli farmaceuticamente accettabili, ecc.).

I Richiedenti hanno trovato (Esempi da 1 a 3) che una composizione, ad esempio una composizione farmaceutica, comprendente carbetocina o suo sale farmaceuticamente attivo, e avente un pH entro un intervallo di pH specifico definito, può essere conservata a temperatura ambiente (ad esempio a 25 °C e 60% di umidità relativa) per un periodo prolungato (ad esempio fino a 2 anni). La composizione può anche avere una stabilità alla temperatura a lungo termine a 30 °C e 40 °C e umidità relativa fino al 75%, e pertanto essere adatta all'uso in regioni di zona III/IV senza necessità di refrigerazione.

La composizione può includere (comprendere) un agente tamponante, per esempio un agente tamponante farmaceuticamente accettabile. Nel presente documento, il termine agente tamponante è un agente che è in grado di portare una soluzione acida o basica a un certo stato di pH, e quindi prevenire un cambiamento da tale stato; in altre parole un agente tamponante è un agente che viene aggiunto a



una soluzione già acida o basica per modificare il pH e quindi mantenere il pH al livello modificato. Generalmente un agente tamponante è un acido debole o una base debole che sarebbe compresa in una soluzione tampone, e sarebbe responsabile dell'azione tamponante osservata in queste soluzioni. L'agente tamponante può essere, per esempio, acido acetico, acido adipico, acido citrico, acido maleico, acido succinico o fosfato (ad esempio fosfato di sodio, ad esempio sodio fosfato dibasico diidrato). Preferibilmente, l'agente tamponante è acido succinico. La composizione può includere un singolo agente tamponante (ossia non includere due o più agenti tamponanti). La composizione può includere due o più agenti tamponanti (ad esempio acido citrico e fosfato (ad esempio di sodio)).

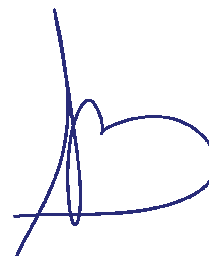
In un altro aspetto, la composizione può includere (comprendere) una soluzione tampone. Nel presente documento, il termine tampone o soluzione tampone indica una soluzione che include una miscela di un acido debole e la sua base coniugata o una base debole e il suo acido coniugato, che ha la proprietà che il pH della soluzione cambia molto poco quando viene aggiunta una piccola quantità di acido o base forte, in modo tale che il pH del tampone (soluzione) sia mantenuto. Il tampone (soluzione) può essere, per esempio, un tampone citrato (soluzione), comprendente acido citrico e un citrato (ad esempio citrato di sodio); un tampone succinato (soluzione) comprendente acido succinico e un succinato (ad esempio

succinato di sodio), un tampone acetato (soluzione) comprendente acido acetico e un acetato (ad esempio acetato di sodio); un tampone citrato/fosfato (soluzione) comprendente acido citrico e fosfato; o un tampone fosfato (soluzione) comprendente ad esempio fosfato (monosodico) e la sua base coniugata, (fosfato disodico). Un tampone preferito è un tampone succinato. La composizione può includere un singolo tampone (ossia non includere due o più tamponi). La composizione può includere due o più tamponi.

I Richiedenti hanno trovato che l'inclusione di agente tamponante acido succinico (o l'uso di un tampone succinato) può fornire stabilità efficace a temperatura ambiente (ad esempio a 25 °C e 60% di umidità relativa) conferendo eventualmente vantaggi aggiuntivi - per esempio, l'uso di un agente tamponante acido succinico o tampone succinato può contribuire a ridotte reazioni al sito di iniezione e dolore associato rispetto ad altre formulazioni tamponate.


La concentrazione di carbetocina nel liquido (composizione ad esempio composizione acquosa) può essere da 0,01 a 55 mg/mL, per esempio da 0,01 a 50 mg/mL, per esempio da 0,01 a 10 mg/mL, per esempio da 0,01 a 1,5 mg/mL, preferibilmente da 0,05 a 0,5 mg/mL, per esempio 0,1 mg/mL. La concentrazione di carbetocina nel liquido (composizione ad esempio composizione acquosa) può essere, per esempio, 1 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL ecc.

Le composizioni dell'invenzione possono inoltre comprendere un antiossidante. L'antiossidante può essere qualsiasi antiossidante



comunemente usato nell'arte, per esempio qualsiasi antiossidante approvato per l'uso come eccipiente farmaceutico. Per esempio, l'antiossidante può essere metionina, EDTA, idrossi toluene butilato, metabisolfito di sodio ecc. Preferibilmente l'antiossidante è presente in una quantità da 0,01% a 10% (p/v), per esempio da 0,05% a 5% (p/v), in modo massimamente preferito da 0,08% a 1% (p/v). Preferibilmente l'antiossidante è metionina, EDTA o una combinazione di metionina ed EDTA. Per esempio, l'antiossidante può essere metionina ed essere presente in una quantità di 0,1% p/v (o 1 mg/mL - si veda l'Esempio 2).

La composizione può inoltre comprendere un agente di isotonicità. Agenti di isotonicità, per esempio mannitolo o NaCl, sono ben noti nell'arte. Preferibilmente l'agente di isotonicità è presente in una quantità sufficiente a fornire una composizione isotonica (soluzione), per esempio in una quantità da 0,01% a 10% (p/v). Preferibilmente l'agente di isotonicità è mannitolo. Se l'agente di isotonicità è mannitolo può essere presente in una quantità da 0,5% a 7,5% (p/v), più preferibilmente da 4,0% a 5,5% (p/v), per esempio 5,0% (p/v). Se l'agente di isotonicità è mannitolo può essere presente in una quantità da 0,05% a 7,5% (p/v). Se l'agente di isotonicità è NaCl, può essere presente in una quantità da 0,05% a 1,2% (p/v), più preferibilmente da 0,08% a 1% (p/v), per esempio 0,9% (p/v). L'agente di isotonicità può essere presente in una quantità da 0,1 a 100 mg/mL, per esempio da 0,5 a 7 mg/mL, per esempio da 1 a 5 mg/mL. Per esempio, se l'agente di isotonicità è mannitolo può essere presente in



una quantità da 5 a 75 mg/mL, per esempio da 40 a 55 mg/mL (si veda ad esempio la Tabella 3a). Se l'agente di isotonicità è NaCl può essere presente in una quantità da 0,5 a 12 mg/mL, per esempio da 8 a 10 mg/mL (si veda ad esempio la Tabella 3b), per esempio 7,5 mg/mL (si veda l'Esempio 6).

La composizione può essere per qualsiasi via di somministrazione di farmaci, ad esempio orale, rettale, buccale, nasale, vaginale, transdermica (ad esempio tecnologia dei cerotti); iniezione parenterale, endovenosa, intramuscolare o sottocutanea; intracisternale, intravaginale, intraperitoneale, locale (polveri, unguenti o gocce) o come spray buccale o nasale. Preferibilmente la composizione è una composizione iniettabile o formulazione iniettabile. Formulazioni iniettabili possono essere fornite in qualsiasi contenitore adatto, ad esempio ampolla, fiala, siringa preriempita, dispositivo per iniezione (ad esempio dispositivo per iniezione monouso come quello venduto con il marchio Uniject da Becton Dickinson), cartuccia per iniezione, ampolla, penna (multi-) dose e simili. Preferibilmente la composizione è per somministrazione intramuscolare (ad esempio iniezione intramuscolare) o somministrazione endovenosa (ad esempio iniezione IV).

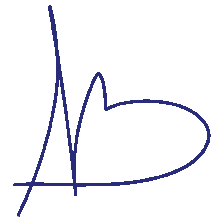
La composizione può includere un potenziatore, un eccipiente che potenzia la dose efficace (ad esempio potenzia la dose efficace dopo somministrazione nasale). Il potenziatore può essere qualsiasi potenziatore comunemente usato nell'arte, per esempio qualsiasi potenziatore approvato per l'uso come eccipiente farmaceutico. Il



potenziatore può essere, per esempio, metil- β -ciclodestrina, Polisorbato 80, carbossimetilcellulosa o idrossipropilmetilcellulosa.

Le composizioni dell'invenzione possono essere per l'uso in (o nella produzione di medicinali per) il trattamento o la prevenzione dell'atonia uterina. Le composizioni possono essere per l'uso nel trattamento o nella prevenzione dell'atonia uterina dopo il parto vaginale del neonato. Le composizioni possono essere per l'uso nel trattamento o nella prevenzione dell'atonia uterina dopo il parto del neonato mediante taglio cesareo, per esempio parto del neonato mediante taglio cesareo in anestesia epidurale o spinale. Le composizioni possono essere per l'uso nel trattamento o nella prevenzione dell'atonia uterina, per esempio in un paziente che è a rischio di sviluppare PPH. Le composizioni possono essere per l'uso in (o nella produzione di medicinali per) il trattamento o la prevenzione del sanguinamento (ad esempio sanguinamento eccessivo) dopo il parto vaginale (del neonato). Le composizioni dell'invenzione possono essere per l'uso come formulazione uterotonica. Le composizioni dell'invenzione possono essere per la somministrazione (ad esempio di routine) dopo il parto vaginale del neonato.

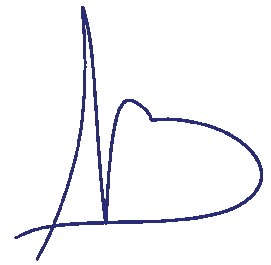
Secondo la presente invenzione in un ulteriore aspetto viene fornito un metodo di trattamento o prevenzione dell'atonia uterina (per esempio dopo il parto vaginale del neonato o il parto del neonato mediante taglio cesareo, o in un paziente che è a rischio di sviluppare PPH) o un metodo di trattamento o prevenzione del sanguinamento



eccessivo dopo il parto vaginale comprendente una fase di somministrazione a un paziente che ne necessita di una composizione come riportato sopra.

Si preferisce che le composizioni dell'invenzione non includano un composto di ammina quaternaria, come benzalconio cloruro. Si preferisce che le composizioni dell'invenzione non includano un conservante paraidrossibenzoato, o una combinazione di conservante paraidrossibenzoato con un cosolvente. Si preferisce che le composizioni dell'invenzione abbiano un contenuto di ioni di metalli bivalenti inferiore a 2 mM, per esempio 0,195 mM o inferiore, per esempio 0,1 nM o inferiore. Si preferisce che le composizioni dell'invenzione non includano un solubilizzante. Si preferisce che le composizioni dell'invenzione non includano metil- β -ciclodestrina.

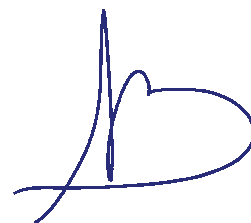
Secondo la presente invenzione in un ulteriore aspetto, viene fornito un metodo di trattamento o prevenzione dell'atonia uterina [per esempio, trattamento o prevenzione dell'atonia uterina dopo il parto vaginale del neonato, trattamento o prevenzione dell'atonia uterina dopo il parto del neonato mediante taglio cesareo, per esempio parto del neonato mediante taglio cesareo in anestesia epidurale o spinale, o trattamento o prevenzione dell'atonia uterina in un paziente che è a rischio di sviluppare PPH], o un metodo di trattamento o prevenzione del sanguinamento (per esempio sanguinamento eccessivo) dopo il parto vaginale (del neonato), comprendente: somministrazione a un paziente che ne necessita di una composizione farmaceutica liquida (ad



esempio acquosa) comprendente carbetocina o un suo sale farmaceuticamente attivo; in cui il pH della composizione è da 5,26 a 5,65, per esempio da 5,4 a 5,65.

Secondo la presente invenzione in un ulteriore aspetto, viene fornito un kit di parti comprendente: una composizione farmaceutica liquida (ad esempio acquosa) comprendente carbetocina o un suo sale farmaceuticamente attivo in cui il pH della composizione è da 5,26 a 5,65; e un contenitore [ad esempio ampolla, fiala, siringa preriempita, dispositivo per iniezione (ad esempio dispositivo per iniezione monouso come quello venduto con il marchio Uniject da Becton Dickinson), cartuccia per iniezione, ampolla, penna multi-dose] per la composizione, facoltativamente con mezzi di iniezione separati (ad esempio se necessario per la somministrazione), facoltativamente con istruzioni per la somministrazione della composizione. Il pH della composizione può essere da 5,4 a 5,65.

Secondo la presente invenzione in un ulteriore aspetto, viene fornito un kit di parti comprendente: una composizione farmaceutica liquida (ad esempio acquosa) comprendente carbetocina o un suo sale farmaceuticamente attivo e facoltativamente un antiossidante, in cui il pH della composizione è da 5,26 a 5,65; e un contenitore (ad esempio fiala, siringa preriempita, dispositivo per iniezione [ad esempio dispositivo per iniezione preriempito monouso come quello venduto con il marchio Uniject da Becton Dickinson), cartuccia per iniezione, ampolla, penna multi-dose] per la composizione, facoltativamente con



mezzi di iniezione separati (ad esempio se necessario per la somministrazione), facoltativamente con istruzioni per la somministrazione della composizione. Il pH della composizione può essere da 5,4 a 5,65.

Secondo un ulteriore aspetto, viene fornito un metodo di trattamento o prevenzione di condizioni di allattamento compromesso, alterazione dell'induzione del travaglio, condizioni di atonia uterina, sanguinamento eccessivo, infiammazione, dolore, dolore addominale, mal di schiena, disfunzione sessuale maschile e femminile, sindrome dell'intestino irritabile (IBS), costipazione, ostruzione gastrointestinale, autismo, stress, ansia, depressione, disturbo d'ansia, perdita di sangue chirurgica, emorragia post-partum, guarigione delle ferite, infezione, mastite, alterazione del parto placentare, osteoporosi e un metodo per la diagnosi del cancro e insufficienza placentare, comprendente: somministrazione a un paziente che ne necessita di una composizione farmaceutica liquida (ad esempio acquosa) dell'invenzione.

Descrizione dettagliata dell'invenzione e della divulgazione

La presente invenzione e divulgazione saranno ora illustrate con riferimento ai disegni allegati in cui:

Figura 1 mostra un cromatogramma UPLC di una miscela di impurità di carbetocina e prodotti di degradazione;

Figura 1a mostra le formule chimiche di carbetocina e prodotti di degradazione;

Figura 2 mostra il contenuto del prodotto di degradazione

(idrolisi) [Gly⁹OH]carbetocina (si veda Figura 1a) nei campioni di studio dell'antiossidante in funzione del tempo (pH costante);

Figura 3 mostra il contenuto del prodotto di degradazione (ossidazione) solfossido II carbetocina (si veda Figura 1a) nei campioni di studio dell'antiossidante in funzione del tempo (pH costante);

Figura 4 mostra singoli prodotti di degradazione a pH diverso (studio del pH, antiossidante costante);

Figura 5 mostra la somma dei prodotti di degradazione a pH diverso (studio del pH, antiossidante costante);

Figura 6 mostra la stabilità di FE 202767 in tamponi selezionati;
e

Figura 7 mostra la somma delle impurità di varie formulazioni di carbetocina dopo 12 mesi a 40 °C e 75% di umidità relativa (R.H.), come descritto nell'Esperimento 3A.

METODO ANALITICO

Questo è il metodo analitico per gli esempi di carbetocina (Esempi da 1 a 6), di seguito.

Tutte le soluzioni sono state analizzate su un sistema Waters Acquity UPLC (cromatografia liquida ad altissima pressione) usando condizioni isocratiche. La fase mobile era 20% acetonitrile (JT Baker, Ultra Gradient Grade) in acetato di ammonio non tamponato 5 mM (Fluka, Ultra ≥ 99,0%). La colonna era una Waters Acquity UPLC BEH Shield RP18, 2,1 * 100 mm, 1,7 μm (Flusso: 0,5 ml/min, temperatura colonna: 50 °C). Il volume di iniezione era 20 μl. Il rilevamento è stato

eseguito mediante UV a 220 nm. Le diverse impurità sono state valutate come area % dell'area totale.

Figura 1 mostra un cromatogramma di una miscela di impurità di carbetocina e suoi prodotti di degradazione. La soluzione conteneva carbetocina, i prodotti di idrolisi [Gly⁹OH], [Asp⁵] e [Glu⁴]carbetocina, i prodotti di ossidazione solfossido I e solfossido II-carbetocina, i prodotti di degradazione alcalina [β Asp⁵] e [D-Asn⁵]carbetocina e l'impurità correlata alla sintesi [D-Cys⁶]carbetocina. Le formule chimiche di carbetocina e dei prodotti di degradazione (prodotti di idrolisi, prodotti di ossidazione e prodotti di degradazione alcalina) sono mostrati in Figura 1a. La nomenclatura di tipo "[Glu⁴]carbetocina" è ben nota nell'arte. Le risoluzioni tra tutti i picchi erano $\geq 2,0$.

Esempio 1: Studio dell'antiossidante della formulazione (pH costante)

5,0 grammi di D(-)-Mannitolo (Ph Eur, Prolabo) sono stati disciolti in 1000 ml di acqua milliQ. Questa soluzione è stata regolata con acido acetico (Ph.Eur., Merck) a pH 5,2. Questa soluzione è stata poi divisa in quattro aliquote da 200 ml. All'aliquota 1, 0,2 grammi di EDTA disodico, diidrato (Fluka) sono stati aggiunti e disciolti. All'aliquota 2, 1,0 grammo di L-metionina (Sigma, fonte non animale) è stato aggiunto e disciolto. All'aliquota 3, 0,2 grammi di EDTA disodico, diidrato e 1,0 g di L-metionina sono stati aggiunti e disciolti. Non è stato aggiunto nulla all'aliquota 4. Il pH delle aliquote 1-3 è stato regolato con acido acetico a pH $5,2 \pm 0,1$. 1 mg di carbetocina (Polypeptide

Laboratories) è stato trasferito in quattro palloni volumetrici da 10 ml. Le aliquote 1-4 sono state usate per disciogliere la sostanza e per diluizione a volume (0,1 mg/ml di carbetocina). Le soluzioni sono state trasferite in palloni con cappuccio blu da 25 ml e poste in un armadio a 40 °C e 75% di umidità relativa. Un campione dell'attuale formulazione PABAL[®], pH 3,9 (misurato), è stato posto nello stesso armadio per il confronto.

Le soluzioni sono state analizzate dopo 2, 6, 12, 22 e 33 settimane a 40 °C. Le impurità maggiori di questo studio sono risultate essere il prodotto di idrolisi [Gly⁹OH]carbetocina e il prodotto di ossidazione [solfossido II]carbetocina. Il pH in questo studio (pH 5,2) non era sufficientemente alto per avviare una degradazione alcalina della carbetocina. Il contenuto % (p/p) dell'impurità maggiore formata mediante idrolisi, [Gly⁹OH]carbetocina, e mediante ossidazione, solfossido II-carbetocina, è mostrato nelle Figure 2 e 3. La specifica del prodotto consentita per ciascuna impurità è anche tracciata in ciascuna figura come riferimento. Pertanto si può vedere dalla Fig. 2 che se la concentrazione di [Gly⁹OH] carbetocina aumenta al di sopra di 1,5% il campione è "fuori specifica", ossia il campione si è degradato in modo tale da non essere più adatto per la somministrazione.

Come mostrato in Fig. 2, lo studio dell'antiossidante (pH costante) ha mostrato che la formazione di prodotti di idrolisi, principalmente [Gly⁹OH]carbetocina, era molto veloce nell'attuale formulazione PABAL (pH 3,9). Per quanto riguarda il contenuto di

[Gly⁹OH]carbetocina, l'attuale formulazione è stata rapidamente fuori specifica (>1,5%), dopo 6 settimane a 40 °C. Tutte le formulazioni a pH 5,2 erano ben al di sotto del limite di specifica dopo 33 settimane a 40 °C (0,4-0,6%), indicando che queste formulazioni sono stabili per almeno 6 mesi a 40 °C e 75% di umidità relativa, il che è generalmente accettato per indicare una stabilità probabile per almeno 24 mesi a 25 °C e 60% di umidità relativa (ossia una formulazione stabile a temperatura ambiente) I risultati si applicano a tutti e tre i prodotti di idrolisi. In Fig. 3, l'aggiunta di antiossidante è risultata molto efficace nel rallentare l'ossidazione della carbetocina, nonostante il pH aumentato delle formulazioni. La formulazione a pH 5,2 che non conteneva alcun additivo era fuori specifica (>0,8%) per quanto riguarda il contenuto di solfossido II-carbetocina dopo circa 20 settimane a 40 °C. Le formulazioni contenenti metionina o EDTA erano tutte ben al di sotto del limite di specifica dopo 33 settimane (0,2-0,4%). La formulazione contenente una combinazione di EDTA e metionina non ha mostrato alcun aumento dei prodotti di ossidazione rispetto ai livelli trovati nel lotto di sostanza. A causa del basso pH, l'attuale formulazione non era soggetta a degradazione mediante ossidazione (pH 3,9). I risultati sono mostrati in forma numerica nella seguente tabella (Tabella 1).

Tabella 1 Singolo e somma dei prodotti di degradazione (%) dopo 33 settimane a 40 °C (pH costante).

Formulazione	Gly ⁹ OH	Asp ⁵	Glu4	Solfossido I	Solfossido II	βAsp5	D- Asn ⁵	Somma delle impurità
Formulazione attuale	6,43	1,15	5,41	0,42	0,38	0,13	0,15	16,4
Mannitolo pH 5,2	0,53	0,14	0,42	0,51	0,93	0,13	0,12	3,5
Mannitolo pH 5,2+metionina	0,63	0,20	0,51	0,14	0,25	0,15	0,16	3,2
Mannitolo pH 5,2+EDTA	0,52	0,15	0,38	0,31	0,39	0,15	0,10	2,9
Mannitolo pH 5,2+metionina+EDTA	0,44	0,13	0,35	0,10	0,16	0,19	0,17	2,4

La Tabella 1 include la somma dei prodotti di degradazione per tutti i campioni, e dopo 33 settimane l'effetto di EDTA è più chiaro. Inoltre, il campione contenente sia metionina che EDTA è chiaramente migliore degli altri. L'evidenza indica una degradazione lineare: supponendo che questo sia effettivamente il caso, è probabile che il campione mannitolo pH 5,2+metionina+EDTA sia nella specifica - ossia adatto all'uso - per ben 86 settimane a 40 °C. Questo si basa, come è ben noto nell'arte, su un'estrapolazione lineare dell'aumento di impurità nel tempo per determinare quando la quantità di impurità sarebbe sufficientemente elevata affinché la formulazione sia "fuori specifica".

Esempio 2: Studio del pH della formulazione (antiossidante costante)

1,2 grammi di acido succinico (Sigma-Aldrich, ≥ 99%) e 1,0 g di

L-metionina (Sigma, fonte non animale) sono stati disciolti in 1000 ml di acqua milliQ (10 mM). Questa soluzione è stata regolata, in aliquote, con NaOH diluito (Ph.Eur., Merck) a pH 4,0, 4,5, 5,2, 5,65, 6,1, 6,5 e 7,0. 55 mg di carbetocina (Polypeptide Laboratories) sono stati disciolti in 50 ml di acqua milliQ (1,1 mg/ml). 1,0 ml della soluzione di carbetocina (1,1 mg/ml) è stato miscelato con 10 ml di ciascun tampone (0,1 mg/ml di carbetocina). 0,55 g di mannitolo (5%) sono stati aggiunti a ciascuna soluzione e disciolti. Le soluzioni sono state trasferite in fiale di vetro da 15 ml con coperchio a vite e poste in un armadio a 40 °C a 75% di umidità relativa.

Le soluzioni sono state analizzate dopo 12 e 52 settimane a 40 °C. Il contenuto dei singoli prodotti di degradazione e la somma dei prodotti di degradazione è presentato nelle Tabelle 2a e 2b e nelle Figure 4 e 5.

Tabella 2a Singolo e somma dei prodotti di degradazione (%) a pH diverso dopo 12 settimane a 40 °C (studio del pH, antiossidante costante).

pH del campione	Prodotti di idrolisi			Prodotti di ossidazione		Impurità alcaline			Somma
	[Gly ⁹ OH]	[Asp ⁵]	[Glu ⁴]	Solfossido I	Solfossido II	[D-Asn ⁵]	[β Asp ⁵]	Sconosciuta 2,0 min	
4,0	2,22	0,50	1,78	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4,50
4,5	0,84	0,19	0,67	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1,70
5,2	0,23	0,10	0,27	N.D.	N.D.	0,06	0,05	0,09	0,80

5,65	0,15	0,04	0,12	N.D.	0,03	0,12	0,08	0,16	0,70
6,1	0,14	0,09	0,13	0,03	0,03	0,30	0,22	0,32	1,26
6,5	0,25	0,13	0,12	0,03	0,03	0,54	0,30	0,48	1,88
7,0	0,52	0,20	0,17	0,02	0,02	1,27	0,47	0,62	3,29

Tabella 2b Singolo e somma dei prodotti di degradazione (%) a pH diverso dopo 52 settimane a 40 °C (studio del pH, antiossidante costante).

pH del campione	Prodotti di idrolisi			Prodotti di ossidazione		Impurità alcaline			Somma
	[Gly ⁹ O H]	[Asp ⁵]	[Glu ⁴]	Solfossido I	Solfossido II	[DAsn ⁵]	[β Asp ⁵]	Sconosciuta 2,0 min	
4,0	7,55	1,09	6,23	0,04	0,07	0,00	0,19	0,94	19,3
4,5	2,92	0,57	2,49	0,04	0,05	0,00	0,19	0,40	7,8
5,2	0,78	0,26	0,72	0,05	0,14	0,26	0,25	0,22	3,6
5,65	0,48	0,22	0,52	0,02	0,02	0,45	0,40	0,40	3,8
6,1	0,56	0,35	0,34	0,08	0,11	1,06	0,73	0,77	5,9
6,5	0,88	0,49	0,32	0,03	0,06	2,30	1,25	1,31	8,8
7,0	1,53	0,71	0,43	0,05	0,04	4,10	1,68	1,65	12,9

Come discusso di seguito con riferimento all'Esempio 3a, il limite di specifica per la somma delle impurità (per l'attuale formulazione PABAL[®]) è ≤ 5%. Come si può vedere dalla Tabella 2b ("Somma"), i Campioni a pH 5,2 e 5,65 (esempi dell'invenzione) rientrano ancora nella specifica dopo 52 settimane (1 anno) a 40 °C, mentre tutti gli altri campioni sono fuori specifica dopo 52 settimane (1

anno) a 40 °C.

I risultati dello studio del pH (Figure 4, 5) hanno confermato le osservazioni dello studio dell'antiossidante. La formazione di prodotti di idrolisi ([Gly⁹OH], [Asp⁵] e [Glu⁴]carbetocina) è stata efficacemente ridotta mediante un aumento del pH da pH 4,0 a circa pH 5,65. A valori di pH più elevati (pH 6,1 - 7,0) il contenuto di prodotti di idrolisi è stato nuovamente aumentato. È stata anche confermata l'efficacia dell'antiossidante a una concentrazione di circa 1 mg/ml (nello studio dell'antiossidante la concentrazione di antiossidante era 5 mg/ml). Tuttavia, se l'ossidazione è limitata nel farmaco o nella soluzione di farmaco (ad esempio se il farmaco o la soluzione di farmaco non è soggetta a ossidazione), la quantità di antiossidante può essere ridotta, o l'uso di antiossidante può non essere necessario. A causa dell'antiossidante, l'ossidazione della carbetocina era trascurabile, indipendentemente dal pH. Il limite di pH superiore di una formulazione ottimizzata era invece limitato dalla degradazione alcalina della carbetocina. L'impurità principale della degradazione alcalina era [D-Asn⁵]carbetocina, che è stata rapidamente aumentata a valori di pH superiori a pH 6,1. È stata anche osservata la formazione di altre due impurità minori a pH elevato, [β Asp⁵]carbetocina e un'impurità sconosciuta che eluisce precocemente nel cromatogramma (tR: 2,0 min).

La forma a U della curva del pH rispetto alla somma dei prodotti di degradazione illustra il plateau di stabilità della carbetocina a pH 5,0 -

6,0. A pH 5,2 la somma dei prodotti di degradazione è risultata essere solo il 16% della somma dei prodotti di degradazione a pH 4,0 (formulazione attuale). Il pH ottimale è risultato essere compreso tra pH 5,1 e 6, per esempio tra circa pH 5,2 e 5,65.

Gli Esempi 1 e 2 danno un'indicazione molto forte che le formulazioni dell'invenzione sono stabili a temperatura ambiente fino a due anni.

Esempio 3: Studio di formulazione di agenti di isotonicità, NaCl rispetto a mannitolo, a 30 °C, 40 °C

4,22 grammi di acido citrico monoidrato (Merck, pro analisi) sono stati disciolti in 2000 ml di acqua milliQ (20 mM). Questa soluzione è stata divisa in dieci aliquote da 200 ml. 1,8 g di cloruro di sodio (Merck, pro analisi) sono stati aggiunti a cinque dei palloni, agli altri cinque palloni sono stati aggiunti 10 g di mannitolo (VWR, Ph Eur). Secondo un disegno sperimentale, 0,2, 0,6 o 1,0 g di L-metionina (Sigma, fonte non animale) sono stati aggiunti e il pH è stato regolato con NaOH 1% (Merck, pro analisi) a pH 5,2, 5,65 o 6,1, vedere Tabella 3a e 3b. 2 mg di Carbetocina (Polypeptide Laboratories,) sono stati trasferiti in dodici palloni volumetrici da 20 ml e la sostanza è stata disciolta in ciascun tampone (0,1 mg/ml di carbetocina). I campioni contenenti 3 mg/ml di metionina sono stati preparati in duplicato, vedere Tabella 3a e 3b.

Due mL di ciascuna soluzione sono stati trasferiti in fiale LC e posti in un armadio a 30 °C/75% di umidità relativa. Le soluzioni

rimanenti sono state trasferite in palloni con cappuccio blu da 25 ml e poste in un armadio a 40 °C/75% di umidità relativa. I livelli di impurità dopo 25 settimane in 30 °C/75% di umidità relativa sono mostrati nelle seguenti Tabelle 3a e 3b.

Tabella 3a

Formulazione	Gly ⁹	Asp ⁵	Glu ⁴	Solfossido	Solfossido	Sconosciuta	βAsp	D-Asn ⁵	D-	Somma
	OH			I	II	2 min	⁵		Cys ⁶	**
Mannitolo, pH 5,2, 1 mg/mL di metionina	0,18	0,04	0,18	0,04	0,03	N.D.	N.D.	N.D.	0,09	0,80
Mannitolo, pH 6,1, 1 mg/mL di metionina	0,07	0,03	0,07	0,03	N.D.	0,17	0,15	0,01	0,12	0,95
Mannitolo, pH 5,65, 3 mg/mL di metionina, campione 1	0,10	0,03	0,08	0,04	0,05	0,09	0,07	0,05	0,12	0,78

Mannitolo, pH 5,65, 3 mg/mL di metionina, campione 2	0,09	0,02	0,11	0,03	N.D.	0,08	0,04	N.D.	0,11	0,63
Mannitolo, pH 5,2, 5 mg/mL di metionina	0,17	0,03	0,20	0,02	N.D.	N.D.	0,04	N.D.	0,11	0,75
Mannitolo, pH 6,1, 5 mg/mL di metionina	0,10	0,05	0,05	0,04	N.D.	0,23	0,18	0,11	0,12	1,11
Anni a OOS* per 3 mg/mL, pH 5,65 campione 2.	8	12	7	"infinito"	"infinito"	6	12	"infinito"	N/A	4,2

*Fuori specifica

** dei prodotti di degradazione

Tabella 3b (NaCl)

Formulazione	Gly ⁹	Asp ⁵	Glu ⁴	Solfossido	Solfossido	Sconosciuta	Beta	D-	D-	Somma
	OH			I	II	2 min	Asp ⁵	Asn ⁵	Cys ⁶ **	

NaCl, pH 5,2, 1 mg/mL di metionina	0,21	0,06	0,15	0,02	0,03	ND	0,02		0,12	0,82
NaCl, pH 6,1, 1 mg/mL di metionina	0,08	0,05	0,04	0,04	0,04	0,2	0,12	0,12	0,11	0,99
NaCl, pH 5,65, 3 mg/mL di metionina campione 1	0,09	0,03	0,07	0,01	ND	0,12	0,04	0,05	0,11	0,74
NaCl, pH 5,65, 3 mg/mL di metionina campione 2	0,09	0,04	0,08	0,02	0,03	0,10	0,05	0,14	0,11	0,78
NaCl, pH 5,2, 5 mg/mL di metionina	0,17	0,04	0,15	0,02	0,04	ND	0,05		0,14	0,86
NaCl, pH 6,1, 5 mg/mL di metionina	0,09	0,04	0,06	0,03	ND	0,23	0,17	0,14	0,11	1,11

** dei prodotti di degradazione

Le Tabelle 3a e 3b mostrano che vi è pochissima degradazione in tutti i campioni. Questo livello di degradazione corrisponde a quello osservato dopo 6 settimane a 40 °C.

I risultati indicano che i campioni migliori sono probabilmente stabili per 5 anni a 30 °C. Come si vede nella Tabella 3a, righe 5 e 8, i risultati per la metionina 3mg/mL, pH 5,65 campione 2 indicano che questo campione rimarrebbe nella specifica per più di 4 anni a 30 °C e 75% di umidità relativa. Questo si basa, come è ben noto nell'arte, su un'estrapolazione lineare dell'aumento di impurità nel tempo per determinare quando la quantità di impurità sarebbe sufficientemente elevata affinché la formulazione sia "fuori specifica" (OOS). È stato anche trovato che il pH ottimale a 30 °C è superiore a quello a 40 °C (risultati non mostrati). Le differenze sono piccole ma il pH 5,65 è leggermente superiore al pH 5,2 a 30 °C (viceversa a 40 °C). Questi risultati indicano che vi è un buon margine per ottenere una formulazione stabile nella zona climatica III/IV.

I richiedenti hanno trovato che l'aumento di metionina porta a una maggiore degradazione, principalmente per aumento di [BetaAsp5]carbetocina. Una concentrazione di circa 1 mg/ml sembra essere sufficiente a fornire una stabilizzazione efficace senza degradazione significativa.

Esperimento 3a - la stabilità della carbetocina a pH diversi e usando antiossidanti diversi

Questo studio è stato progettato per dare un quadro più ampio della stabilità della carbetocina a pH diversi e usando antiossidanti diversi.

1,2 grammi di acido succinico (Sigma-Aldrich, ≥ 99%) sono stati

disciolti in 1000 ml di acqua milliQ (10 mM). Questa soluzione è stata regolata, in aliquote, con NaOH diluito (Ph.Eur., Merck) a pH 4,0, 4,5, 5,2, 5,65, 6,1, 6,5 e 7,0. 55 mg di carbetocina (Polypeptide Laboratories, Strasburgo) sono stati disciolti in 50 ml di acqua milliQ (1,1 mg/ml). 1,0 ml della soluzione di carbetocina (1,1 mg/ml) è stato miscelato con 10 ml di ciascun tampone (0,1 mg/ml di carbetocina). 0,55 g di mannitolo (5%) sono stati aggiunti a ciascuna soluzione e disciolti. Le soluzioni sono state trasferite in fiale di vetro da 15 ml con coperchio a vite e poste nell'armadio a 40 °C/75% di umidità relativa.

La stessa procedura è stata ripetuta; con l'eccezione che 1,0 g di L-metionina (Sigma, fonte non animale) è stato aggiunto ai 1000 ml di acqua milliQ, dando campioni duplicati contenenti 1 mg/ml di metionina a tutti i livelli di pH. Le soluzioni sono state trasferite in fiale di vetro da 15 ml con coperchio a vite e poste nell'armadio a 40 °C/75% di umidità relativa.

I tamponi a pH 5,65, 6,1 e 6,5 sono stati anche divisi in aliquote a cui è stato aggiunto EDTA disodico, diidrato (Fluka). Questi campioni sono stati conservati a 40 °C/75% per 12 mesi prima dell'analisi.

La somma delle impurità dopo 12 mesi a 40 °C/75% di umidità relativa è mostrata in Fig. 7. La Figura mostra anche il "limite di specifica", al di sopra del quale la somma delle impurità è tale per cui la formulazione è fuori specifica.

Tutte le formulazioni a pH 5,2 e pH 5,65 rientrano nella specifica dopo 12 mesi a 40 °C/75% di umidità relativa.

L'effetto positivo della metionina era visibile anche in questo studio. Tutti i campioni contenenti metionina hanno mostrato quantità molto basse di prodotti di ossidazione, indipendentemente dalla composizione e dal pH. Ciò indica l'inclusione di metionina in una formulazione robusta, dove (per esempio) il contenuto di ioni metallici del principio attivo carbetocina, che può variare con il lotto di produzione e che, se elevato, può portare ad un'aumentata ossidazione, non sarà un parametro controllato.

La formulazione più stabile era la formulazione a pH 5,2 contenente 1 mg/ml di metionina (risultati non mostrati). Il parametro che era più vicino al limite di specifica dopo 12 mesi a 40 °C/75% di umidità relativa era la somma delle impurità (Fig. 7). Il limite di specifica per la somma delle impurità (per l'attuale formulazione PABAL®) è $\leq 5\%$ (ossia 5,5%). Si può presumere che la degradazione sia lineare nel tempo, e si può pertanto calcolare che la formulazione a pH 5,2 contenente 1 mg/ml di metionina sarebbe fuori specifica dopo circa 80 settimane a 40 °C/75% di umidità relativa, in base alla specifica per l'attuale formulazione PABAL®.

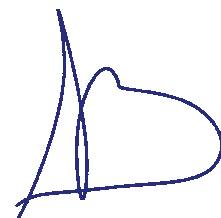
Una guida comunemente usata, supportata dall'equazione di Arrhenius, è che la velocità della maggior parte delle reazioni chimiche raddoppia per ogni aumento di temperatura di 10 °C. Se applichiamo questa relazione alla formulazione a pH 5,2 contenente 1 mg/ml di metionina, la durata di conservazione stimata di una nuova formulazione sarà di 160 settimane a 30 °C, ossia leggermente

superiore a 3 anni, sempre in base alla specifica per l'attuale formulazione PABAL®. È probabile che questa sia una sottostima, poiché la "somma delle impurità" riportata in questo esperimento includeva ogni picco sul basale, incluse le impurità correlate alla sintesi e i picchi al di sotto del limite di segnalazione (<0,05%). Le impurità correlate alla sintesi sono costituite principalmente da [DCys⁶] e [desGln⁴]carbetocina, che non aumentano durante la conservazione. Il lotto di sostanza conteneva 0,9% di impurità secondo il fornitore. Pertanto, è probabile che per questa formulazione si raggiunga una durata di conservazione superiore a 3 anni a 30 °C/75% di umidità relativa.

Esempio 4 - Formulazione in tampone succinato

La seguente preparazione e decantazione è stata eseguita in una stanza farmaceutica in condizioni prive di germi. 47 grammi di mannitolo, 1,2 grammi di agente tamponante acido succinico e 1,0 g di L-metionina sono stati disciolti in circa 900 ml di acqua milliQ (10 mM). Il pH della soluzione è stato regolato con NaOH 5 M fino a pH 5,4. La soluzione è stata trasferita in un pallone volumetrico da 1000 ml e diluita a volume con acqua per iniezione.

50 mg di carbetocina (Polypeptide Laboratories) sono stati trasferiti in un pallone volumetrico da 500 ml e disciolti e diluiti a volume con il tampone mannitolo/acido succinico/metionina pH 5,4. La soluzione è stata filtrata attraverso un filtro da 0,22 µm e riempita in fiale di vetro con tappi di gomma (1,1 ml per fiala). Ciascuna fiala



includeva una composizione acquosa comprendente carbetocina (0,1 mg/mL), e il pH della composizione era 5,4 (ossia da 5,0 a 6,0). La composizione acquosa includeva anche tampone succinato (agente tamponante acido succinico), metionina (antiossidante) e mannitolo (agente isotonico). In un ulteriore Esempio (Esempio 4A, non mostrato) è stata preparata una soluzione esattamente come l'Esempio 4 ed è stato aggiunto EDTA (0,1% p/v). L'osmolalità delle soluzioni nell'Esempio 4 e 4A è risultata essere 300 ± 20 mOsmol/kg.

La formulazione dell'Esempio 4 (e quella dell'Esempio 4A) è adatta per l'iniezione a un paziente con atonia uterina.

Esempio 5 - Formulazione in tampone succinato

La seguente preparazione e decantazione è stata eseguita in una stanza farmaceutica in condizioni prive di germi. 1,2 grammi di agente tamponante acido succinico (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$) e 1,0 g di L-metionina (Sigma, fonte non animale) sono stati disciolti in 1000 ml di acqua milliQ (10 mM) per fornire un tampone succinato di pH 5,4, il pH essendo regolato a questo valore con soluzione di NaOH.

0,55 g di mannitolo (5%) sono stati disciolti in 10 ml di tampone succinato. Metionina 0,5% (p/v) è stata aggiunta alla soluzione e disciolta. Carbetocina (Polypeptide Laboratories) è stata disciolta nella soluzione in modo che la concentrazione di carbetocina fosse 0,1 mg/mL, e il pH regolato a 5,4 usando soluzione di NaOH. La soluzione è stata divisa in quantità di 1 mL e sigillata in ampolle. Ciascuna ampolla includeva una composizione acquosa comprendente

carbetocina (0,1 mg/mL), e il pH della composizione era 5,4 (ossia da 5,0 a 6,0). La composizione acquosa includeva anche tampone succinato (agente tamponante acido succinico), metionina (antiossidante) e mannitolo (agente isotonico). Si apprezzerà che la composizione può essere realizzata con acqua per iniezione (WFI). La formulazione dell'Esempio 5 è adatta per l'iniezione a un paziente con atonia uterina.

Esempio 6 - Formulazione con tampone citrato/fosfato

La formulazione riportata nella seguente tabella è stata preparata mediante metodi simili a quelli riportati negli Esempi 4 e 5 di cui sopra.

Tabella 4

Componente	Quantità per mL	Funzione
Carbetocina	10 mg	Principio attivo
Sodio fosfato dibasico diidrato	3,24 mg	Agente tamponante
Acido citrico monoidrato	1,43 mg	Agente tamponante
NaCl	7,5 mg	Agente di isotonicità
HCl	q.s. regolare a pH 5,5	Regolazione del pH
NaOH	q.s. regolare a pH 5,5	Regolazione del pH
Acqua per iniezione	Regolare a 1 mL	Solvente

La composizione è adatta per la somministrazione nasale.

Facoltativamente, un antiossidante (ad esempio metionina a una concentrazione di 1,0 mg/mL può essere incluso nella formulazione). L'antiossidante può essere qualsiasi antiossidante comunemente usato nell'arte.

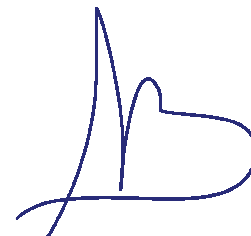
Facoltativamente, la composizione può includere un potenziatore. Il potenziatore può essere qualsiasi potenziatore comunemente usato nell'arte, per esempio qualsiasi potenziatore approvato per l'uso come eccipiente farmaceutico. Il potenziatore può essere, per esempio, metil- β -ciclodestrina, Polisorbato 80, carbossimetilcellulosa o idrossipropilmetilcellulosa.

Esempio comparativo 7 - la stabilità di FE 202767 in tamponi citrato e citrato-fosfato (pH 5,0, 5,5 e 6,0) a 40 °C per un periodo di sei mesi.

Materiali e metodi

FE 202767 (Ferring) è stato sintetizzato mediante il metodo riportato in WO2009/122285. FE 202767 è stato disciolto a una concentrazione di 0,2 mg/ml in tampone citrato 25 mM (isotonico rispetto a soluzione salina) o tampone citrato-fosfato 25 mM (isotonico con soluzione salina) a pH variabile (pH 5,0, 5,5, 6,0), mediante metodi noti nell'arte. Le soluzioni sono state incubate a 40 °C per 176 giorni, con campioni prelevati il giorno 0, 15, 30, 84 e 176.

I campioni sono stati valutati mediante HPLC per determinare la quantità di peptide intatto rimanente nei vari punti temporali, mediante



metodi ben noti nell'arte, confrontando l'area % del picco del peptide intatto al giorno di campionamento rispetto all'area % al giorno 0.

Il metodo HPLC ha usato uno strumento Agilent 1200. Le fasi mobili erano tamponi HPLC A (A= 0,01% TFA in acqua) e B (B = 0,01% TFA in [70% v/v acetonitrile e 30% v/v acqua]) con il gradiente 15% B per 1 min, poi da 15 a 95% B in 30 min, poi da 95 a 100% B in 3 min, poi 100% B per 5 min e da 100% B a 15% B in 1 min alla portata 0,3 mL/min. La colonna Phenomenex MAX-RP C18, 2,0 x 150 mm, 4 μ m, 80 A era a temperatura 40 con rilevamento UV a 210 nm. Il volume di iniezione era 10 μ L.

I risultati sono mostrati nella seguente Tabella 5 e nella Figura 6 allegata. In Tabella 5 e Fig. 6, CP50 è tampone citrato fosfato a pH 5,0; CP55 è tampone citrato fosfato a pH 5,5; e CP60 è tampone citrato fosfato a pH 6,0; CT50 è tampone citrato fosfato a pH 5,0; CT55 è tampone citrato fosfato a pH 5,5; e CT60 è tampone citrato fosfato a pH 6,0.

Tabella 5. % di peptide intatto rimanente (normalizzato al giorno 0)

Giorno	CP50	CP55	CP60	CT50	CT55	CT60
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
6	99,97	99,83	99,65	99,66	99,75	100,00
15	99,66	99,31	99,54	99,51	99,71	99,40
30	99,47	99,30	99,26	99,29	n.d.	99,30
84	98,38	97,44	97,78	98,05	98,61	97,94

176	96,98	95,60	95,48	95,19	97,34	73,36
------------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Note: % di peptide intatto rimanente espresso rispetto all'area % al giorno 0. n.a. = punto di dati escluso a causa del picco aberrante nel cromatogramma HPLC. CP = tampone citrato-fosfato; CT = tampone citrato.

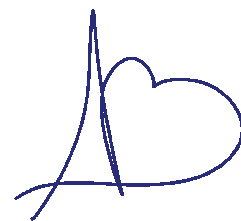
Conclusionione

FE 202767 ha mostrato buona stabilità in tamponi citrato-fosfato nell'intervallo di pH testato (pH 5,0, 5,5 e 6,0), con >95% rimanente dopo 176 giorni in ciascuna condizione. Era anche molto stabile (>95% rimanente) in tampone citrato a pH 5,0 e 5,5; tuttavia, vi è stata degradazione significativa dopo 176 giorni in tampone citrato a pH 6,0.

In generale, ci si aspetta che una formulazione adatta per la somministrazione nasale abbia un pH compreso tra 5,0 e 6,0, includa il numero minimo di reagenti (ad esempio nessun antiossidante). Si preferisce anche che la formulazione sia stabile a temperatura ambiente. L'Esempio 7 dimostra che le formulazioni lungo le linee di cui sopra possono essere adatte per la somministrazione nasale, poiché hanno pH appropriato e sono stabili a temperatura ambiente senza necessità di antiossidanti o altri additivi che potrebbero influenzare negativamente la mucosa nasale.

Esempio comparativo 8 - la stabilità di FE 202767 in vari tamponi a 40 °C per uno e tre mesi.

Materiali e metodi



Il metodo era simile all'Esempio 7. FE 202767 (Ferring) è stato sintetizzato mediante il metodo riportato in WO2009/122285. FE 202767 è stato disciolto a una concentrazione di 0,2 mg/ml in tampone citrato 25 mM (acido citrico/Na citrato), tampone acetato 10 mM (acido acetico/Na acetato) o tampone succinato 10 mM (acido succinico 1 mM + NaOH a pH rilevante) a pH variabile (pH 5,0, 5,2, 5,5, 5,65, 5,8, 6,0), mediante metodi noti nell'arte. Come riportato nella tabella di seguito, i vari campioni includevano anche un agente di isotonicità (NaCl, 7 mg/mL o mannitolo 47 mg/mL) per ottenere isotonicità. Alcuni dei campioni includevano un ossidante (metionina 1 mg/mL, EDTA 1 mg/mL, o combinazione di EDTA 1 mg/mL e metionina 1 mg/mL). Ciascuna formulazione (si veda la Tabella di seguito) è stata riempita in una fiala di vetro 10R sigillata con un tappo di gomma e un cappuccio di alluminio.

Le soluzioni sono state incubate a 40 °C al 75% di umidità relativa, con campioni prelevati al giorno 30 (1 mese), e al giorno 90 (3 mesi).

I campioni sono stati valutati mediante HPLC per determinare la quantità di peptide intatto rimanente nei vari punti temporali, mediante metodi ben noti nell'arte, confrontando l'area % del picco del peptide intatto al giorno di campionamento rispetto all'area % al giorno 0.

Il metodo HPLC ha usato uno strumento Agilent 1100. Le fasi mobili erano tamponi HPLC A (A= 0,1% TFA in acqua) e B (B = 0,1% TFA in acetonitrile) con il gradiente da 20 a 30% B in 40 min, poi da 30

a 60% B in 15 min, poi da 60 a 20% B in 1 min e poi 20% B per 10 min alla portata 0,5 mL/min. La colonna Zorbax 300SB C18, 3,0 x 150 mm, 3,5 μ m, 300 A era a temperatura 25 con rilevamento UV a 214 nm. Il volume di iniezione era 15 μ L

I risultati sono mostrati nella seguente Tabella.

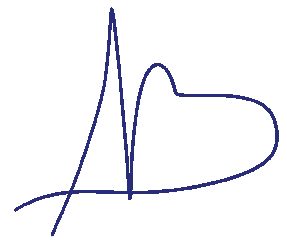
Tabella 6

Numero del campione	Tampone	pH	Agente di isotonicità	Antiossidante	Conc. peptide iniziale (mg/mL)	Conc. peptide (mg/mL) a 30 giorni	Conc. peptide (mg/mL) a 90 giorni
1	Citrato	6	NaCl	No	0,186	0,187	0,182
2	Citrato	5,65	NaCl	No	0,187	0,187	0,182
3	Citrato	5,8	NaCl	No	0,187	0,187	0,182
4	Citrato	5	NaCl	Metionina	0,187	0,183	0,162
5	Citrato	5,5	NaCl	Metionina	0,187	0,187	0,171
6	Citrato	6	NaCl	Metionina	0,186	0,187	0,181
7	Citrato	6	NaCl	EDTA	0,187	0,188	0,183
8	Citrato	6	NaCl	Metionina ed EDTA	0,187	0,187	0,182
8 placebo	Citrato	6	NaCl	Metionina ed EDTA	0,000	0,000	0,000
9	Citrato	5	Mannitolo	No	0,187	0,186	0,173
10	Succinato	6	Mannitolo	No	0,188	0,186	0,180

11	Succinato	5	NaCl	No	0,186	0,187	0,183
12	Succinato	5,2	NaCl	No	0,187	0,188	0,184
13	Succinato	5,65	NaCl	No	0,187	0,188	0,183
14	Succinato	6	NaCl	No	0,187	0,187	0,182
15	Succinato	5	NaCl	Metionina	0,187	0,186	0,182
16	Succinato	5,2	NaCl	Metionina	0,187	0,185	0,182
17	Succinato	5,65	NaCl	Metionina	0,187	0,186	0,180
18	Succinato	6	NaCl	Metionina	0,187	0,188	0,181
19	Succinato	5	Mannitolo	No	0,188	0,186	0,176
20	Succinato	6	Mannitolo	No	0,187	0,099	0,124
21	Succinato	5	Mannitolo	Metionina	0,187	0,180	0,012
21 placebo	Succinato	5	Mannitolo	Metionina	0,000	0,000	0,000
22	Succinato	6	Mannitolo	Metionina	0,188	0,023	0,174
23	Acetato	5,2	NaCl	No	0,186	0,186	0,183
24	Acetato	5,65	NaCl	No	0,187	0,187	0,184
24 placebo	Acetato	5,65	NaCl	No	0,000	0,000	0,000

Conclusione

FE 202767 ha mostrato buona stabilità in tamponi citrato e acetato nell'intervallo di pH testato dopo 30 giorni in ciascuna condizione. Era anche molto stabile in tampone succinato a pH da 5,0 a 5,65; tuttavia, vi è stata degradazione significativa dopo 30 giorni in alcuni campioni di succinato a pH 6,0 (campione 20, 22). La presenza o assenza di antiossidante sembrava non importante in una scala temporale di 30 giorni.



FE 202767 ha mostrato anche buona stabilità in tamponi citrato e acetato nell'intervallo di pH testato dopo 90 giorni in ciascuna condizione, con i risultati migliori essendo mostrati all'estremità superiore dell'intervallo di pH (ad esempio tra pH 5,5 e 6, si vedano i campioni da 1 a 6). Era anche stabile in tampone succinato a pH da 5,0 a 5,65 dopo 90 giorni. I risultati a 30 e 90 giorni per i campioni 21 e 22 suggeriscono una confusione nell'analisi.

Di nuovo, la presenza o assenza di antiossidante sembrava non importante in una scala temporale di 90 giorni.

I risultati indicano che NaCl è un agente di isotonicità migliore rispetto al mannitolo.

Come indicato sopra, ci si aspetta che una formulazione adatta per la somministrazione nasale abbia un pH compreso tra 5,0 e 6,0, includa il numero minimo di reagenti (ad esempio nessun antiossidante). Si preferisce anche che la formulazione sia stabile a temperatura ambiente. L'Esempio 8 dimostra che le formulazioni lungo le linee di cui sopra possono essere adatte per la somministrazione nasale, poiché hanno pH appropriato e sono stabili a temperatura ambiente senza necessità di antiossidanti o altri additivi che potrebbero influenzare negativamente la mucosa nasale.

Esempio comparativo 9 - Formulazione di FE 202767 con tampone citrato/fosfato

FE 202767 (Ferring) è stato sintetizzato mediante il metodo riportato in WO2009/122285. La formulazione riportata nella seguente

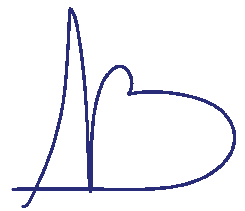
tabella è stata preparata mediante metodi simili a quelli riportati negli Esempi 4 e 5 di cui sopra.

Tabella 7

Componente	Quantità per mL	Funzione
carba-1-[4-FBzlGly7]dOT (FE 202767)	0,7 mg	Principio attivo
Sodio fosfato dibasico diidrato	3,24 mg	Agente tamponante
Acido citrico monoidrato	1,43 mg	Agente tamponante
NaCl	7,5 mg	Agente di isotonicità
HCl	q.s. regolare a pH 5,5	Regolazione del pH
NaOH	q.s. regolare a pH 5,5	Regolazione del pH
Acqua per iniezione	Regolare a 1 mL	Solvente

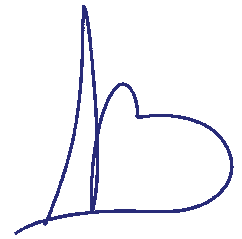
La composizione è adatta per la somministrazione nasale.

Facoltativamente, un antiossidante (ad esempio metionina a una concentrazione di 1,0 mg/mL può essere incluso nella formulazione).



RIVENDICAZIONI

1. Composizione liquida comprendente carbetocina o un suo sale farmaceuticamente attivo; in cui il pH della composizione è da 5,26 a 5,65.
2. Composizione secondo la rivendicazione 1 in cui la composizione è una composizione acquosa.
3. Composizione secondo qualsiasi rivendicazione precedente comprendente un agente tamponante, per esempio acido succinico.
4. Composizione secondo qualsiasi rivendicazione precedente comprendente un tampone, per esempio un tampone succinato o citrato/fosfato.
5. Composizione secondo qualsiasi delle rivendicazioni 3 o 4 in cui è presente solo un tampone o agente tamponante.
6. Composizione secondo qualsiasi rivendicazione precedente in cui la concentrazione di carbetocina è da 0,01 a 55 mg/mL, per esempio da 0,01 a 10 mg/mL, per esempio da 0,01 a 1,5 mg/mL.
7. Composizione secondo qualsiasi rivendicazione precedente comprendente inoltre un antiossidante.
8. Composizione secondo la rivendicazione 7 in cui l'antiossidante è metionina, EDTA o una combinazione di metionina e EDTA.
9. Composizione secondo qualsiasi rivendicazione



precedente, comprendente inoltre un agente di isotonicità.

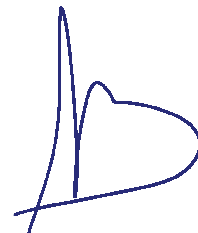
10. Composizione secondo la rivendicazione 3 in cui il composto farmaceutico è carbetocina e l'agente tamponante è un acido succinico.

11. Composizione secondo qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 10 per l'uso nel trattamento o nella prevenzione dell'atonia uterina, per esempio dopo il parto vaginale del neonato, parto del neonato mediante taglio cesareo, o per l'uso nel trattamento o nella prevenzione dell'atonia uterina in un paziente che è a rischio di sviluppare PPH; e/o per l'uso nel trattamento o nella prevenzione del sanguinamento eccessivo dopo il parto vaginale.

12. Kit di parti comprendente: una composizione farmaceutica liquida (ad esempio acquosa) comprendente carbetocina o un suo sale farmaceuticamente attivo in cui il pH della composizione è da 5,26 a 5,65; e un contenitore per la composizione, facoltativamente con mezzi di iniezione separati; facoltativamente comprendente inoltre un agente di isotonicità, per esempio NaCl.

13. Kit di parti comprendente: una composizione farmaceutica liquida comprendente carbetocina o un suo sale e facoltativamente un antiossidante, in cui il pH della composizione è da 5,26 a 5,65; e un contenitore per la composizione.

14. Composizione secondo qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 10 per uso nella produzione di un medicinale per il trattamento o la prevenzione dell'atonia uterina, per esempio dopo il parto vaginale del



neonato, parto del neonato mediante taglio cesareo, o per l'uso nella produzione di un medicinale per il trattamento o la prevenzione dell'atonia uterina in un paziente che è a rischio di sviluppare PPH; e/o per l'uso nella produzione di un medicinale per il trattamento o la prevenzione del sanguinamento eccessivo dopo il parto vaginale.

*** **

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

LEGENDA DELLE TAVOLE DEI DISEGNI

TAVOLA 1/5

Figura 1

“Figure 1. Chromatogram of an impurity mix of carbetocin and degradation products” = Figura 1. Cromatogramma di una miscela di impurità di carbetocina e prodotti di degradazione

“Minutes” = Minuti

“sulfoxide *” = solfossido *

TAVOLA 2/5

Figura 1a

“Carbetocin” = Carbetocina

“sulfoxide 1+11 carbetocin (two structural isomers)” = solfossido 1+11 carbetocina (due isomeri strutturali)

“(Sulfoxide I has the R-configuration on the sulphur atom, sulfoxide II has the S-configuration).” = (Solfossido I ha la configurazione R sull'atomo di zolfo, solfossido II ha la configurazione S).

TAVOLA 3/5

Figura 2

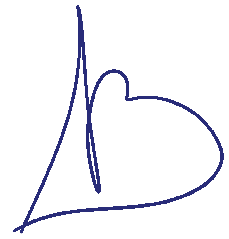
“Figure 2. Content of [Giy⁹OH]carbetocin in the antioxidant study samples (constant pH)” = Figura 2. Contenuto di [Giy⁹OH]carbetocina nei campioni di studio dell'antiossidante (pH costante)

“carbetocin” = carbetocina

“% impurity” = % di impurità

“Time (weeks at 40°C)” = Tempo (settimane a 40 °C)

“current formulation” = formulazione attuale



“pH 5.2 no additives” = pH 5,2 nessun additivo

“methionine” = metionina

“Specification” = Specifica

Figura 3

“Figure 3. Content of sulfoxide II carbetocin in the antioxidant study samples (constant pH)” = Figura 3. Contenuto di solfossido II carbetocina nei campioni di studio dell'antiossidante (pH costante)

“sulfoxide II carbetocin” = solfossido II carbetocina

“% impurity” = % di impurità

“time (weeks at 40°C)” = tempo (settimane a 40 °C)

“current formulation” = formulazione attuale

“pH 5.2 no additives” = pH 5,2 nessun additivo

“methionine” = metionina

“Specification” = Specifica

TAVOLA 4/5

Figura 4

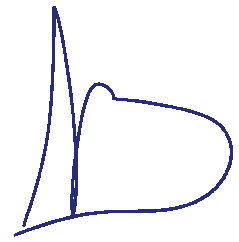
“Figure 4 Individual degradation products at different pH (pH study, constant antioxidation)” = Figura 4 Singoli prodotti di degradazione a pH diverso (studio del pH, antiossidante costante)

“% impurity” = % di impurità

“Sulfoxide *” = Solfossido *

“Unknown” = Sconosciuta

Figura 5



“Figure 5 Sum of degradation products at different pH (pH study, constant antioxidant).” = Figura 5 Somma dei prodotti di degradazione a pH diverso (studio del pH, antiossidante costante).

“Sum of degradation products” = Somma dei prodotti di degradazione

“SUM” = SOMMA

TAVOLA 5/5

Figura 6

“Stability of FE 202767 in Selected Buffers” = Stabilità di FE 202767 in tamponi selezionati

“% Intact Peptide Remaining” = % di peptide intatto rimanente

“Time (days)” = Tempo (giorni)

Figura 7

“Sum of impurities 12 months” = Somma delle impurità 12 mesi

“Sum of impurities %” = Somma delle impurità %

“No additives” = Nessun additivo

“methionine” = metionina

“Spec. limit” = Limite di specifica

*** **

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

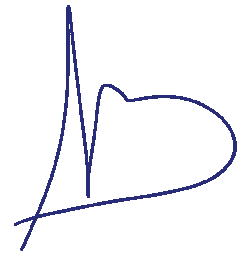
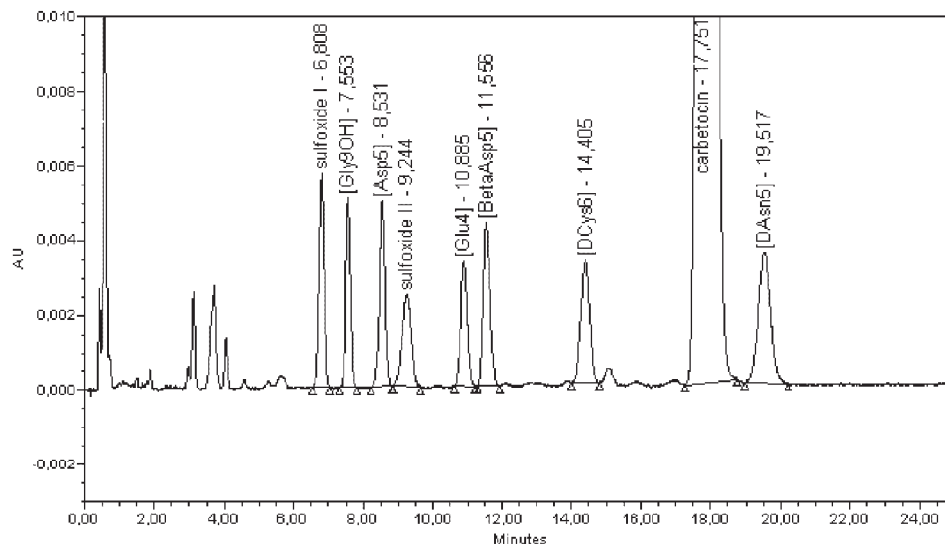


Figure 1. Chromatogram of an impurity mix of carbetocin and degradation products



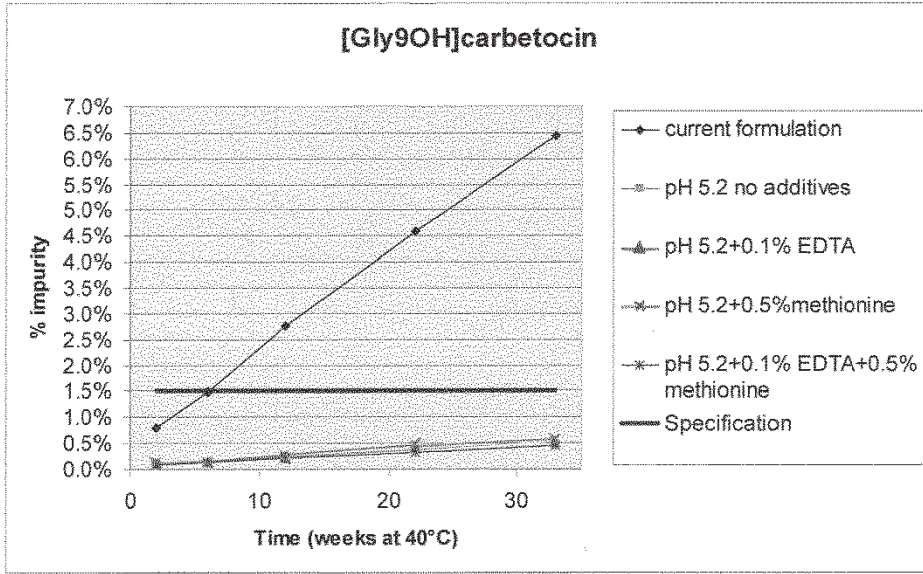
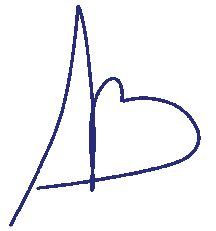


Figure 2. Content of [Gly⁹OH]carbetocin in the antioxidant study samples (constant pH)

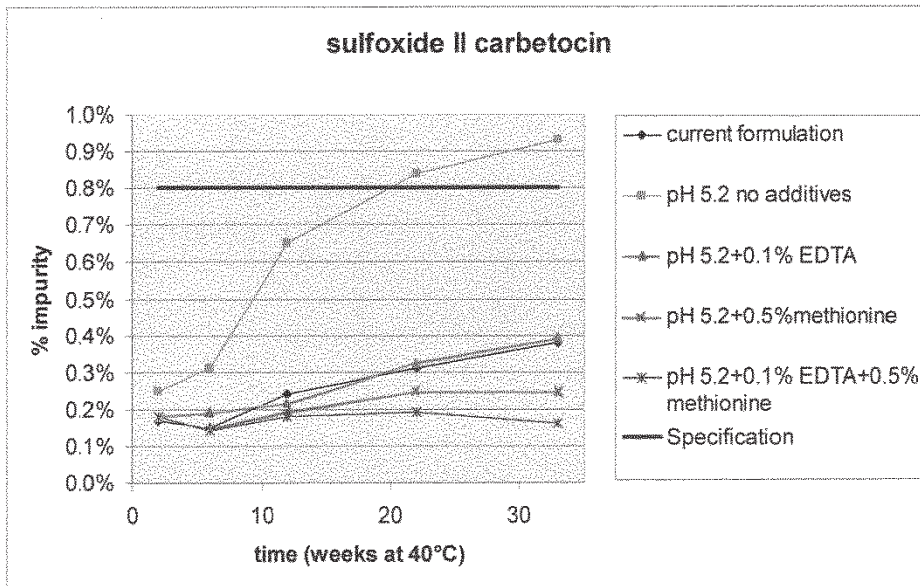


Figure 3. Content of sulfoxide II carbetocin in the antioxidant study samples (constant pH)

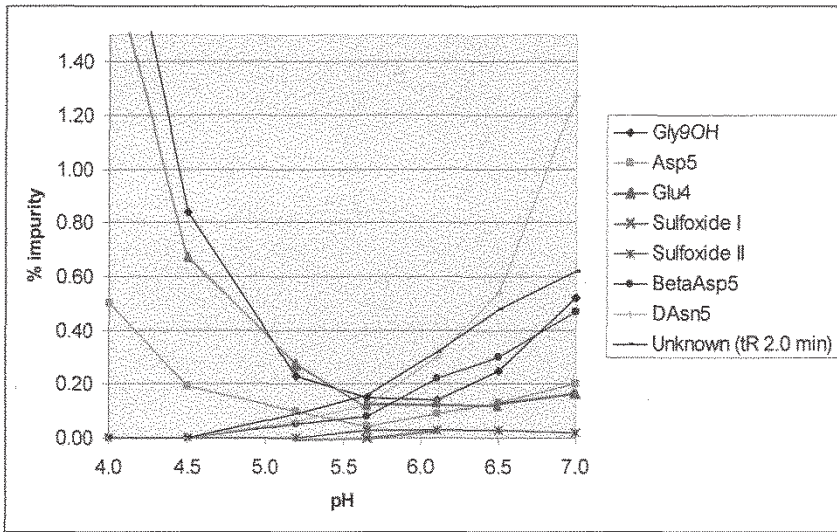


Figure 4 Individual degradation products at different pH (pH study, constant antioxidant)

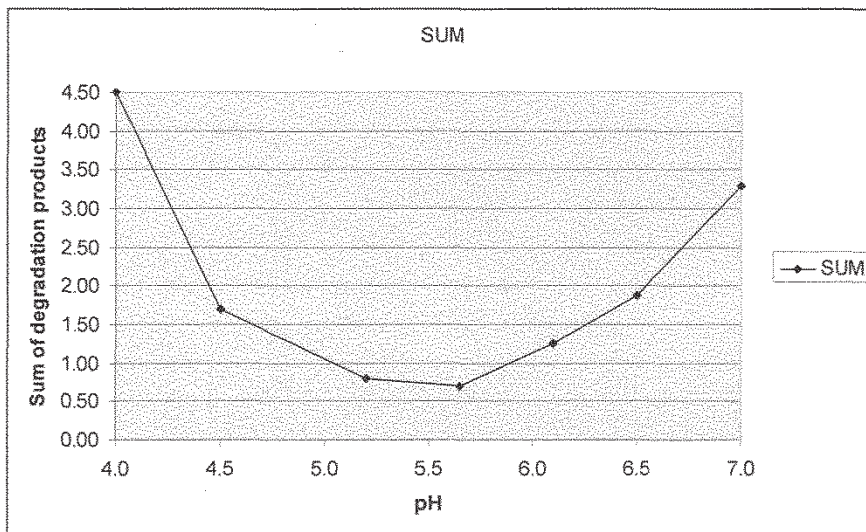


Figure 5 Sum of degradation products at different pH (pH study, constant antioxidant).

Fig 6

Stability of FE 202767 in Selected Buffers

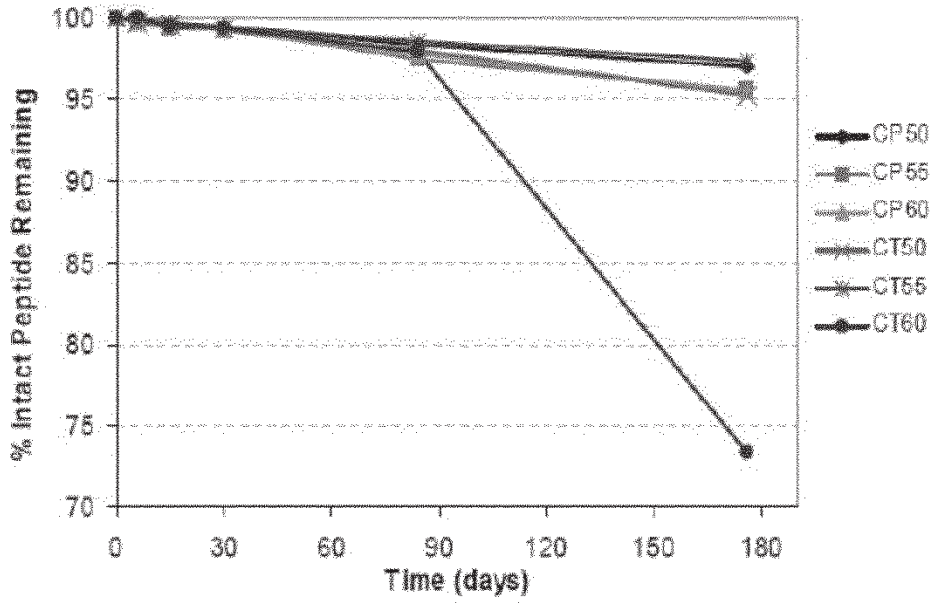


Fig 7

