

EX6626R

Traduzione in lingua italiana del Brevetto Europeo n. 3463308

a nome di:

Servier IP UK Limited

“Formulazioni di ossido di polialchilene-asparaginasi e metodi di produzione e uso delle stesse”

DESCRIZIONE

INTRODUZIONE

La L-asparaginasi è un enzima che idrolizza l'amminoacido L-asparagina tramite una reazione di deaminazione per produrre L-aspartato e ammoniaca. *E. coli* contiene due isoenzimi asparaginasi: L-asparaginasi I e L-asparaginasi II. La L-asparaginasi I è localizzata nel citosol e ha bassa affinità per asparagina. Tuttavia, la L-asparaginasi II è localizzata nel periplasma e ha alta affinità per L-asparagina. La L-asparaginasi II di *E. coli* è un tetramero di subunità identiche. La L-asparaginasi II di *E. coli* è anche nota come L-asparagina ammidoidrolasi, tipo EC-2, EC 3.5.1.1. La L-asparaginasi è nota per avere valore terapeutico nel trattamento della leucemia. La L-asparaginasi è una ammidoidrolasi che catalizza L-asparagina in acido L-aspartico e ammoniaca. Essa svolge un ruolo principale nel metabolismo di L-asparagina in piante, animali e microrganismi. È ora ben consolidato che l'attività terapeutica dell'enzima viene causata mediante l'impoverimento/la rimozione di L-asparagina in circolazione, un nutriente essenziale per la proliferazione e la sopravvivenza di cellule tumorali (leucemiche) che sono compromesse nella capacità di sintesi di L-asparagina, ma non per le cellule normali. La somministrazione di L-asparaginasi a pazienti leucemici induce la morte selettiva delle cellule tumorali idrolizzando L-asparagina, portando al trattamento di tumori maligni.

In alcuni casi, L-asparaginasi, come tale, soffre dei tipici svantaggi di agenti terapeutici proteici, come alta velocità di eliminazione di una proteina estranea da parte del paziente, e il potenziale di indurre una risposta immunitaria in un paziente trattato con questo enzima. Per affrontare questi svantaggi, può venire usato un derivato coniugato a polietilenglicole di L-asparaginasi (PEG-asparaginasi). PEG-asparaginasi può venire prodotto usando L-asparaginasi II estratta da *E. coli* e può essere sostanzialmente non antigenico e può presentare una ridotta velocità di eliminazione dalla circolazione di un paziente.

Una formulazione per iniezione liquida di PEG-asparaginasi (Oncaspar[®]) è stata approvata in passato per la commercializzazione dalla U.S. Food and Drug Administration. Oncaspar[®] è stata approvata come un trattamento di prima linea di pazienti con leucemia linfoblastica acuta (ALL) come un componente di un regime di chemioterapia multi-agente. Inoltre, Oncaspar[®] è stata approvata per il trattamento di pazienti con ALL e

ipersensibilità ad asparaginasi (per esempio forme native di L-asparaginasi).

CN102138909B descrive una iniezione in polvere liofilizzata di asparaginasi e un suo metodo di preparazione. Varshney *et al.* descrivono considerazioni sulla modalità in prodotti biologici e vaccini liofilizzati. Sandeeo *et al.* descrivono il ruolo di eccipienti in forme di dosaggio parenterali. US20160060613A1 descrive L-asparaginasi PEGilata. EP0893439B1 descrive un procedimento per formare un polipeptide modificato comprendente un polipeptide e un ossido di polialchilene. US4179337A descrive polipeptidi non immunogenici. US20150224207A1 descrive derivati polimerici solubili in acqua tiolo-selettivi. US20100143324A1 descrive un metodo per il trattamento di cancro o malattie infiammatorie.

SOMMARIO

Aspetti dell'invenzione comprendono composizioni di ossido di polialchilene-asparaginasi. In alcuni casi, le composizioni comprendono uno o più di un tampone e un sale. In altri aspetti, la composizione è una composizione stabile alla conservazione liofilizzata. In alcuni casi, le composizioni liofilizzate comprendono uno o più di un tampone, un sale e uno zucchero. Aspetti dell'invenzione comprendono inoltre metodi di produzione delle composizioni. Le composizioni trovano uso in una varietà di applicazioni, per esempio nel trattamento di una condizione neoplastica in un soggetto.

L'invenzione fornisce una composizione liofilizzata ricostituita comprendente: ossido di polialchilene-asparaginasi a una concentrazione da 100 fino a 5.000 IU per ml di detta composizione; fosfato di sodio bibasico a una concentrazione dallo 0,1 fino allo 0,8% in peso; fosfato di sodio monobasico a una concentrazione dallo 0,01 fino allo 0,5% in peso; un sale a una concentrazione dallo 0,05 fino all'1% in peso; e uno zucchero a una concentrazione dallo 0,1 fino al 25% in peso, in cui ossido di polialchilene-asparaginasi comprende una asparaginasi legata covalentemente a un gruppo di ossido di polialchilene.

L'invenzione fornisce anche una composizione stabile alla conservazione liofilizzata comprendente: ossido di polialchilene-asparaginasi; un tampone che comprende fosfato di sodio bibasico e fosfato di sodio monobasico; un sale; e uno zucchero, in cui la composizione stabile alla conservazione liofilizzata è in grado di formare la composizione descritta nel paragrafo precedente ricostituendo la composizione stabile alla conservazione

liofilizzata con acqua per iniezione (WFI).

L'invenzione fornisce inoltre un metodo di produzione di una composizione di ossido di polialchilene-asparaginasi liofilizzata, in cui il metodo comprende la liofilizzazione di una composizione concentrata acquosa comprendente: (i) ossido di polialchilene-asparaginasi comprendente un gruppo di ossido di polialchilene legato covalentemente mediante un legante a una asparaginasi; (ii) un tampone, che comprende fosfato di sodio bibasico e fosfato di sodio monobasico; (iii) un sale; e (iv) uno zucchero in un modo sufficiente per produrre una composizione di ossido di polialchilene-asparaginasi stabile alla conservazione liofilizzata secondo l'invenzione, opzionalmente in cui il metodo comprende inoltre l'introduzione di una composizione concentrata acquosa in un contenitore di dosaggio unitario e la liofilizzazione della composizione concentrata acquosa nel contenitore di dosaggio unitario, opzionalmente in cui il contenitore di dosaggio unitario è una fiala, come una fiala in vetro sigillata.

L'invenzione fornisce anche una composizione secondo l'invenzione per l'uso in un metodo di trattamento di un soggetto per una condizione neoplastica.

L'invenzione fornisce anche inoltre un kit comprendente uno o più contenitori di dosaggio unitario, ciascuno contenente una composizione stabile alla conservazione liofilizzata secondo l'invenzione.

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

La FIGURA 1 mostra un diagramma di flusso del procedimento per un metodo di produzione di una composizione stabile alla conservazione liofilizzata secondo realizzazioni della presente descrizione.

La FIGURA 2 mostra un grafico della purezza (%) rispetto al tempo (settimane) a 40°C per una composizione stabile alla conservazione liofilizzata secondo realizzazioni della presente descrizione.

La FIGURA 3 mostra un grafico della potenza (IU/ml) rispetto al tempo (settimane) a 40°C per una composizione stabile alla conservazione liofilizzata secondo realizzazioni della presente descrizione.

La FIGURA 4 mostra un grafico della purezza (%) rispetto al tempo (settimane) a 25°C per una composizione stabile alla conservazione liofilizzata secondo realizzazioni della presente descrizione.

La FIGURA 5 mostra un grafico della potenza (IU/ml) rispetto al tempo (settimane) a 25°C per una composizione stabile alla conservazione liofilizzata secondo realizzazioni della presente descrizione.

La FIGURA 6 mostra un diagramma di flusso del procedimento di un metodo di produzione di una composizione stabile alla conservazione liofilizzata secondo realizzazioni della presente descrizione. Sono mostrate la formulazione finale e fasi di filtrazione.

La FIGURA 7 mostra un diagramma di flusso del procedimento di un metodo di produzione di una composizione stabile alla conservazione liofilizzata secondo realizzazioni della presente descrizione. Sono mostrate fasi di riempimento asettico e liofilizzazione.

La FIGURA 8 mostra un grafico della purezza mediante GF-HPLC (%) rispetto al tempo (mesi) per una composizione liofilizzata conservata a 2-8°C (per esempio 5°C), secondo realizzazioni della presente descrizione.

La FIGURA 9 mostra un grafico della potenza (attività) (IU/ml) rispetto al tempo (mesi) per una composizione liofilizzata conservata a 2-8°C (per esempio 5°C), secondo realizzazioni della presente descrizione.

La FIGURA 10 mostra un grafico di aggregati totali mediante GF-HPLC rispetto al tempo (mesi) per una composizione liofilizzata conservata a 2-8°C (per esempio 5°C), secondo realizzazioni della presente descrizione.

La FIGURA 11 mostra un grafico della purezza mediante GF-HPLC (%) rispetto al tempo (mesi) per una composizione liofilizzata conservata in condizioni accelerate ($25 \pm 3^\circ\text{C}$; umidità relativa $60\% \pm 5\%$), secondo realizzazioni della presente descrizione.

La FIGURA 12 mostra un grafico della potenza (attività) (IU/ml) rispetto al tempo (mesi) per una composizione liofilizzata conservata in condizioni accelerate ($25 \pm 3^\circ\text{C}$; umidità relativa $60\% \pm 5\%$), secondo realizzazioni della presente descrizione.

La FIGURA 13 mostra un grafico di aggregati totali mediante GF-HPLC rispetto al tempo (mesi) per una composizione liofilizzata conservata in condizioni accelerate ($25 \pm 3^\circ\text{C}$; umidità relativa $60\% \pm 5\%$), secondo realizzazioni della presente descrizione.

La FIGURA 14 mostra un grafico della purezza mediante GF-HPLC (%) rispetto al tempo (mesi) per una composizione liofilizzata conservata in condizioni di stress termico ($40 \pm 2^\circ\text{C}$; umidità relativa $75\% \pm 5\%$), secondo realizzazioni della presente descrizione.

La FIGURA 15 mostra un grafico della potenza (attività) (IU/ml) rispetto al tempo (mesi) per una composizione

liofilizzata conservata in condizioni di stress termico ($40 \pm 2^\circ\text{C}$; umidità relativa $75\% \pm 5\%$), secondo realizzazioni della presente descrizione.

La FIGURA 16 mostra un grafico di aggregati totali mediante GF-HPLC rispetto al tempo (mesi) per una composizione liofilizzata conservata in condizioni di stress termico ($40 \pm 2^\circ\text{C}$; umidità relativa $75\% \pm 5\%$), secondo realizzazioni della presente descrizione.

DEFINIZIONI

Nella descrizione delle realizzazioni della presente descrizione, possono venire impiegati i termini seguenti, e sono destinati a essere definiti come indicato in seguito.

Con “sostanzialmente purificata” si intende l’isolamento di una sostanza affinché la sostanza formi la maggior parte del campione in cui si trova. Per esempio, un campione che è sostanzialmente purificato contiene il 50% o più della sostanza di interesse, come il 60% o più della sostanza di interesse, come il 75% o più della sostanza di interesse, come il 90% o più della sostanza di interesse, come il 95% o più della sostanza di interesse, compreso il 99% o più della sostanza di interesse. Qualsiasi protocollo conveniente può venire impiegato per purificare la sostanza di interesse e comprende filtrazione (per esempio diafiltrazione, ultrafiltrazione, ecc.), precipitazione selettiva, cristallizzazione, cromatografia a scambio ionico, cromatografia per affinità e sedimentazione a seconda della densità.

Con “isolato” si intende descrivere un composto di interesse che è in un ambiente diverso da quello in cui il composto è presente in natura. “Isolato” è destinato a comprendere composti che sono entro campioni che sono sostanzialmente arricchiti in composto di interesse e/o in cui il composto di interesse è parzialmente o sostanzialmente purificato.

I termini “paziente” e “soggetto” vengono usati in modo intercambiabile e vengono usati nel loro senso convenzionale per riferirsi a un organismo vivente affetto da o passibile di una condizione che può venire prevenuta o trattata somministrando una composizione della presente descrizione, e comprendono uomini e animali non umani. Esempi di soggetti comprendono uomini, scimpanzé e altre scimmie antropomorfe e specie di scimmia; animali da fattoria come bestiame, pecore, maiali, capre e cavalli; mammiferi domestici come cani e gatti; animali

da laboratorio comprendenti roditori come topi, ratti e cavie; uccelli comprendenti uccelli domestici, selvatici e galliformi come polli, tacchini e altri uccelli gallinacei, anatre e oche. Il termine non indica una età particolare. Quindi, sono di interesse individui adulti, giovani e neonati.

“Quantità farmaceuticamente efficace” e “quantità terapeuticamente efficace” si riferiscono a una quantità di un composto o una composizione sufficiente per trattare una malattia o un disturbo specificato o uno o più dei loro sintomi e/o per prevenire la comparsa della malattia o del disturbo. Con riferimento a condizioni neoplastiche, una quantità farmaceuticamente o terapeuticamente efficace comprende una quantità sufficiente per, fra le altre cose, causare diminuzione della quantità e/o della comparsa del cancro in un soggetto, e/o diminuire la velocità di crescita del cancro.

Il termine “trattare” o “trattamento” quando usato in questa sede indica il trattare o il trattamento di una condizione di malattia o medicale in un paziente, come un mammifero (per esempio un uomo) che comprende: (a) prevenire la comparsa della condizione di malattia o medicale come trattamento profilattico di un soggetto; (b) migliorare la condizione di malattia o medicale, come eliminare o causare regressione della condizione di malattia o medicale in un paziente; (c) sopprimere la condizione di malattia o medicale, per esempio rallentando o arrestando lo sviluppo della condizione di malattia o medicale in un paziente; o (d) alleviare un sintomo della condizione di malattia o medicale in un paziente.

L’espressione “condizioni fisiologiche” intende comprendere quelle condizioni compatibili con cellule viventi, per esempio condizioni predominantemente acquose di temperatura, pH, salinità, ecc. che sono compatibili con cellule viventi.

Se non definiti diversamente, tutti i termini tecnici e scientifici usati in questa sede hanno lo stesso significato comunemente noto a una persona di ordinaria esperienza nella tecnica alla quale appartiene la presente invenzione. Quando viene fornito un intervallo di valori, si comprenderà che ciascun valore intermedio, al decimo dell’unità del limite inferiore a meno che il contesto indichi chiaramente in modo diverso, fra il limite superiore e inferiore di quell’intervallo e qualsiasi altro valore indicato o intermedio nell’intervallo indicato, è compreso entro le realizzazioni della presente descrizione. I limiti superiore e inferiore di questi intervalli più piccoli possono venire

indipendentemente inclusi negli intervalli più piccoli e sono anche compresi entro le realizzazioni della presente descrizione, ad eccezione di qualsiasi limite specificamente escluso nell'intervallo indicato. Quando l'intervallo indicato comprende uno dei o entrambi i limiti, sono anche inclusi intervalli che escludono uno o entrambi di questi limiti inclusi. Certi intervalli vengono presentati in questa sede con valori numerici preceduti dal termine "circa". Il termine "circa" viene usato in questa sede per fornire supporto letterale per il numero esatto che precede, nonché un numero che è vicino al o approssimativamente il numero che il termine precede. Nel determinare se un numero è vicino al o approssimativamente un numero specificamente indicato, il numero non indicato vicino o approssimato può essere un numero che, nel contesto in cui viene presentato, fornisce un equivalente sostanziale del numero specificamente indicato.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA

Aspetti dell'invenzione comprendono composizioni di ossido di polialchilene-asparaginasi. Le composizioni comprendono uno o più di un tampone e un sale. Aspetti dell'invenzione comprendono inoltre metodi di produzione delle composizioni. Le composizioni trovano uso in una varietà di applicazioni, per esempio nel trattamento di una condizione neoplastica in un soggetto.

Aspetti dell'invenzione comprendono composizioni di ossido di polialchilene-asparaginasi stabili alla conservazione liofilizzate. Nell'invenzione rivendicata, le composizioni liofilizzate comprendono uno o più di un tampone, un sale e uno zucchero. Aspetti dell'invenzione comprendono inoltre metodi di produzione delle composizioni. Le composizioni trovano uso in una varietà di applicazioni, per esempio nel trattamento di una condizione neoplastica (per esempio leucemia mieloide acuta (AML)) in un soggetto.

Aspetti dell'invenzione comprendono composizioni dell'invenzione per l'uso in un metodo di trattamento di un soggetto per AML. I metodi comprendono la somministrazione al soggetto di un dosaggio di ossido di polialchilene-asparaginasi efficace per trattare il soggetto per AML. Aspetti dell'invenzione comprendono inoltre composizioni contenenti ossido di polialchilene-asparaginasi e kit che possono venire usati nei metodi in oggetto. Nell'ulteriore descrizione delle realizzazioni della presente descrizione, composizioni (per esempio liquide e liofilizzate) vengono dapprima descritte in ulteriore dettaglio. In seguito, vengono anche descritti metodi di

oggetto può essere una asparaginasi di E. coli. In alcuni casi, l'asparaginasi viene espressa mediante E. coli. L'asparaginasi può venire recuperata e purificata da un terreno di coltura contenente il E. coli che esprime l'asparaginasi. Oltre ad asparaginasi di tipo selvatico, l'asparaginasi può anche essere una che è una asparaginasi non naturale e/o asparaginasi prodotta sinteticamente e/o un frammento attivo di una asparaginasi naturale e/o sintetica. Esempi di asparaginasi che possono venire impiegate in realizzazioni dell'invenzione comprendono quelle descritte in: 9,322,008; 9,127,266; 9,051,561; 8,617,868; 7,807,436; 6,991,788; 6,537,547; 6,436,396; 6,368,845; 6,274,367; 6,251,388; 6,165,735; 6,140,101; 6,087,151; 6,042,825; 5,854,051; 5,310,670; 4,729,957 e 4,617,271.

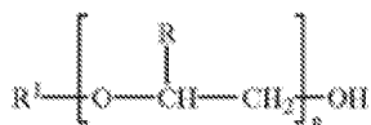
Come suddescritto, l'asparaginasi nella composizione di ossido di polialchilene-asparaginasi è una asparaginasi legata covalentemente a uno o più gruppi di ossido di polialchilene. Per esempio, l'asparaginasi può comprendere uno o più gruppi di ossido di polialchilene legati covalentemente all'asparaginasi tramite un procedimento di modifica post-traslazionale. Ossido di polialchilene-asparaginasi può comprendere uno o più gruppi di ossido di polialchilene legati covalentemente all'asparaginasi in una o più posizioni sull'asparaginasi. Per esempio, un gruppo di ossido di polialchilene può essere legato covalentemente a un residuo amminoacidico dell'asparaginasi. In alcuni casi, il gruppo di ossido di polialchilene è legato covalentemente a un gruppo amminico di un residuo amminoacidico dell'asparaginasi. In alcune realizzazioni, il gruppo di ossido di polialchilene è legato covalentemente a una catena laterale dell'amminoacido dell'amminoacido N terminale nell'asparaginasi. In alcune realizzazioni, il gruppo di ossido di polialchilene è legato covalentemente a un gruppo epsilon-amminico di lisina (K) nell'asparaginasi. In alcune realizzazioni, il gruppo di ossido di polialchilene è legato covalentemente a una catena laterale dell'amminoacido dell'amminoacido N terminale e a un gruppo epsilon-amminico di lisina (K) nell'asparaginasi. In alcuni casi, ossido di polialchilene-asparaginasi è sostanzialmente non antigenico. Con "non antigenico" o "sostanzialmente non antigenico" si intende una composizione che non suscita una risposta immunitaria significativa in un soggetto quando la composizione viene somministrata al soggetto. In alcuni casi, ossido di polialchilene-asparaginasi ha una velocità di eliminazione ridotta dalla circolazione di un soggetto rispetto a una asparaginasi non modificata. Per esempio, la semi-vita di eliminazione di ossido di polialchilene-

asparaginasi può essere un giorno o più, come 2 giorni o più, o 3 giorni o più, o 4 giorni o più, o 5 giorni o più, o 6 giorni o più, o 7 giorni o più, o 8 giorni o più, o 9 giorni o più, o 10 giorni o più, o 11 giorni o più, o 12 giorni o più, o 13 giorni o più, o 14 giorni o più, o 15 giorni o più, o 16 giorni o più, o 17 giorni o più, o 18 giorni o più, o 19 giorni o più, o 20 giorni o più. In alcune realizzazioni, la semi-vita di eliminazione di ossido di polialchilene-asparaginasi è 3 giorni o più. In alcune realizzazioni, la semi-vita di eliminazione di ossido di polialchilene-asparaginasi è 5 giorni o più.

Il gruppo di ossido di polialchilene che è legato all'asparaginasi può essere qualsiasi gruppo di ossido di polialchilene fisiologicamente compatibile. I poli(ossido di alchilene) (PAO), che sono anche noti come poliossalchilene (POA), vengono prodotti mediante la polimerizzazione di ossidi di alchilene (per esempio ossido di etilene, ossido di propilene, ossido di butilene). Un omopolimero è formato solo da un tipo di ossido di alchilene mentre un copolimero è formato da due o più ossidi di alchilene diversi, noti come copolimeri di ossido di alchilene (AOC). Esempi dei primi sono poli(ossido di etilene) (PEO), che è un polimero di ossido di etilene (EO), e poli(ossido di propilene) (PPO), che è un polimero di ossido di propilene (PO). Poli(ossido di etilene) è anche comunemente noto come polietilenglicole (PEG) o poliossietilene (POE). Il peso molecolare di tali polimeri viene generalmente caratterizzato come la media di una distribuzione di lunghezze (o unità ripetute). Oltre alle forme lineari standard, forme ramificate o a stella di poli(ossidi di alchilene) vengono prodotte iniziando la reazione di polimerizzazione con un iniziatore polifunzionale con più gruppi ossidrilici, amminici o tiolici, ciascuno dei quali può servire come un punto di partenza per la crescita della catena di polimero. Per esempio, l'uso di glicerolo (tre gruppi ossidrilici) come un iniziatore porta a un polimero ramificato a tre bracci, mentre pentaeritritolo porta a un polimero a quattro bracci. Convenzionalmente, polimeri di questo tipo con 3 fino a 10 bracci vengono denominati "ramificati", mentre quelli con più di 10 bracci vengono denominati polimeri a "stella". I copolimeri a "pettine" sono simili alle forme ramificate e a stella, ma l'iniziatore per copolimeri a pettine è un polimero polifunzionale con più gruppi ossidrilici, amminici o tiolici distanziati lungo lo scheletro dell'iniziatore, ciascuno dei quali può servire come un punto di partenza per la crescita della catena di polimero. I copolimeri a "innesto" vengono prodotti mediante l'aggiunta di catene di polimero pendenti lungo uno scheletro del polimero che possiede legami C=C

insaturi o gruppi funzionali pendenti (per esempio ossidrilici) dai quali catene pendenti possono venire aggiunte usando una catena di polimero monofunzionale reattivo. Tutti i poli(ossidi di alchilene) contengono, oltre a unità ripetute derivate da ossido di alchilene multiple, un singolo residuo corrispondente alla molecola usata per iniziare la sintesi del polimero. Per polimeri lineari, questo può essere un alchilenglicole corrispondente all'ossido di alchilene usato per la sintesi (per esempio, rispettivamente, etilenglicole e ossido di etilene), e quindi il residuo derivato dall'iniziatore sarà indistinguibile dalle altre unità ripetute nella catena di polimero. Tuttavia, molecole piccole diverse da alchilenglicoli vengono spesso usate come iniziatori, esempi comprendono metanolo o N-butanolo (per polimeri lineari) e trimetilolpropano, glicerolo e pentaeritritolo (per polimeri ramificati) o etilendiammina. La massa di iniziatore rispetto alla massa della catena di polimero finale è generalmente molto piccola e può usualmente venire trascurata. Quindi, il termine poli(ossido di alchilene) viene usato in questa sede nel suo senso ordinario, e comprende sia poli(ossidi di alchilene) iniziati con una molecola di alchilenglicole che poli(ossidi di alchilene) iniziati con un'altra molecola piccola.

In certe realizzazioni, un gruppo di ossido di polialchilene fisiologicamente compatibile è sostanzialmente stabile in condizioni compatibili con cellule viventi, per esempio condizioni predominantemente acquose di temperatura, pH, salinità, ecc., che sono compatibili con cellule viventi. In certe realizzazioni, un gruppo di ossido di polialchilene è solubile in acqua. L'espressione "polimero solubile in acqua" si riferisce a un gruppo di ossido di polialchilene che è sostanzialmente solubile in acqua, come in condizioni acquose che si trovano nel corpo di un soggetto. Gruppi di ossido di polialchilene di interesse comprendono polialchilenglicoli a catena lineare. Polialchilenglicoli a catena lineare impiegati in certe realizzazioni dell'invenzione hanno la seguente formula di struttura:



in cui R viene scelto nel gruppo consistente in idrogeno, alchile inferiore e loro miscele, R¹ viene scelto nel gruppo consistente in idrogeno e alchile inferiore, e n è un numero intero positivo. Con "alchile inferiore" si intende un gruppo alchile avente da uno fino a quattro atomi di carbonio, cioè metile, etile, propile, butile e isomeri del

precedente. R può venire scelto nel gruppo consistente in idrogeno, metile e loro miscele, R1 può venire scelto nel gruppo consistente in idrogeno e metile, e n può essere un numero intero positivo scelto per fornire la dimensione polimerica desiderata. In alcuni casi, i poli(alchilenglicoli) impiegati in realizzazioni dell'invenzione sono poli(etilenglicole), poli(propilenglicole), loro miscele e copolimeri di poli(etilenglicole) e poli(propilenglicole), in cui uno dei gruppi ossidrilici terminali del polimero può essere sostituito con un gruppo alchile inferiore ok.

In alcune realizzazioni, l'ossido di polialchilene è un polietilenglicole (PEG). In certe realizzazioni, il polietilenglicole (PEG) ha un peso molecolare da 1.000 fino a 20.000 dalton. In certe realizzazioni, il PEG ha un peso molecolare da 1.000 fino a 20.000 dalton, o da 1.000 fino a 19.000 dalton, o da 1.000 fino a 18.000 dalton, o da 1.000 fino a 17.000 dalton, o da 1.000 fino a 16.000 dalton, o da 1.000 fino a 15.000 dalton, o da 1.000 fino a 14.000 dalton, o da 1.000 fino a 13.000 dalton, o da 1.000 fino a 12.000 dalton, o da 1.000 fino a 11.000, o da 1.000 fino a 10.000, o da 1.500 fino a 10.000 dalton, o da 2.000 fino a 10.000 dalton, o da 2.000 fino a 9.000 dalton, o da 2.000 fino a 8.000 dalton, o da 2.000 fino a 7.000 dalton, o da 2.000 fino a 6.000 dalton, o da 3.000 fino a 6.000 dalton o da 4.000 fino a 6.000 dalton, o da 4.500 fino a 5.500 dalton. In certe realizzazioni, il PEG ha un peso molecolare da 2.000 fino a 10.000 dalton. In certe realizzazioni, il PEG ha un peso molecolare da 4.000 fino a 6.000 dalton. In certe realizzazioni, il PEG ha un peso molecolare di 5.000 dalton. In alcuni casi, il polietilenglicole è metossipolietilenglicole (per esempio monometossipolietilenglicole, o "mPEG").

Come suddescritto, il gruppo di ossido di polialchilene può essere attaccato covalentemente all'asparaginasi.

In alcuni casi, il gruppo di ossido di polialchilene è legato covalentemente mediante un legante all'asparaginasi.

Come tale, il gruppo di ossido di polialchilene può essere attaccato covalentemente all'asparaginasi tramite il legante. Il legante può essere qualsiasi gruppo funzionale conveniente che permette l'attacco del gruppo di ossido di polialchilene all'asparaginasi. Per esempio, il legante può comprendere un gruppo funzionale reattivo che fornisce un legame covalente fra il gruppo di ossido di polietilene e l'asparaginasi. In alcuni casi, il legante comprende un gruppo funzionale reattivo che fornisce un legame covalente fra il gruppo di ossido di polietilene e un residuo amminoacidico dell'asparaginasi. Per esempio, il legante può comprendere un gruppo funzionale reattivo che fornisce un legame covalente fra il gruppo di ossido di polialchilene e un gruppo amminico di un

residuo amminoacidico dell'asparaginasi. Esempi di tali gruppi funzionali reattivi comprendono p-nitrofenossi, tiazolidiniltione, N-idrossisuccinimidile o altri gruppi funzionali reattivi adatti come N-idrossibenzotriazolile, alogeno, N-idrossifitalimidile, imidazolile, O-aciluree, pentafluorofenolo o 2,4,6-triclorofenolo. In alcuni casi, il gruppo funzionale reattivo del legante è N-idrossisuccinimidile. Per conseguenza, dopo attacco covalente del gruppo di ossido di polialchilene all'asparaginasi, il legante può comprendere gruppi funzionali, come un legante di uretano (anche noto come un legante di carbammato), un legante di succinato.

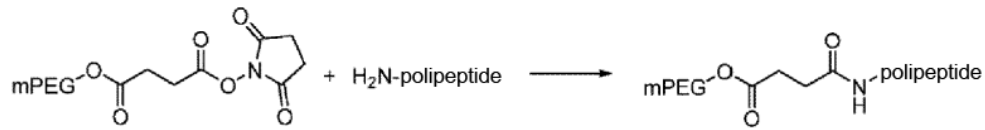
In certe realizzazioni, il legante comprende un legante di uretano (anche noto come un legante di carbammato). Per esempio, una reazione per l'attacco di metossipolietilenglicole (mPEG) a un gruppo amminico di un amminoacido di un polipeptide (per esempio asparaginasi) tramite un legante di uretano (carbammato) è mostrata in seguito.



Nella reazione mostrata in precedenza, metossipolietilenglicole succinimidilcarbonato (anche indicato come SC-PEG) viene fatto reagire con un gruppo amminico di un amminoacido di un polipeptide (per esempio asparaginasi) per produrre polietilenglicole-asparaginasi con un legante di uretano (carbammato). SC-PEG-asparaginasi è anche descritto in Angiolillo, AL., et al., "Pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamics (PD) properties of SC-PEG *E. coli* 1-asparaginase (EZN-2285) in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL): Results from Children's Oncology Group (COG) study AALL07P4", 2012 American Society of Clinical Oncology (ASCO) Meeting annuale, Poster 9543; e Angiolillo, AL., et al., "Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Calaspargase Pegol *Escherichia coli* L-Asparaginase in the Treatment of Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia: Results From Children's Oncology Group Study AALL07P4", *J Clin. Oncology*, 32(34), 2014, 3874-3882.

In certe realizzazioni, il legante comprende un legante di succinato (anche indicato come legante di succinile). Per esempio, una reazione per l'attacco di metossipolietilenglicole (mPEG) a un gruppo amminico di un amminoacido

di un polipeptide (per esempio asparaginasi) tramite un legante di succinato è mostrata in seguito.



Nella reazione mostrata in precedenza, metossipoliethylenglicole succinimidilsuccinato (anche indicato come SS-PEG) viene fatto reagire con un gruppo amminico di un amminoacido di un polipeptide (per esempio asparaginasi) per produrre polietilenglicole-asparaginasi con un legante di succinato. SS-PEG-asparaginasi è anche descritto nei brevetti U.S. n. 5.122.614; 5.324.844; e 5.612.460.

In certi casi, la composizione che contiene ossido di polialchilene-asparaginasi è una composizione disidratata. Quando usata in questa sede, una composizione disidratata è una composizione che comprende acqua in una bassa quantità, come 25% o meno, o 20% o meno, o 15% o meno, o 10% o meno, o 9% o meno, o 8% o meno, o 7% o meno, o 6% o meno, o 5% o meno, o 4% o meno, o 3% o meno, o 2% o meno, o 1% o meno di acqua quando misurata mediante titolazione di Karl Fischer (KF). In alcuni casi, una composizione disidratata ha il 3% o meno di acqua quando misurata mediante titolazione di Karl Fischer. In alcuni casi, una composizione disidratata ha l'1% o meno di acqua quando misurata mediante titolazione di Karl Fischer. In alcuni casi, una composizione disidratata ha lo 0,5% o meno di acqua quando misurata mediante titolazione di Karl Fischer. Qualsiasi protocollo conveniente può venire usato per produrre una composizione disidratata, come aumento della temperatura della composizione (per esempio riscaldamento), riduzione della pressione, liofilizzazione (anche nota come congelamento-essiccamento), e loro combinazioni.

Nell'invenzione rivendicata, la liofilizzazione viene usata per produrre una composizione disidratata, e quindi la composizione (per esempio la composizione che contiene ossido di polialchilene-asparaginasi) è una composizione liofilizzata. In alcuni casi, una composizione liofilizzata è una composizione in cui acqua è stata rimossa dalla composizione mediante sublimazione, in cui l'acqua nella composizione subisce una transizione di fase da un solido a un gas. Per esempio, una composizione liofilizzata può essere una composizione in cui acqua è stata rimossa dalla composizione congelando la composizione (per esempio congelando l'acqua nella composizione) e quindi riducendo la pressione che circonda la composizione per cui l'acqua nella composizione subisce

sublimazione. Come suddescritto, una composizione liofilizzata può comprendere acqua in una bassa quantità, come 25% o meno, o 20% o meno, o 15% o meno, o 10% o meno, o 9% o meno, o 8% o meno, o 7% o meno, o 6% o meno, o 5% o meno, o 4% o meno, o 3% o meno, o 2% o meno, o 1% o meno, o 0,5% o meno, o 0,25% o meno, o 0,1% o meno di acqua quando misurata mediante titolazione di Karl Fischer (KF). In certe realizzazioni, la composizione liofilizzata può comprendere acqua in una bassa quantità, come fra circa lo 0,1% e circa il 25%, o circa lo 0,25% e circa il 20%, o circa lo 0,5% e circa il 15%, o circa l'1% e circa il 10%, o circa il 2% e circa il 9%, o circa il 3% e circa l'8%, o circa il 4% e circa il 7%, o circa il 5% e circa il 6% quando misurata mediante titolazione di Karl Fischer (KF). In certe realizzazioni, la composizione liofilizzata può comprendere acqua in una bassa quantità, come fra circa lo 0,1% e circa il 5%, o circa lo 0,25% e circa il 4%, o circa lo 0,5% e circa il 3%, o circa l'1% e circa il 2% quando misurata mediante titolazione di Karl Fischer (KF). In alcuni casi, una composizione liofilizzata ha il 3% o meno di acqua quando misurata mediante titolazione di Karl Fischer. In alcuni casi, una composizione liofilizzata ha l'1% o meno di acqua quando misurata mediante titolazione di Karl Fischer. In alcuni casi, una composizione liofilizzata ha lo 0,5% o meno di acqua quando misurata mediante titolazione di Karl Fischer.

Per effetto del basso contenuto di acqua di una composizione liofilizzata come suddescritto, la composizione liofilizzata può essere nella forma di un solido. In alcuni casi, la composizione liofilizzata solida è una polvere. In alcuni casi, una composizione liofilizzata può facilitare la conservazione della composizione per un periodo di tempo prolungato (per esempio rispetto a una formulazione liquida della stessa composizione). Per esempio, una composizione liofilizzata può essere una composizione stabile alla conservazione (per esempio una composizione stabile alla conservazione liofilizzata), in cui la composizione è sostanzialmente stabile per un periodo di tempo prolungato. Con “stabile” o “stabile alla conservazione” o “sostanzialmente stabile” si intende una composizione che non si degrada e/o perde attività significativamente per un periodo di tempo prolungato. Per esempio, una composizione stabile alla conservazione può non avere impurità significative per effetto della degradazione della composizione per un periodo di tempo prolungato, come 10% o meno di impurità, o 9% o meno, o 8% o meno, o 7% o meno, o 6% o meno, o 5% o meno, o 4% o meno, o 3% o meno, o 2% o meno, o 1% o meno di prodotti di

degradazione per un periodo di tempo prolungato. In certe realizzazioni, una composizione stabile alla conservazione può avere fra circa l'1% e circa il 10%, o circa il 2% e circa il 9%, o circa il 3% e circa l'8%, o circa il 4% e circa il 7%, o circa il 6% e circa il 5% o meno di prodotti di degradazione per un periodo di tempo prolungato. In certi casi, una composizione stabile alla conservazione ha il 5% o meno di impurità per un periodo di tempo prolungato. In alcuni casi, una composizione stabile alla conservazione mantiene sostanzialmente la sua attività per un periodo di tempo prolungato, ad esempio mantiene il 100% della sua attività, o il 99% o più, o il 98% o più, o il 97% o più, o il 96% o più, o il 95% o più, o il 94% o più, o il 93% o più, o il 92% o più, o il 91% o più, o il 90% o più, o l'85% o più, o l'80% o più, o il 75% o più della sua attività per un periodo di tempo prolungato. In alcune realizzazioni, una composizione stabile alla conservazione mantiene sostanzialmente la sua attività per un periodo di tempo prolungato, come fra circa il 75% e circa il 100%, o circa l'80% e circa il 99%, o circa l'85% e circa il 98%, o circa il 90% e circa il 97%, o circa il 91% e circa il 96%, o circa il 92% e circa il 95%, o circa il 93% e circa il 94% o più della sua attività per un periodo di tempo prolungato. Per esempio, una composizione stabile alla conservazione può mantenere il 90% o più della sua attività per un periodo di tempo prolungato. In alcuni casi, una composizione stabile alla conservazione mantiene il 95% o più della sua attività per un periodo di tempo prolungato. Un periodo di tempo prolungato è un periodo di tempo come una settimana o più, o 2 settimane o più, o 3 settimane o più, o un mese o più, o 2 mesi o più, o 3 mesi o più, o 4 mesi o più, o 6 mesi o più, o 9 mesi o più, o un anno o più, o 1,5 anni (per esempio 18 mesi) o più, o 2 anni o più, o 2,5 anni (per esempio 30 mesi) o più, o 3 anni o più, o 3,5 anni (per esempio 42 mesi) o più, o 4 anni o più, o 4,5 anni (per esempio 54 mesi) o più, o 5 anni o più. Per esempio, un periodo di tempo prolungato può essere 6 mesi o più. In alcuni casi, un periodo di tempo prolungato è 9 mesi o più. In alcuni casi, un periodo di tempo prolungato è un anno (per esempio 12 mesi) o più. In alcuni casi, un periodo di tempo prolungato è 1,5 anni (per esempio 18 mesi) o più. In alcuni casi, un periodo di tempo prolungato è 2 anni (per esempio 24 mesi) o più. In alcune realizzazioni, un periodo di tempo prolungato può essere fra circa una settimana e circa 3 settimane, o circa un mese e circa 6 mesi, o circa 6 mesi e circa 9 mesi, o circa un anno e circa 1,5 anni, o circa un anno e circa 2 anni, o circa un anno e circa 3 anni, o circa un anno e circa 4 anni, o circa un anno e circa 5 anni. In alcune realizzazioni, una

composizione stabile alla conservazione è sostanzialmente stabile per un periodo di tempo prolungato a temperatura ambiente, come una temperatura da 20 fino a 40°C, o da 25 fino a 35°C, o da 25 fino a 30°C. In alcuni casi, una composizione stabile alla conservazione è sostanzialmente stabile per un periodo di tempo prolungato a una temperatura minore della temperatura ambiente, come una temperatura da 0 fino a 20°C, o da 0 fino a 15°C, o da 0 fino a 10°C, o da 2 fino a 8°C.

In alcuni casi, la composizione comprende una quantità terapeuticamente efficace di ossido di polialchilene-asparaginasi. L'attività enzimatica di ossido di polialchilene-asparaginasi può venire misurata in Unità Internazionali (IU), che corrispondono alla quantità di enzima richiesta per generare 1 μ mole di ammoniaca per minuto a un pH di 7,3 e una temperatura di 37°C. In alcuni casi, ossido di polialchilene-asparaginasi può essere presente nella composizione in una quantità (per esempio ossido di polialchilene-asparaginasi può avere una potenza (attività)) nell'intervallo da 100 fino a 5.000 IU/g, come da 500 fino a 4.500 IU/g, o da 500 fino a 4.000 IU/g, o da 500 fino a 3.500 IU/g, o da 500 fino a 3.000 IU/g, o da 500 fino a 2.500 IU/g, o da 500 fino a 2.000 IU/g, o da 500 fino a 1.500 IU/g, o da 500 fino a 1.000 IU/g, o da 600 fino a 900 IU/g, o da 700 fino a 800 IU/g. In certi casi, ossido di polialchilene-asparaginasi può essere presente nella composizione in una quantità nell'intervallo da 500 fino a 1.000 IU/g. Per esempio, ossido di polialchilene-asparaginasi può avere una potenza (attività) nell'intervallo da 500 fino a 1.000 IU/g. In certi casi, ossido di polialchilene-asparaginasi è presente nella composizione in una quantità nell'intervallo da 700 fino a 800 IU/g. Per esempio, ossido di polialchilene-asparaginasi può avere una potenza (attività) nell'intervallo da 700 fino a 800 IU/g. In certi casi, ossido di polialchilene-asparaginasi è presente nella composizione in una quantità di 750 IU/g. Per esempio, ossido di polialchilene-asparaginasi può avere una potenza (attività) di 750 IU/g.

In alcuni casi, ossido di polialchilene-asparaginasi nella composizione è presente in una quantità terapeuticamente efficace, in cui ossido di polialchilene-asparaginasi ha una attività specifica di 50 IU/mg di proteina o più, come 55 IU/mg di proteina o più, o 60 IU/mg di proteina o più, o 65 IU/mg di proteina o più, o 70 IU/mg di proteina o più, o 75 IU/mg di proteina o più, o 80 IU/mg di proteina o più, o 85 IU/mg di proteina o più, o 90 IU/mg di proteina o più, o 95 IU/mg di proteina o più, o 100 IU/mg di proteina o più, o 105 IU/mg di proteina o più, o

110 IU/mg di proteina o più, o 115 IU/mg di proteina o più, o 120 IU/mg di proteina o più, o 125 IU/mg di proteina o più, o 130 IU/mg di proteina o più, o 135 IU/mg di proteina o più, o 140 IU/mg di proteina o più, o 145 IU/mg di proteina o più, o 150 IU/mg di proteina o più. Per esempio, ossido di polialchilene-asparaginasi nella composizione può avere una attività specifica di 85 IU/mg di proteina o più. In alcune realizzazioni, ossido di polialchilene-asparaginasi nella composizione ha una attività specifica nell'intervallo da 50 fino a 150 IU/mg di proteina, o da 55 fino a 145 IU/mg di proteina, o da 60 fino a 140 IU/mg di proteina, o da 65 fino a 135 IU/mg di proteina, o da 70 fino a 130 IU/mg di proteina, o da 75 fino a 125 IU/mg di proteina, o da 80 fino a 120 IU/mg di proteina, o da 85 fino a 115 IU/mg di proteina, o da 90 fino a 110 IU/mg di proteina, o da 95 fino a 105 IU/mg di proteina. In alcuni casi, ossido di polialchilene-asparaginasi nella composizione ha una attività specifica nell'intervallo da 50 fino a 150 IU/mg di proteina, come da 65 fino a 140 IU/mg di proteina, o da 70 fino a 135 IU/mg di proteina, o da 75 fino a 130 IU/mg di proteina, o da 75 fino a 125 IU/mg di proteina. Per esempio, ossido di polialchilene-asparaginasi nella composizione può avere una attività specifica nell'intervallo da 75 fino a 125 IU/mg di proteina.

In certe realizzazioni, ossido di polialchilene-asparaginasi nella composizione è presente in una quantità terapeuticamente efficace, in cui ossido di polialchilene-asparaginasi nella composizione è presente in una quantità nell'intervallo da 1 mg/ml fino a 15 mg/ml, come da 1,5 mg/ml fino a 14,5 mg/ml, o da 2 mg/ml fino a 14 mg/ml, o da 2,5 mg/ml fino a 13,5 mg/ml, o da 3 mg/ml fino a 13 mg/ml, o da 3,5 mg/ml fino a 12,5 mg/ml, o da 4 mg/ml fino a 12 mg/ml, o da 4,5 mg/ml fino a 11,5 mg/ml, o da 4,5 mg/ml fino a 11 mg/ml, o da 4,5 mg/ml fino a 10,5 mg/ml, o da 4,5 mg/ml fino a 10 mg/ml, o da 4,5 mg/ml fino a 9,5 mg/ml, o da 4,5 mg/ml fino a 9 mg/ml, o da 4,5 mg/ml fino a 8,5 mg/ml, o da 5 mg/ml fino a 8 mg/ml. In alcuni casi, ossido di polialchilene-asparaginasi nella composizione è presente in una quantità nell'intervallo da 4,5 mg/ml fino a 8,5 mg/ml.

Quando somministrata a un soggetto, la composizione può comprendere una quantità di ossido di polialchilene-asparaginasi sufficiente per fornire da 100 fino a 5.000 IU/m² di ossido di polialchilene-asparaginasi al soggetto, come da 500 fino a 5.000 IU/m² o da 500 fino a 4.500 IU/m², o da 500 fino a 4.000 IU/m², o da 500 fino a 3.500 IU/m² o da 500 fino a 3.000 IU/m², o da 1.000 fino a 3.000 IU/m², o da 1.500 fino a 3.000 IU/m², o da 1.750 fino

a 3.000 IU/m², o da 2.000 fino a 3.000 IU/m², o da 2.000 fino a 2.750 IU/m² o da 2.250 fino a 2.750 IU/m² di ossido di polialchilene-asparaginasi al soggetto. Per esempio, la composizione può comprendere una quantità di ossido di polialchilene-asparaginasi sufficiente per fornire da 1.500 fino a 3.000 IU/m² di ossido di polialchilene-asparaginasi al soggetto. In certi casi, la composizione comprende una quantità di ossido di polialchilene-asparaginasi sufficiente per fornire da 2.000 fino a 2.750 IU/m² di ossido di polialchilene-asparaginasi al soggetto. In certi casi, la composizione comprende una quantità di ossido di polialchilene-asparaginasi sufficiente per fornire da 2.250 fino a 2.750 IU/m² di ossido di polialchilene-asparaginasi al soggetto. Per esempio, la composizione può comprendere una quantità di ossido di polialchilene-asparaginasi sufficiente per fornire 2.500 IU/m² di ossido di polialchilene-asparaginasi al soggetto.

In certe realizzazioni, il dosaggio somministrato al soggetto è un dosaggio liquido, per esempio un dosaggio acquoso. In alcune realizzazioni, oltre a ossido di polialchilene-asparaginasi, il dosaggio comprende un tampone e un sale.

Le composizioni della presente descrizione, oltre a ossido di polialchilene-asparaginasi possono comprendere componenti addizionali. Per esempio, la composizione può comprendere un tampone. Tamponi adatti per l'uso nelle composizioni della presente descrizione comprendono tamponi che sono compatibili con ossido di polialchilene-asparaginasi e adatti per la somministrazione a un soggetto, per esempio mediante iniezione o somministrazione intravenosa. Esempi di tamponi adatti comprendono tamponi fosfato (per esempio soluzione salina tamponata con fosfato (PBS)), soluzione salina tamponata con fosfato di Dulbecco (DPBS), soluzione salina equilibrata di Hank (HBSS), soluzione salina equilibrata di Earle (EBSS), tampone Tris, tampone lattato di Ringer e loro combinazioni. Il tampone incluso nella composizione può essere un tampone che mantiene il pH della composizione a un pH fisiologicamente compatibile, come un pH nell'intervallo da 6 fino a 8, o un pH di circa 7, per esempio 7,2, 7,3 o 7,4. Nell'invenzione rivendicata, il tampone è un tampone fosfato. Il tampone fosfato comprende fosfato di sodio bibasico (anche noto come fosfato bisodico o monofosfato di sodio; Na₂HPO₄) e fosfato di sodio monobasico (anche noto come fosfato monosodico; NaH₂PO₄).

In alcuni casi, la quantità di fosfato di sodio bibasico nella composizione è nell'intervallo dallo 0,1 fino allo 0,8%

in peso, o dallo 0,1 fino allo 0,7% in peso, o dallo 0,1 fino allo 0,6% in peso, o dallo 0,2 fino allo 0,6% in peso, o dallo 0,3 fino allo 0,6% in peso, o dallo 0,4 fino allo 0,6% in peso, o dallo 0,5 fino allo 0,6% in peso. In certi casi, il fosfato di sodio bibasico può essere presente nella composizione in una quantità nell'intervallo dallo 0,2 fino allo 0,8% in peso. In certi casi, il fosfato di sodio bibasico può essere presente nella composizione in una quantità nell'intervallo dallo 0,3 fino allo 0,6% in peso. In certi casi, il fosfato di sodio bibasico può essere presente nella composizione in una quantità nell'intervallo dallo 0,5 fino allo 0,6% in peso. Per esempio, il fosfato di sodio bibasico può essere presente nella composizione in una quantità di circa lo 0,6% in peso, come lo 0,56% in peso (o lo 0,558% in peso). In certe realizzazioni, la quantità di fosfato di sodio monobasico nella composizione è nell'intervallo dallo 0,01 fino allo 0,4% in peso, o dallo 0,01 fino allo 0,2% in peso, o dallo 0,02 fino allo 0,18% in peso, o dallo 0,03 fino allo 0,16% in peso, o dallo 0,04 fino allo 0,16% in peso, o dallo 0,045 fino allo 0,15% in peso, o dallo 0,04 fino allo 0,14% in peso, o dallo 0,05 fino allo 0,14% in peso, o dallo 0,1 fino allo 0,2% in peso, o dallo 0,1 fino allo 0,15% in peso. Per esempio, il fosfato di sodio monobasico può essere presente nella composizione in una quantità nell'intervallo dallo 0,05 fino allo 0,2% in peso. In certi casi, il fosfato di sodio monobasico può essere presente nella composizione in una quantità nell'intervallo dallo 0,01 fino allo 0,2% in peso. In certi casi, il fosfato di sodio monobasico può essere presente nella composizione in una quantità nell'intervallo dallo 0,09 fino allo 0,15% in peso. In certi casi, il fosfato di sodio monobasico può essere presente nella composizione in una quantità nell'intervallo dallo 0,1 fino allo 0,2% in peso. In certi casi, il fosfato di sodio monobasico può essere presente nella composizione in una quantità nell'intervallo dallo 0,1 fino allo 0,15% in peso. Per esempio, il fosfato di sodio monobasico può essere presente nella composizione in una quantità dello 0,12% in peso (o 0,129% in peso).

Un altro componente addizionale incluso nelle composizioni della presente descrizione è un sale. Sali adatti per l'uso nelle composizioni della presente descrizione comprendono sali che sono compatibili con ossido di polialchilene-asparaginasi e adatti per la somministrazione a un soggetto, per esempio mediante iniezione o somministrazione intravenosa. Esempi di sali adatti comprendono cloruro di sodio, cloruro di potassio, cloruro di calcio, cloruro di magnesio e loro combinazioni. In certi casi, il sale è cloruro di sodio.

In alcuni casi, la quantità di sale (per esempio cloruro di sodio) della composizione è nell'intervallo dallo 0,1 fino all'1% in peso, o dallo 0,2 fino all'1% in peso, o dallo 0,3 fino all'1% in peso, o dallo 0,4 fino all'1% in peso, o dallo 0,5 fino all'1% in peso, o dallo 0,6 fino all'1% in peso, o dallo 0,7 fino all'1% in peso, o dallo 0,8 fino all'1% in peso, o dallo 0,8 fino allo 0,9% in peso. Per esempio, il sale (per esempio cloruro di sodio) può essere presente nella composizione in una quantità nell'intervallo dallo 0,5 fino all'1% in peso. In certi casi, il sale (per esempio cloruro di sodio) può essere presente nella composizione in una quantità nell'intervallo dallo 0,7 fino all'1% in peso. In certi casi, il sale (per esempio cloruro di sodio) può essere presente nella composizione in una quantità nell'intervallo dallo 0,8 fino allo 0,9% in peso. Per esempio, il sale (per esempio cloruro di sodio) può essere presente nella composizione in una quantità dello 0,85% in peso.

In certe realizzazioni, la composizione contenente ossido di polialchilene-asparaginasi è una composizione liofilizzata. Composizioni liofilizzate della presente descrizione, oltre a ossido di polialchilene-asparaginasi, comprendono anche un tampone, un sale e uno zucchero. Per esempio, aspetti della presente descrizione comprendono una composizione stabile alla conservazione liofilizzata di ossido di polialchilene-asparaginasi che comprende un gruppo di ossido di polialchilene legato covalentemente mediante un legante a una asparaginasi, un tampone, un sale e uno zucchero.

Tamponi adatti per l'uso nelle composizioni liofilizzate della presente descrizione comprendono tamponi che sono compatibili con ossido di polialchilene-asparaginasi e adatti per la somministrazione a un soggetto, per esempio mediante iniezione o somministrazione intravenosa. Esempi di tamponi adatti comprendono quelli suddescritti. Nell'invenzione rivendicata, il tampone è un tampone fosfato. Nell'invenzione rivendicata, il tampone fosfato comprende fosfato di sodio bibasico e fosfato di sodio monobasico. In alcuni casi, la quantità di fosfato di sodio bibasico nella composizione è nell'intervallo dallo 0,1 fino allo 0,8% in peso, o dallo 0,1 fino allo 0,7% in peso, o dallo 0,1 fino allo 0,6% in peso, o dallo 0,1 fino allo 0,5% in peso, o dallo 0,1 fino allo 0,4% in peso, o dallo 0,2 fino allo 0,4% in peso, o dallo 0,2 fino allo 0,3% in peso, o dallo 0,25 fino allo 0,3% in peso. Per esempio, il fosfato di sodio bibasico può essere presente nella composizione in una quantità nell'intervallo dallo 0,1 fino allo 0,5% in peso. In certi casi, il fosfato di sodio bibasico può essere presente nella composizione in una quantità

nell'intervallo dallo 0,2 fino allo 0,4% in peso. In certi casi, il fosfato di sodio bibasico può essere presente nella composizione in una quantità nell'intervallo dallo 0,25 fino allo 0,3% in peso. Per esempio, il fosfato di sodio bibasico può essere presente nella composizione in una quantità di circa lo 0,3% in peso, come 0,28% in peso (o 0,279% in peso). In certe realizzazioni, la quantità di fosfato di sodio monobasico nella composizione è nell'intervallo dallo 0,01 fino allo 0,5% in peso, o dallo 0,01 fino allo 0,4% in peso, o dallo 0,01 fino allo 0,3% in peso, o dallo 0,01 fino allo 0,2% in peso, o dallo 0,01 fino allo 0,1% in peso, o dallo 0,02 fino allo 0,09% in peso, o dallo 0,03 fino allo 0,08% in peso, o dallo 0,04 fino allo 0,08% in peso, o dallo 0,045 fino allo 0,075% in peso, o dallo 0,04 fino allo 0,07% in peso, o dallo 0,05 fino allo 0,07% in peso. Per esempio, il fosfato di sodio monobasico può essere presente nella composizione in una quantità nell'intervallo dallo 0,01 fino allo 0,1% in peso. In certi casi, il fosfato di sodio monobasico può essere presente nella composizione in una quantità nell'intervallo dallo 0,05 fino allo 0,07% in peso. In certi casi, il fosfato di sodio monobasico può essere presente nella composizione in una quantità nell'intervallo dallo 0,045 fino allo 0,075% in peso. Per esempio, il fosfato di sodio monobasico può essere presente nella composizione in una quantità dello 0,06% in peso.

Le composizioni liofilizzate della presente descrizione comprendono un sale. Sali adatti per l'uso nelle composizioni della presente descrizione comprendono sali che sono compatibili con ossido di polialchilene-asparaginasi e adatti per la somministrazione a un soggetto, per esempio mediante iniezione o somministrazione intravenosa. Esempi di sali adatti comprendono quelli suddescritti. In certi casi, il sale è cloruro di sodio.

La quantità di sale (per esempio cloruro di sodio) nella composizione è nell'intervallo dallo 0,05 fino all'1% in peso, come dallo 0,1 fino allo 0,9% in peso, o dallo 0,1 fino allo 0,8% in peso, o dallo 0,1 fino allo 0,7% in peso, o dallo 0,1 fino allo 0,6% in peso, o dallo 0,1 fino allo 0,5% in peso, o dallo 0,2 fino allo 0,5% in peso, o dallo 0,3 fino allo 0,5% in peso, o dallo 0,4 fino allo 0,5% in peso, o dallo 0,4 fino allo 0,45% in peso. Per esempio, il sale (per esempio cloruro di sodio) può essere presente nella composizione in una quantità nell'intervallo dallo 0,1 fino all'1% in peso. In certi casi, il sale (per esempio cloruro di sodio) può essere presente nella composizione in una quantità nell'intervallo dallo 0,3 fino allo 0,5% in peso. In certi casi, il sale (per esempio cloruro di sodio) può essere presente nella composizione in una quantità nell'intervallo dallo 0,4 fino allo 0,45% in peso. Per esempio,

il sale (per esempio cloruro di sodio) può essere presente nella composizione in una quantità di circa lo 0,4% in peso, come 0,425% in peso. Un altro componente incluso nelle composizioni della presente descrizione è uno zucchero. Zuccheri adatti per l'uso nelle composizioni della presente descrizione comprendono zuccheri che sono compatibili con ossido di polialchilene-asparaginasi e adatti per la somministrazione a un soggetto, per esempio mediante iniezione o somministrazione intravenosa. Esempi di zuccheri adatti comprendono saccarosio, mannitolo, maltosio, trealosio, 2-idrossipropil-beta-ciclodestrina (β -HPCD), lattosio, glucosio, fruttosio, galattosio, glucosammina e loro combinazioni. In certi casi, lo zucchero è un disaccaride. Per esempio, il disaccaride può essere saccarosio.

La quantità di zucchero (per esempio saccarosio) nella composizione è nell'intervallo dallo 0,1 fino al 25% in peso, come dallo 0,5 fino al 20% in peso, o dall'1 fino al 15% in peso, o dall'1 fino al 10% in peso, o dall'1 fino al 9% in peso, o dall'1 fino all'8% in peso, o dal 2 fino al 7% in peso, o dal 2 fino al 6% in peso, o dal 3 fino al 5% in peso, o dal 4 fino al 5% in peso. Per esempio, lo zucchero (per esempio saccarosio) può essere presente nella composizione in una quantità nell'intervallo dall'1 fino al 10% in peso. In certi casi, lo zucchero (per esempio saccarosio) può essere presente nella composizione in una quantità nell'intervallo dal 3 fino al 5% in peso. In certi casi, lo zucchero (per esempio saccarosio) può essere presente nella composizione in una quantità nell'intervallo dal 4 fino al 5% in peso. Per esempio, lo zucchero (per esempio saccarosio) può essere presente nella composizione in una quantità del 4,5% in peso.

In alcune realizzazioni, la composizione comprende ossido di polialchilene-asparaginasi avente una potenza (attività) nell'intervallo da 500 fino a 1.000 IU/g, fosfato di sodio monobasico in una quantità nell'intervallo dallo 0,01 fino allo 0,2% in peso, un sale (per esempio cloruro di sodio) in una quantità nell'intervallo dallo 0,2 fino al 2% in peso, e acqua.

In alcune realizzazioni, la composizione comprende ossido di polialchilene-asparaginasi avente una potenza (attività) nell'intervallo da 700 fino a 800 IU/g, fosfato di sodio bibasico in una quantità nell'intervallo dallo 0,2 fino allo 0,8% in peso, fosfato di sodio monobasico in una quantità nell'intervallo dallo 0,1 fino allo 0,14% in peso, un sale (per esempio cloruro di sodio) in una quantità nell'intervallo dallo 0,6 fino all'1,0% in peso, e acqua.

In alcune realizzazioni, la composizione comprende ossido di polialchilene-asparaginasi avente una potenza (attività) nell'intervallo da 700 fino a 800 IU/g, fosfato di sodio bibasico in una quantità nell'intervallo dallo 0,5 fino allo 0,6% in peso, fosfato di sodio monobasico in una quantità nell'intervallo dallo 0,09 fino allo 0,15% in peso, un sale (per esempio cloruro di sodio) in una quantità nell'intervallo dallo 0,8 fino allo 0,9% in peso, e acqua.

In alcune realizzazioni, la composizione comprende ossido di polialchilene-asparaginasi avente una potenza (attività) di 750 IU/g, fosfato di sodio bibasico in una quantità di circa lo 0,6% in peso, fosfato di sodio monobasico in una quantità di circa lo 0,1% in peso, un sale (per esempio cloruro di sodio) in una quantità di circa lo 0,9% in peso, e acqua.

In alcune realizzazioni, la composizione comprende ossido di polialchilene-asparaginasi avente una potenza (attività) di 750 IU/g, fosfato di sodio bibasico in una quantità dello 0,56% in peso (o 0,558% in peso), fosfato di sodio monobasico in una quantità dello 0,13% in peso (o 0,129% in peso), un sale (per esempio cloruro di sodio) in una quantità dello 0,85% in peso, e acqua.

In alcune realizzazioni, la composizione comprende ossido di polialchilene-asparaginasi, fosfato di sodio bibasico, fosfato di sodio monobasico, sale (per esempio cloruro di sodio) e acqua. In altre realizzazioni, la composizione comprende, consiste essenzialmente in o consiste in ossido di polialchilene-asparaginasi, fosfato di sodio bibasico, fosfato di sodio monobasico, sale (per esempio cloruro di sodio), zucchero (per esempio saccarosio), e acqua.

In alcune realizzazioni, la composizione comprende, consiste essenzialmente in o consiste in ossido di polialchilene-asparaginasi avente una potenza (attività) nell'intervallo da 500 fino a 1.000 IU/g, fosfato di sodio bibasico in una quantità nell'intervallo dallo 0,1 fino allo 0,5% in peso, fosfato di sodio monobasico in una quantità nell'intervallo dallo 0,01 fino allo 0,1% in peso, un sale (per esempio cloruro di sodio) in una quantità nell'intervallo dallo 0,1 fino all'1% in peso, uno zucchero (per esempio saccarosio) in una quantità nell'intervallo dall'1 fino al 10% in peso, e acqua.

In alcune realizzazioni, la composizione comprende, consiste essenzialmente in o consiste in ossido di polialchilene-asparaginasi avente una potenza (attività) nell'intervallo da 700 fino a 800 IU/g, fosfato di sodio bibasico in una quantità nell'intervallo dallo 0,2 fino allo 0,4% in peso, fosfato di sodio monobasico in una quantità

nell'intervallo dallo 0,05 fino allo 0,07% in peso, un sale (per esempio cloruro di sodio) in una quantità nell'intervallo dallo 0,3 fino allo 0,5% in peso, uno zucchero (per esempio saccarosio) in una quantità nell'intervallo dal 3 fino al 5% in peso, e acqua.

In alcune realizzazioni, la composizione comprende, consiste essenzialmente in o consiste in ossido di polialchilene-asparaginasi avente una potenza (attività) nell'intervallo da 700 fino a 800 IU/g, fosfato di sodio bibasico in una quantità nell'intervallo dallo 0,25 fino allo 0,3% in peso, fosfato di sodio monobasico in una quantità nell'intervallo dallo 0,045 fino allo 0,075% in peso, un sale (per esempio cloruro di sodio) in una quantità nell'intervallo dallo 0,4 fino allo 0,45% in peso, uno zucchero (per esempio saccarosio) in una quantità nell'intervallo dal 4 fino al 5% in peso, e acqua.

In alcune realizzazioni, la composizione comprende, consiste essenzialmente in o consiste in ossido di polialchilene-asparaginasi avente una potenza (attività) di 750 IU/g, fosfato di sodio bibasico in una quantità di circa lo 0,3% in peso, fosfato di sodio monobasico in una quantità di circa lo 0,06% in peso, un sale (per esempio cloruro di sodio) in una quantità di circa lo 0,4% in peso, uno zucchero (per esempio saccarosio) in una quantità di circa il 4,5% in peso, e acqua.

In alcune realizzazioni, la composizione comprende, consiste essenzialmente in o consiste in ossido di polialchilene-asparaginasi avente una potenza (attività) di 750 IU/g, fosfato di sodio bibasico in una quantità dello 0,28% in peso (o 0,279% in peso), fosfato di sodio monobasico in una quantità dello 0,06% in peso, un sale (per esempio cloruro di sodio) in una quantità dello 0,43% in peso (o 0,425% in peso), uno zucchero (per esempio saccarosio) in una quantità del 4,5% in peso, e acqua.

In certi casi, la composizione (per esempio composizione liquida o liofilizzata) è una composizione sterile. Con "sterile" si intende che non vi sono sostanzialmente componenti immunogenici nella composizione, come per esempio sostanzialmente nessun microbo (per esempio funghi, batteri, virus, forme di spore, ecc.). In alcuni casi, la composizione è presente in un contenitore. Il fornire la composizione in un contenitore può facilitare il mantenimento della composizione come una composizione sterile. Per esempio, il contenitore può essere configurato per mantenere la composizione racchiusa nel contenitore in un ambiente sterile. Come tale, il

contenitore può essere un contenitore sigillato, per esempio il contenitore può comprendere un dispositivo di tenuta, come un dispositivo di tenuta all'acqua e/o all'aria. Il dispositivo di tenuta può essere rimuovibile dal contenitore per permettere a un utilizzatore di accedere ai contenuti del contenitore. In alcuni casi, il dispositivo di tenuta può essere un dispositivo di tenuta rompibile o, in altri casi, il dispositivo di tenuta può essere configurato per permettere l'inserimento di un ago, una cannula o una siringa nell'interno del contenitore senza rimuovere il dispositivo di tenuta dal contenitore. In alcuni casi, un dispositivo di tenuta configurato per permettere l'accesso all'interno del contenitore senza rimuovere il dispositivo di tenuta dal contenitore può facilitare il mantenimento dei contenuti del contenitore (per esempio la composizione nel contenitore) in un ambiente sterile prima della somministrazione della composizione a un soggetto. Materiali adatti per il dispositivo di tenuta comprendono, per esempio, dispositivi di tenuta in gomma o polimero come gomma siliconica, gomma naturale, gomma stirene butadiene, copolimeri etilene-propilene, policloroprene, poliacrilato, polibutadiene, poliuretano, stirene butadiene e loro combinazioni. Per esempio, in certe realizzazioni, il dispositivo di tenuta è un setto perforabile mediante un ago, una siringa o una cannula. Il dispositivo di tenuta può anche fornire accesso conveniente a un campione nel contenitore, nonché una barriera protettiva che copre l'apertura del contenitore. In alcuni casi, il dispositivo di tenuta è un dispositivo di tenuta rimuovibile, come un tappo filettato o a scatto o altro elemento di tenuta adatto che può venire applicato all'apertura del contenitore. Per esempio, un tappo filettato può venire avvitato sull'apertura prima o dopo l'aggiunta di un campione al contenitore.

In alcuni casi, il contenitore è un contenitore di dosaggi unitari. Un contenitore di dosaggi unitari si riferisce a un contenitore che contiene uno o più dosaggi unitari per la somministrazione a un soggetto. In alcune realizzazioni, un contenitore di dosaggi unitari comprende una quantità predeterminata di una composizione per un soggetto calcolata in una quantità sufficiente per produrre un effetto desiderato in un soggetto. Certe realizzazioni delle composizioni possono venire fornite in un contenitore di dosaggi unitari adatto per somministrazione singola di dosaggi precisi. La quantità di composizione attiva somministrata a un soggetto può dipendere dal soggetto trattato, dalla gravità del disturbo, e dal modo di somministrazione. Per esempio, il contenitore di dosaggi unitari può contenere una quantità della composizione da somministrare come descritto in questa sede in una quantità efficace

per ottenere l'effetto desiderato nel soggetto che viene trattato. In certi casi, un contenitore di dosaggi unitari comprende una composizione avente ossido di polialchilene-asparaginasi in una quantità terapeuticamente efficace. Quantità terapeuticamente efficaci di ossido di polialchilene-asparaginasi sono suddescritte. In certe realizzazioni, il contenitore di dosaggi unitari è una fiala. In alcuni casi, la fiala è una fiala sigillata (per esempio come suddescritto con riferimento a un contenitore sigillato).

Il contenitore può essere formato da qualsiasi materiale conveniente che sia compatibile con ossido di polialchilene-asparaginasi e altri componenti della composizione. Per esempio, il contenitore può essere un contenitore compatibile con un solido configurato per contenere un solido (per esempio una composizione liofilizzata). In alcuni casi, il contenitore è un contenitore compatibile con un liquido configurato per contenere un liquido. I contenitori possono anche essere compatibili con un solido e un liquido, in cui il contenitore è configurato per contenere solidi e liquidi. In alcuni casi, un liquido nel contenitore può essere un liquido acquoso e, in questi casi, il contenitore può essere compatibile con composizioni acquose. Con "compatibile" si intende che il contenitore è sostanzialmente inerte (per esempio sostanzialmente non reagisce con) nei confronti del liquido e/o delle composizioni o altri componenti in contatto con il contenitore. Esempi di materiali adatti per il contenitore comprendono vetro e plastica. Per esempio, il contenitore può essere formato da vetro come vetro di silicato, vetro di borosilicato, vetro di borosilicato di sodio (per esempio PYREX™), vetro di quarzo fuso, vetro di silice fusa. Altri esempi di materiali adatti per il contenitore per il contenitore comprendono plastiche come polipropilene, polimetilpentene, politetrafluoroetilene (PTFE), perfluoroeteri (PFE), etilene propilene fluorurato (FEP), perfluoroalcoossilciani (PFA), polietilentereftalato (PET), polietilene (PE), polietereeterchetone (PEEK), polistirene. In certi casi, come suddescritto, il contenitore è una fiala, e come tale può essere una fiala in vetro. Come suddescritto, il contenitore può essere un contenitore sigillato, e come tale può essere una fiala in vetro sigillata.

Come descritto più in dettaglio in seguito, composizioni liquide o ricostituite della presente descrizione possono venire somministrate a un soggetto, per esempio mediante iniezione o intravenosamente. In certe realizzazioni, prima della somministrazione della composizione ricostituita a un soggetto, una composizione solida, per esempio

come suddescritto, può venire combinata con un liquido per fornire una composizione liquida adatta per la somministrazione, per esempio mediante iniezione o intravenosamente. In alcuni casi, prima della somministrazione della composizione a un soggetto, una composizione solida può venire combinata con acqua (per esempio acqua per iniezione, WFI) per fornire una composizione acquosa adatta per la somministrazione, per esempio mediante iniezione o intravenosamente. Per esempio, una composizione liofilizzata può venire ricostituita con acqua (per esempio acqua per iniezione, WFI) per produrre una unità di dosaggio ricostituita adatta per somministrazione a un soggetto, per esempio mediante iniezione o intravenosamente.

Come esposto in questa sede, aspetti della presente descrizione comprendono una composizione che comprende: ossido di polialchilene-asparaginasi che comprende un gruppo di ossido di polialchilene legato covalentemente mediante un legante a una asparaginasi; un tampone e un sale. In certe realizzazioni, come suddescritto, l'ossido di polialchilene è un polietilenglicole. In certe realizzazioni, come suddescritto, il legante è un legante di uretano (carbammato). In certe realizzazioni, come suddescritto, l'asparaginasi è una asparaginasi di E. coli. Nell'invenzione rivendicata, come suddescritto, il tampone è un tampone fosfato. In certe realizzazioni, come suddescritto, il sale è cloruro di sodio. Per conseguenza, certe realizzazioni della composizione comprendono polietilenglicole-asparaginasi che comprende un gruppo di polietilenglicole legato covalentemente mediante un legante di uretano a una asparaginasi di E. coli; un tampone fosfato e un sale. Ciascuno dei componenti di queste composizioni (per esempio peso molecolare del polietilenglicole, quantità di polietilenglicole-asparaginasi, quantità e tipo di tampone fosfato, quantità e tipo di sale) è come descritto in dettaglio in precedenza.

Come esposto in questa sede, aspetti della presente descrizione comprendono una composizione stabile alla conservazione liofilizzata che comprende: ossido di polialchilene-asparaginasi che comprende un gruppo di ossido di polialchilene legato covalentemente mediante un legante a una asparaginasi; un tampone, un sale e uno zucchero. In certe realizzazioni, come suddescritto, l'ossido di polialchilene è un polietilenglicole. In certe realizzazioni, come suddescritto, il legante è un legante di uretano (carbammato). In certe realizzazioni, come suddescritto, l'asparaginasi è una asparaginasi di E. coli. In certe realizzazioni, come suddescritto, il tampone è un tampone fosfato. In certe realizzazioni, come suddescritto, il sale è cloruro di sodio. In certe realizzazioni, come

suddescritto, lo zucchero è un disaccaride (per esempio saccarosio). Per conseguenza, certe realizzazioni della composizione stabile alla conservazione liofilizzata comprendono polietilenglicole-asparaginasi che comprende un gruppo di polietilenglicole legato covalentemente mediante un legante di uretano a una asparaginasi di E. coli; un tampone fosfato, un sale e un disaccaride. Ciascuno dei componenti di queste composizioni (per esempio peso molecolare del polietilenglicole, quantità di polietilenglicole-asparaginasi, quantità e tipo di tampone fosfato, quantità e tipo di sale, quantità e tipo di disaccaride, ecc.) è come descritto in dettaglio in precedenza.

Le composizioni della presente descrizione possono anche comprendere altri componenti, come eccipienti farmaceuticamente accettabili addizionali o un veicolo di somministrazione del dosaggio come parte della composizione. Gli eccipienti possono comprendere carboidrati, sali inorganici, sali organici, agenti antimicrobici, antiossidanti, tensioattivi, acqua (per esempio acqua per iniezione (WFI)), alcoli, polioli, glicerina, oli vegetali, fosfolipidi, tamponi, acidi, basi e qualsiasi delle loro combinazioni. Un carboidrato come uno zucchero, uno zucchero derivatizzato come allitolo, acido aldonico, uno zucchero esterificato e/o un polimero di zucchero possono anche venire impiegati. Alcuni eccipienti di carboidrato di interesse comprendono, per esempio, monosaccaridi come fruttosio, maltosio, galattosio, glucosio, D-mannosio, sorbosio; disaccaridi come lattosio, saccarosio, trealosio, cellobiosio; polisaccaridi come raffinosio, melezitiosio, maltodestrine, destrani, amidi; e alditoli come mannitolo, xilitolo, maltitolo, lattitolo, xilitolo, sorbitolo (glucitolo), piranosilorbitolo, mioinositolo. Sali inorganici e organici possono comprendere acido citrico, cloruro di sodio, cloruro di potassio, solfato di sodio, nitrato di potassio, fosfato di sodio monobasico, fosfato di sodio bibasico e qualsiasi delle loro combinazioni.

In certe realizzazioni, le composizioni della presente descrizione possono anche comprendere un agente antimicrobico per prevenire o impedire la crescita microbica come, per esempio, cloruro di benzalconio, cloruro di benzetonio, alcool benzilico, cloruro di cetilpiridinio, clorobutanolo, fenolo, alcool feniletilico, nitrato fenilmercurico, timerosal e qualsiasi delle loro combinazioni.

Uno o più antiossidanti possono anche venire inclusi nella composizione. Antiossidanti che possono ridurre o prevenire l'ossidazione e quindi il deterioramento della composizione possono comprendere, per esempio, ascorbilpalmitato, idrossianisolo butilato, idrossitoluene butilato, acido ipofosforoso, monotioglicerolo,

propilgallato, bisolfito di sodio, sodio formaldeide solfossilato, metabisolfito di sodio e qualsiasi delle loro combinazioni.

Uno o più tensioattivi possono anche venire inclusi nelle composizioni della presente descrizione. Per esempio, tensioattivi adatti possono comprendere polisorbati come “Tween 20” e “Tween 80”, e pluronic come F68 e F88 (BASF, Mount Olive, New Jersey); esteri sorbitanici; lipidi come fosfolipidi come lecitina e altre fosfatidilcoline, fosfatidiletanolammine, acidi grassi ed esteri grassi; steroidi come colesterolo; agenti chelanti come EDTA; e zinco e altri cationi.

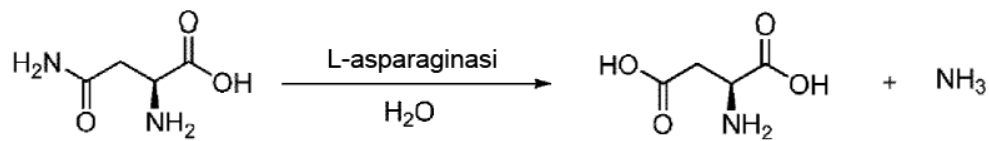
Acidi o basi possono anche essere presenti in composizioni della presente descrizione. Per esempio, gli acidi possono comprendere acido cloridrico, acido acetico, acido fosforico, acido citrico, acido malico, acido lattico, acido formico, acido tricloroacetico, acido nitrico, acido perclorico, acido fosforico, acido solforico, acido fumarico e qualsiasi delle loro combinazioni. Esempi di basi comprendono idrossido di sodio, acetato di sodio, idrossido di ammonio, idrossido di potassio, acetato di ammonio, acetato di potassio, fosfato di sodio, fosfato di potassio, citrato di sodio, formiato di sodio, solfato di sodio, solfato di potassio, fumarato di potassio e qualsiasi delle loro combinazioni.

La quantità di qualsiasi singolo eccipiente nella composizione può variare a seconda della natura e della funzione dell'eccipiente, del veicolo di somministrazione del dosaggio e delle particolari necessità della composizione. In alcuni casi, la quantità ottimale di qualsiasi singolo eccipiente viene determinata tramite sperimentazione ordinaria, cioè preparando composizioni contenenti varie quantità dell'eccipiente (nell'intervallo da basse fino ad alte), esaminando la stabilità e altri parametri, e quindi determinando l'intervallo al quale viene ottenuta la prestazione ottimale senza effetti avversi significativi. Generalmente, tuttavia, l'eccipiente(i) sarà presente nella composizione in una quantità dall'1% fino al 99% in peso, come dal 5% fino al 98% in peso, come dal 15% fino al 95% in peso di eccipiente, comprendente il 30% o meno in peso, o il 20% o meno in peso, o il 10% o meno in peso. Eccipienti farmaceutici insieme con altri eccipienti che possono venire impiegati nelle composizioni sono descritti in “Remington: The Science & Practice of Pharmacy”, 22^a ed., Williams & Williams, (2012), “Physician's Desk Reference”, 70^a ed., PDR Network, Montvale, NJ (2015), e Rowe, RC., Handbook of Pharmaceutical Excipients,

7^a ed., Pharmaceutical Press, New York, NY, (2012).

METODI DI USO (non rivendicati)

Aspetti della presente descrizione, che non sono rivendicati, comprendono anche metodi di uso delle composizioni (per esempio liquide e liofilizzate) descritti in questa sede. In certe realizzazioni, il metodo di uso è un metodo di deaminazione di asparagina in un soggetto. Come suddescritto, l'enzima asparaginasi può mediare una reazione di deaminazione in cui l'amminoacido asparagina viene idrolizzato per produrre aspartato e ammoniaca, per esempio secondo la reazione seguente:



In alcuni casi, l'attività di asparaginasi riduce la concentrazione di asparagina in un soggetto, ad esempio riduce la concentrazione nel plasma di asparagina nel soggetto. Un impoverimento di asparagina in un soggetto può influenzare negativamente cellule nel soggetto che dipendono dalla presenza di asparagina per la sintesi di proteine. Per esempio, la sintesi di proteine in cellule che mancano della capacità di sintetizzare la loro propria asparagina (per esempio cellule che mancano dell'enzima asparagina sintetasi) possono venire influenzate negativamente da una mancanza di asparagina esogena, il che a sua volta può portare ad apoptosi delle cellule. In alcuni casi, cellule in un soggetto che dipendono dalla presenza di asparagina per la sintesi di proteine possono essere associate con una condizione neoplastica, come cancro. Per conseguenza, i metodi della presente descrizione comprendono metodi per trattare un soggetto per una condizione neoplastica, come metodi di trattamento di un soggetto per un cancro. Per conseguenza, composizioni della presente descrizione che comprendono ossido di polialchilene-asparaginasi possono essere terapeuticamente efficaci per il trattamento di condizioni neoplastiche, come un cancro. In certe realizzazioni, cellule non neoplastiche nel soggetto non vengono influenzate significativamente dalle composizioni di ossido di polialchilene-asparaginasi della presente descrizione. Per esempio, cellule non neoplastiche nel soggetto possono avere l'enzima asparagina sintetasi, e quindi mantenere la capacità di sintetizzare asparagina.

In certe realizzazioni, la condizione neoplastica da trattare nel soggetto comprende condizioni neoplastiche che

sono suscettibili a trattamento mediante somministrazione di ossido di polialchilene-asparaginasi al soggetto, per esempio condizioni neoplastiche che dipendono da asparagina esogena. Per esempio, condizioni neoplastiche che possono venire trattate mediante somministrazione di ossido di polialchilene-asparaginasi a un soggetto comprendono cancri, come tumori solidi o tumori liquidi.

In certi casi, la condizione neoplastica è caratterizzata dalla presenza di un tumore solido. Per conseguenza, in alcune realizzazioni, un metodo della presente descrizione, che non è rivendicato, è un metodo di trattamento di un soggetto per un tumore solido usando ossido di polialchilene-asparaginasi (per esempio una composizione di ossido di polialchilene-asparaginasi liofilizzata ricostituita o liquida della presente descrizione). Metodi di trattamento di un soggetto per una condizione neoplastica sono utili per trattare una ampia varietà di tumori solidi, comprendenti carcinomi e sarcomi. Tipi di tumori solidi possono comprendere cancro pancreatico, melanoma, cancro a cellule squamose, cancro del polmone a cellule non squamose (NSCLC), cancro del colon, cancro del seno, cancro dell'ovaio, cancro cervicale, cancro della prostata. Per esempio, carcinomi che possono venire trattati usando un metodo in oggetto comprendono carcinoma esofageo, carcinoma epatocellulare, carcinoma a cellule basali (una forma di cancro della pelle), carcinoma a cellule squamose (vari tessuti), carcinoma della vescica, comprendente carcinoma a cellule transizionali (un neoplasma maligno della vescica), carcinoma broncogenico, carcinoma del colon, carcinoma coloretale, carcinoma gastrico, carcinoma del polmone comprendente carcinoma a cellule piccole e carcinoma a cellule non piccole del polmone, carcinoma corticosurrenale, carcinoma della tiroide, carcinoma pancreatico, carcinoma del seno, carcinoma dell'ovaio, carcinoma della prostata, adenocarcinoma, carcinoma delle ghiandole sudoripare, carcinoma delle ghiandole sebacee, carcinoma papillare, adenocarcinoma papillare, cistadenocarcinoma, carcinoma midollare, carcinoma delle cellule renali, carcinoma duttale *in situ* o carcinoma del dotto biliare, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionale, tumore di Wilm, carcinoma cervicale, carcinoma uterino, carcinoma testicolare, carcinoma osteogenico, carcinoma epiteliale e carcinoma nasofaringeo, ecc.

Sarcomi che possono venire trattati usando un metodo in oggetto comprendono fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, cordoma, sarcoma osteogenico, osteosarcoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma,

linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, sarcoma di Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma, e altri sarcomi di tessuti molli.

Altri tumori solidi che possono venire trattati usando un metodo in oggetto comprendono glioma, astrocitoma, medulloblastoma, craniofaringioma, ependimoma, pinealoma, emangioblastoma, neuroma acustico, oligodendroglioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma e retinoblastoma.

In certi casi, la condizione neoplastica è caratterizzata dalla presenza di un tumore liquido. Per esempio, un tumore liquido può comprendere cellule cancerose metastatiche (per esempio cellule tumorali circolanti (CTC)), cancri ematici e loro combinazioni. Esempi di cancri ematici comprendono leucemia, linfoma e mieloma. In alcuni casi, il cancro è leucemia. Per conseguenza, in alcune realizzazioni, che non sono rivendicate, il metodo è un metodo di trattamento di un soggetto per la leucemia usando ossido di polialchilene-asparaginasi (per esempio una composizione di ossido di polialchilene-asparaginasi liofilizzata ricostituita o liquida della presente descrizione).

Vari tipi di leucemia possono essere suscettibili a trattamento usando i metodi in oggetto. Per esempio, la leucemia può essere una leucemia acuta. Una leucemia acuta può essere caratterizzata da un rapido aumento nel numero di cellule ematiche immature. Un rapido aumento in cellule ematiche immature può portare ad affollamento, che a sua volta può fare in modo che il midollo osseo produca significativamente meno cellule ematiche sane. Quindi, i metodi della presente descrizione comprendono metodi per trattare un soggetto per la leucemia acuta, per esempio somministrando al soggetto un dosaggio di ossido di polialchilene-asparaginasi (per esempio una composizione di ossido di polialchilene-asparaginasi liofilizzata ricostituita o liquida della presente descrizione) efficace per trattare il soggetto per la leucemia acuta.

In altri casi, la leucemia è leucemia cronica. In alcuni casi, la leucemia cronica può essere caratterizzata da un aumento nel numero di globuli bianchi relativamente maturi, ma anormali. La leucemia cronica può richiedere un periodo di tempo prolungato per svilupparsi (per esempio mesi o anni), in cui i globuli bianchi anormali vengono prodotti a un tasso significativamente maggiore del normale. Quindi, i metodi della presente descrizione, che non sono rivendicati, comprendono metodi per trattare un soggetto per la leucemia cronica, per esempio somministrando al soggetto un dosaggio di ossido di polialchilene-asparaginasi (per esempio una composizione di

ossido di polialchilene-asparaginasi liofilizzata ricostituita o liquida della presente descrizione) efficace per trattare il soggetto per la leucemia cronica.

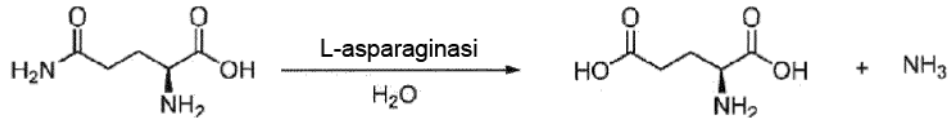
In certe realizzazioni, la leucemia è una leucemia linfoblastica (anche indicata come leucemia linfocitica). Una leucemia linfoblastica può essere caratterizzata dal numero di cellule ematiche interessate dalla leucemia. Nella leucemia linfoblastica, il cambiamento anormale nelle cellule ematiche avviene nelle cellule del midollo osseo che normalmente si sviluppano in linfociti. Per esempio, la leucemia linfoblastica può essere leucemia a cellule B. Quindi, i metodi della presente descrizione, che non sono rivendicati, comprendono metodi per trattare un soggetto per la leucemia linfoblastica (leucemia linfocitica), per esempio somministrando al soggetto un dosaggio di ossido di polialchilene-asparaginasi (per esempio una composizione di ossido di polialchilene-asparaginasi liofilizzata ricostituita o liquida della presente descrizione) efficace per trattare il soggetto per la leucemia linfoblastica (leucemia linfocitica). Per esempio, un tipo specifico di leucemia linfoblastica che può venire trattato usando i metodi in oggetto comprende leucemia linfoblastica acuta (ALL). In queste realizzazioni, i metodi della presente descrizione, che non sono rivendicati, comprendono metodi per trattare un soggetto per la leucemia linfoblastica acuta (ALL), per esempio somministrando al soggetto un dosaggio di ossido di polialchilene-asparaginasi (per esempio una composizione di ossido di polialchilene-asparaginasi liofilizzata ricostituita o liquida della presente descrizione) efficace per trattare il soggetto per ALL. Altri tipi di leucemia linfoblastica che possono venire trattati usando i metodi in oggetto comprendono leucemia linfocitica cronica (CLL). In queste realizzazioni, i metodi della presente descrizione comprendono metodi per trattare un soggetto per la leucemia linfocitica cronica (CLL), per esempio somministrando al soggetto un dosaggio di ossido di polialchilene-asparaginasi (per esempio una composizione di ossido di polialchilene-asparaginasi liofilizzata ricostituita o liquida della presente descrizione) efficace per trattare il soggetto per CLL.

In altre realizzazioni, la leucemia è una leucemia mieloide (anche indicata come leucemia granulocitica). Una leucemia mieloide può venire caratterizzata dal tipo di cellule ematiche interessate dalla leucemia. Nella leucemia mieloide, il cambiamento anormale nelle cellule ematiche avviene nelle cellule del midollo osseo che normalmente si sviluppano in globuli rossi e/o piastrine. Quindi, i metodi della presente descrizione, che non sono rivendicati,

comprendono metodi per trattare un soggetto per la leucemia mieloide (leucemia granulocitica), per esempio somministrando al soggetto un dosaggio di ossido di polialchilene-asparaginasi (per esempio una composizione di ossido di polialchilene-asparaginasi liofilizzata ricostituita o liquida della presente descrizione) efficace per trattare il soggetto per la leucemia mieloide (leucemia granulocitica). Per esempio, un tipo specifico di leucemia mieloide che può venire trattato usando i metodi in oggetto comprende leucemia mieloide acuta (AML). In queste realizzazioni, i metodi della presente descrizione, che non sono rivendicati, comprendono metodi per trattare un soggetto per la leucemia mieloide acuta (AML), per esempio somministrando al soggetto un dosaggio di ossido di polialchilene-asparaginasi (per esempio una composizione di ossido di polialchilene-asparaginasi liofilizzata ricostituita o liquida della presente descrizione) efficace per trattare il soggetto per AML.

Esempi di AML comprendono AML con traslocazioni citogenetiche ricorrenti, AML con displasia multistirpe e altre AML. Per esempio, AML con traslocazioni citogenetiche ricorrenti comprendono, fra le altre, AML con t(8;21)(q22;q22), AML(CBF-alfa)/ETO, leucemia promielocitica acuta (AML con t(15; 17)(q22;q11-12) e varianti, PML/RAR-alfa), AML con eosinofili del midollo osseo anormali (inv(16)(p13q22) o t(16;16)(p13;q11), CBFb/MYH1 IX), e AML con anomalie 1 q23 (MLL). Esempi di AML con displasia multistirpe possono comprendere quelli che sono associati o meno con sindrome mielodisplastica precedente. Altri tipi di leucemia mieloide acuta comprendono, per esempio, AML minimamente differenziata, AML senza maturazione, AML con maturazione, leucemia mielomonocitica acuta, leucemia monocitica acuta, leucemia eritroide acuta, leucemia megacariocitica acuta, leucemia basofila acuta e panmielosi acuta con mielofibrosi.

Altri tipi di leucemia mieloide che possono venire trattati usando i metodi in oggetto comprendono leucemia granulocitica cronica (CML). In queste realizzazioni, i metodi della presente descrizione comprendono metodi per il trattamento di un soggetto per leucemia granulocitica cronica (CML), per esempio somministrando al soggetto un dosaggio di ossido di polialchilene-asparaginasi (per esempio una composizione di ossido di polialchilene-asparaginasi liofilizzata ricostituita o liquida della presente descrizione) efficace per trattare il soggetto per CML. In certi casi, l'asparaginasi può mediare la deamminazione di glutammina, in cui l'amminoacido glutammina viene idrolizzato per produrre glutammato e ammoniaca, per esempio secondo la reazione seguente:



In alcuni casi, l'attività di asparaginasi riduce la concentrazione di glutammina in un soggetto, ad esempio riduce la concentrazione nel plasma di glutammina nel soggetto. Analogamente alla descrizione precedente, un impoverimento di glutammina in un soggetto può influenzare negativamente cellule nel soggetto che dipendono dalla presenza di glutammina per la sintesi di proteine. Per esempio, la sintesi di proteine in cellule che mancano della capacità di sintetizzare la loro propria glutammina (per esempio cellule che mancano dell'enzima glutammina sintetasi) possono venire influenzate negativamente da una mancanza di glutammina esogena, che a sua volta può portare ad apoptosi delle cellule. In alcuni casi, cellule in un soggetto che dipendono dalla presenza di glutammina per la sintesi di proteine possono essere associate con una condizione neoplastica, come un cancro. Per conseguenza, i metodi della presente descrizione, che non sono rivendicati, comprendono metodi per trattare un soggetto per una condizione neoplastica, come metodi di trattamento di un soggetto per un cancro, in cui la condizione neoplastica può dipendere da glutammina esogena. Per esempio, realizzazioni dei metodi in oggetto, che non sono rivendicati, comprendono metodi di deamminazione di glutammina in un soggetto. In certe realizzazioni, cellule non neoplastiche nel soggetto non vengono influenzate significativamente da ossido di polialchilene-asparaginasi somministrato al soggetto. Per esempio, cellule non neoplastiche nel soggetto possono avere l'enzima glutammina sintetasi, e quindi mantenere la capacità di sintetizzare glutammina.

Come suddescritto, le composizioni della presente descrizione comprendono composizioni stabili alla conservazione liofilizzate. Prima della somministrazione della composizione a un soggetto, una composizione liofilizzata può venire combinata con un liquido per fornire una composizione liquida adatta per la somministrazione, per esempio mediante iniezione o intravenosamente. In alcuni casi, prima della somministrazione della composizione a un soggetto, una composizione liofilizzata viene combinata con acqua (per esempio acqua per iniezione, WFI) per fornire una composizione acquosa adatta per la somministrazione, per esempio mediante iniezione o intravenosamente. Per esempio, i metodi della presente descrizione possono comprendere la ricostituzione di una composizione liofilizzata (per esempio una composizione stabile alla

conservazione liofilizzata) della presente descrizione. La ricostituzione di una composizione liofilizzata può produrre una unità di dosaggio ricostituita. In alcuni casi, l'unità di dosaggio ricostituita è adatta per la somministrazione al soggetto, per esempio mediante iniezione o intravenosamente. In certe realizzazioni, la ricostituzione della composizione liofilizzata comprende il combinare la composizione liofilizzata (per esempio la composizione stabile alla conservazione liofilizzata) con acqua (per esempio acqua per iniezione, WFI).

L'unità di dosaggio liquida o ricostituita può comprendere una quantità predeterminata della composizione della presente descrizione calcolata in una quantità sufficiente per produrre un effetto terapeutico desiderato in un soggetto. La quantità della composizione in una unità di dosaggio (per esempio liquida o ricostituita) che viene somministrata a un soggetto può dipendere dal soggetto che viene trattato, dalla gravità del disturbo, e dal modo di somministrazione. Per esempio, l'unità di dosaggio può comprendere una quantità della composizione da somministrare come descritto in questa sede in una quantità terapeuticamente efficace.

Certe realizzazioni dell'unità di dosaggio possono comprendere una quantità di ossido di polialchilene-asparaginasi nell'intervallo da 100 fino a 5.000 IU/ml, come da 500 fino a 4.500 IU/ml, o da 500 fino a 4.000 IU/ml, o da 500 fino a 3.500 IU/ml, o da 500 fino a 3.000 IU/ml, o da 500 fino a 2.500 IU/ml, o da 500 fino a 2.000 IU/ml, o da 500 fino a 1.500 IU/ml, o da 500 fino a 1.000 IU/ml, o da 600 fino a 900 IU/ml, o da 700 fino a 800 IU/ml. In certi casi, l'unità di dosaggio comprende una quantità di ossido di polialchilene-asparaginasi nell'intervallo da 500 fino a 1.000 IU/ml. In certi casi, l'unità di dosaggio comprende una quantità di ossido di polialchilene-asparaginasi nell'intervallo da 700 fino a 800 IU/ml. Per esempio, l'unità di dosaggio può comprendere 750 IU/ml di ossido di polialchilene-asparaginasi.

In certe realizzazioni, l'unità di dosaggio comprende una quantità terapeuticamente efficace (per esempio attività specifica) di ossido di polialchilene-asparaginasi, come 50 IU/mg di proteina o più, come 55 IU/mg di proteina o più, o 60 IU/mg di proteina o più, o 65 IU/mg di proteina o più, o 70 IU/mg di proteina o più, o 75 IU/mg di proteina o più, o 80 IU/mg di proteina o più, o 85 IU/mg di proteina o più, o 90 IU/mg di proteina o più, o 95 IU/mg di proteina o più, o 100 IU/mg di proteina o più, o 105 IU/mg di proteina o più, o 110 IU/mg di proteina o più, o 115 IU/mg di proteina o più, o 120 IU/mg di proteina o più, o 125 IU/mg di proteina o più, o 130 IU/mg di

proteina o più, o 135 IU/mg di proteina o più, o 140 IU/mg di proteina o più, o 145 IU/mg di proteina o più, o 150 IU/mg di proteina o più. Per esempio, l'unità di dosaggio può avere una attività specifica di 85 IU/mg di proteina o più. In alcune realizzazioni, l'unità di dosaggio ha una attività specifica nell'intervallo da 50 fino a 150 IU/mg di proteina, o da 55 fino a 145 IU/mg di proteina, o da 60 fino a 140 IU/mg di proteina, o da 65 fino a 135 IU/mg di proteina, o da 70 fino a 130 IU/mg di proteina, o da 75 fino a 125 IU/mg di proteina, o da 80 fino a 120 IU/mg di proteina, o da 85 fino a 115 IU/mg di proteina, o da 90 fino a 110 IU/mg di proteina, o da 95 fino a 105 IU/mg di proteina. In alcuni casi, l'unità di dosaggio ha una attività specifica nell'intervallo da 50 fino a 150 IU/mg di proteina, come da 65 fino a 140 IU/mg di proteina, o da 70 fino a 135 IU/mg di proteina, o da 75 fino a 130 IU/mg di proteina, o da 75 fino a 125 IU/mg di proteina. Per esempio, l'unità di dosaggio può avere una attività specifica nell'intervallo da 75 fino a 125 IU/mg di proteina.

In certe realizzazioni, l'unità di dosaggio comprende una quantità terapeuticamente efficace (per esempio concentrazione di proteina) di ossido di polialchilene-asparaginasi in una quantità nell'intervallo da 1 mg/ml fino a 15 mg/ml, come da 1,5 mg/ml fino a 14,5 mg/ml, o da 2 mg/ml fino a 14 mg/ml, o da 2,5 mg/ml fino a 13,5 mg/ml, o da 3 mg/ml fino a 13 mg/ml, o da 3,5 mg/ml fino a 12,5 mg/ml, o da 4 mg/ml fino a 12 mg/ml, o da 4,5 mg/ml fino a 11,5 mg/ml, o da 4,5 mg/ml fino a 11 mg/ml, o da 4,5 mg/ml fino a 10,5 mg/ml, o da 4,5 mg/ml fino a 10 mg/ml, o da 4,5 mg/ml fino a 9,5 mg/ml, o da 4,5 mg/ml fino a 9 mg/ml, o da 4,5 mg/ml fino a 8,5 mg/ml, o da 5 mg/ml fino a 8 mg/ml. In alcuni casi, l'unità di dosaggio comprende ossido di polialchilene-asparaginasi in una quantità nell'intervallo da 4,5 mg/ml fino a 8,5 mg/ml.

Quando somministrata a un soggetto, l'unità di dosaggio può comprendere una quantità terapeuticamente efficace di ossido di polialchilene-asparaginasi affinché l'unità di dosaggio fornisca da 100 fino a 5.000 IU/m² di ossido di polialchilene-asparaginasi al soggetto, come da 500 fino a 5.000 IU/m², o da 500 fino a 4.500 IU/m², o da 500 fino a 4.000 IU/m², o da 500 fino a 3.500 IU/m², o da 500 fino a 3.000 IU/m², o da 1.000 fino a 3.000 IU/m², o da 1.500 fino a 3.000 IU/m², o da 1.750 fino a 3.000 IU/m², o da 2.000 fino a 3.000 IU/m², o da 2.000 fino a 2.750 IU/m², o da 2.250 fino a 2.750 IU/m² di ossido di polialchilene-asparaginasi al soggetto. Per esempio, l'unità di dosaggio può fornire da 1.500 fino a 3.000 IU/m² di ossido di polialchilene-asparaginasi al soggetto. In certi casi, l'unità di

dosaggio fornisce da 2.000 fino a 2.750 IU/m² di ossido di polialchilene-asparaginasi al soggetto. In certi casi, l'unità di dosaggio fornisce da 2.250 fino a 2.750 IU/m² di ossido di polialchilene-asparaginasi al soggetto. Per esempio, l'unità di dosaggio può fornire 2.500 IU/m² di ossido di polialchilene-asparaginasi al soggetto.

In certe realizzazioni, l'unità di dosaggio comprende un tampone, come un tampone descritto in dettaglio in precedenza. Per esempio, l'unità di dosaggio può comprendere un tampone fosfato, e come tale può comprendere fosfato di sodio bibasico e fosfato di sodio monobasico.

In alcuni casi, l'unità di dosaggio comprende un tampone fosfato, e come tale può comprendere fosfato di sodio bibasico e fosfato di sodio monobasico. In certi casi, l'unità di dosaggio comprende fosfato di sodio bibasico in una quantità nell'intervallo da 0,5 fino a 10 mg/g, come da 1 fino a 9 mg/g, o da 1 fino a 8 mg/g, o da 1 fino a 7 mg/g, o da 2 fino a 7 mg/g, o da 3 fino a 6 mg/g, o da 4 fino a 6 mg/g, o da 5 fino a 6 mg/g. Per esempio, l'unità di dosaggio può comprendere fosfato di sodio bibasico in una quantità nell'intervallo da 4 fino a 6 mg/g. In certi casi, l'unità di dosaggio comprende fosfato di sodio bibasico in una quantità nell'intervallo da 5 fino a 6 mg/g. Per esempio, l'unità di dosaggio può comprendere fosfato di sodio bibasico in una quantità di circa 5,5 mg/g, come 5,6 mg/g (o 5,58 mg/g). In certe realizzazioni, l'unità di dosaggio comprende fosfato di sodio monobasico in una quantità nell'intervallo da 0,05 fino a 5 mg/g, come da 0,1 fino a 4,5 mg/g, o da 0,1 fino a 4 mg/g, o da 0,1 fino a 3,5 mg/g, o da 0,1 fino a 3 mg/g, o da 0,1 fino a 2,5 mg/g, o da 0,1 fino a 2 mg/g, o da 0,5 fino a 2 mg/g, o da 1 fino a 2 mg/g, o da 1 fino a 1,5 mg/g. Per esempio, l'unità di dosaggio può comprendere fosfato di sodio monobasico in una quantità nell'intervallo da 1 fino a 2 mg/g. In certi casi, l'unità di dosaggio comprende fosfato di sodio monobasico in una quantità nell'intervallo da 1 fino a 1,5 mg/g. Per esempio, l'unità di dosaggio può comprendere fosfato di sodio monobasico in una quantità di 1,2 mg/g (o 1,29 mg/g).

In certe realizzazioni, l'unità di dosaggio comprende un sale. Sali adatti per l'uso nell'unità di dosaggio comprendono sali che sono compatibili con ossido di polialchilene-asparaginasi e adatti per la somministrazione a un soggetto, per esempio mediante iniezione o somministrazione intravenosa. Esempi di sali adatti comprendono cloruro di sodio, cloruro di potassio, cloruro di calcio, cloruro di magnesio e loro combinazioni.

In certi casi, l'unità di dosaggio comprende un sale, come cloruro di sodio. In alcuni casi, l'unità di dosaggio

comprende un sale (per esempio cloruro di sodio) in una quantità nell'intervallo da 1 fino a 20 mg/g, come da 1 fino a 19 mg/g, o da 1 fino a 18 mg/g, o da 1 fino a 17 mg/g, o da 1 fino a 16 mg/g, o da 1 fino a 15 mg/g, o da 2 fino a 15 mg/g, o da 3 fino a 15 mg/g, o da 4 fino a 15 mg/g, o da 5 fino a 14 mg/g, o da 5 fino a 13 mg/g, o da 5 fino a 12 mg/g, o da 5 fino a 11 mg/g, o da 5 fino a 10 mg/g, o da 5 fino a 9 mg/g, o da 6 fino a 9 mg/g, o da 7 fino a 9 mg/g, o da 8 fino a 9 mg/g.

Per esempio, l'unità di dosaggio può comprendere un sale (per esempio cloruro di sodio) in una quantità nell'intervallo da 1 fino a 10 mg/g. In certi casi, l'unità di dosaggio comprende un sale (per esempio cloruro di sodio) in una quantità nell'intervallo da 5 fino a 10 mg/g. In certi casi, l'unità di dosaggio comprende un sale (per esempio cloruro di sodio) in una quantità nell'intervallo da 6 fino a 9 mg/g. In certi casi, l'unità di dosaggio comprende un sale (per esempio cloruro di sodio) in una quantità nell'intervallo da 8 fino a 9 mg/g. Per esempio, l'unità di dosaggio può comprendere un sale (per esempio cloruro di sodio) in una quantità di 8,5 mg/g.

In alcuni casi, la formulazione che viene somministrata a un soggetto è una formulazione liquida di PEG-asparaginasi nota commercialmente come Oncaspar[®] che è approvata per la commercializzazione dalla U.S. Food and Drug Administration. Oncaspar[®] (pegaspargasi) è L-asparaginasi (L-asparagina amidoidrolasi) che è coniugata covalentemente a monometossipolietilenglicole (mPEG), che è presente in una soluzione sterile isotonica, priva di conservanti, incolore, limpida, in soluzione salina tamponata con fosfato, pH 7,3. Ciascun millilitro contiene 750 ± 150 Unità Internazionali di pegaspargasi, fosfato di sodio bibasico, USP (5,58 mg), fosfato di sodio monobasico, USP (1,20 mg), e cloruro di sodio, USP (9,5 mg), in acqua per iniezione, USP.

In certe realizzazioni, l'unità di dosaggio somministrata al soggetto è una unità di dosaggio preparata da una composizione liofilizzata, per esempio una composizione stabile alla conservazione liofilizzata come descritto in questa sede. L'unità di dosaggio preparata dalla composizione liofilizzata può essere un dosaggio liquido. Oltre a ossido di polialchilene-asparaginasi, realizzazioni dell'unità di dosaggio (per esempio un dosaggio ricostituito da una composizione liofilizzata) possono comprendere un tampone, un sale e uno zucchero.

In certe realizzazioni, l'unità di dosaggio ricostituita comprende un tampone, come un tampone descritto in dettaglio in precedenza. In alcuni casi, l'unità di dosaggio ricostituita comprende fosfato di sodio bibasico in una

quantità nell'intervallo da 0,5 fino a 10 mg/g, come da 1 fino a 9 mg/g, o da 1 fino a 8 mg/g, o da 1 fino a 7 mg/g, o da 1 fino a 6 mg/g, o da 1 fino a 5 mg/g, o da 1 fino a 4 mg/g, o da 2 fino a 4 mg/g, o da 2 fino a 3 mg/g, o da 2,5 fino a 3 mg/g. Per esempio, l'unità di dosaggio ricostituita può comprendere fosfato di sodio bibasico in una quantità nell'intervallo da 1 fino a 5 mg/g. In certi casi, l'unità di dosaggio ricostituita può comprendere fosfato di sodio bibasico in una quantità nell'intervallo da 2 fino a 4 mg/g. In certi casi, l'unità di dosaggio ricostituita può comprendere fosfato di sodio bibasico in una quantità nell'intervallo da 2,5 fino a 3 mg/g. Per esempio, l'unità di dosaggio ricostituita può comprendere fosfato di sodio bibasico in una quantità di circa 3 mg/g, come 2,8 mg/g (o 2,79 mg/g). In certe realizzazioni, l'unità di dosaggio ricostituita comprende fosfato di sodio monobasico in una quantità nell'intervallo da 0,05 fino a 1 mg/g, come da 0,1 fino a 0,9 mg/g, o da 0,1 fino a 0,8 mg/g, o da 0,2 fino a 0,8 mg/g, o da 0,3 fino a 0,8 mg/g, o da 0,4 fino a 0,8 mg/g, o da 0,45 fino a 0,75 mg/g, o da 0,5 fino a 0,7 mg/g. Per esempio, l'unità di dosaggio ricostituita comprende fosfato di sodio monobasico in una quantità nell'intervallo da 0,45 fino a 0,75 mg/g. In certi casi, l'unità di dosaggio ricostituita comprende fosfato di sodio monobasico in una quantità nell'intervallo da 0,5 fino a 0,7 mg/g. Per esempio, l'unità di dosaggio ricostituita può comprendere fosfato di sodio monobasico in una quantità di 0,6 mg/g.

In certe realizzazioni, l'unità di dosaggio ricostituita comprende un sale, come un sale descritto in dettaglio in precedenza. In certi casi, l'unità di dosaggio ricostituita comprende un sale, come cloruro di sodio. In alcuni casi, l'unità di dosaggio ricostituita comprende un sale (per esempio cloruro di sodio) in una quantità nell'intervallo da 0,5 fino a 10 mg/g, come da 1 fino a 9 mg/g, o da 1 fino a 8 mg/g, o da 1 fino a 7 mg/g, o da 1 fino a 6 mg/g, o da 1 fino a 5 mg/g, o da 2 fino a 5 mg/g, o da 3 fino a 5 mg/g, o da 4 fino a 5 mg/g, o da 4 fino a 4,5 mg/g. Per esempio, l'unità di dosaggio ricostituita può comprendere un sale (per esempio cloruro di sodio) in una quantità nell'intervallo da 1 fino a 10 mg/g. In certi casi, l'unità di dosaggio ricostituita comprende un sale (per esempio cloruro di sodio) in una quantità nell'intervallo da 3 fino a 5 mg/g. In certi casi, l'unità di dosaggio ricostituita comprende un sale (per esempio cloruro di sodio) in una quantità nell'intervallo da 4 fino a 4,55 mg/g. Per esempio, l'unità di dosaggio ricostituita può comprendere un sale (per esempio cloruro di sodio) in una quantità di circa 4 mg/g, come 4,25 mg/g.

In certe realizzazioni, l'unità di dosaggio ricostituita comprende uno zucchero, come uno zucchero descritto in dettaglio in precedenza. In certi casi, l'unità di dosaggio ricostituita comprende uno zucchero, come un disaccaride. In alcuni casi, l'unità di dosaggio ricostituita comprende uno zucchero, come saccarosio. In alcuni casi, l'unità di dosaggio ricostituita comprende una quantità di zucchero (per esempio saccarosio) nell'intervallo da 1 fino a 250 mg/g, come da 5 fino a 200 mg/g, o da 10 fino a 150 mg/g, o da 10 fino a 100 mg/g, o da 10 fino a 90 mg/g, o da 10 fino a 80 mg/g, o da 20 fino a 70 mg/g, o da 20 fino a 60 mg/g, o da 30 fino a 50 mg/g, o da 40 fino a 50 mg/g. Per esempio, l'unità di dosaggio ricostituita può comprendere uno zucchero (per esempio saccarosio) in una quantità nell'intervallo da 10 fino a 100 mg/g. In certi casi, l'unità di dosaggio ricostituita può comprendere uno zucchero (per esempio saccarosio) in una quantità nell'intervallo da 30 fino a 50 mg/g. In certi casi, l'unità di dosaggio ricostituita può comprendere uno zucchero (per esempio saccarosio) in una quantità nell'intervallo da 40 fino a 50 mg/g. Per esempio, l'unità di dosaggio ricostituita può comprendere uno zucchero (per esempio saccarosio) in una quantità di 45 mg/g.

In certe realizzazioni, l'unità di dosaggio (per esempio liquida o ricostituita) ha un pH compatibile con condizioni fisiologiche. In alcuni casi, il pH dell'unità di dosaggio è nell'intervallo da 6 fino a 8. In alcuni casi, il pH dell'unità di dosaggio è nell'intervallo da 7 fino a 8. Per esempio, il pH dell'unità di dosaggio può essere nell'intervallo da 7 fino a 7,5. In alcuni casi, il pH dell'unità di dosaggio è 7,2. In alcuni casi, il pH dell'unità di dosaggio è 7,3. In alcuni casi, il pH dell'unità di dosaggio è 7,4.

In certe realizzazioni, che non sono rivendicate, il metodo può comprendere la somministrazione dell'unità di dosaggio al soggetto per deamminare asparagine nel soggetto. La via di somministrazione può venire scelta secondo una varietà di fattori comprendenti la condizione da trattare, il tipo di composizione e/o dispositivo usati, il paziente da trattare. Vie di somministrazione utili nei metodi descritti comprendono le vie orale e parenterale, come intravenosa (iv), intraperitoneale (ip), intramuscolare (im), rettale, topica, oftalmica, nasale e transdermica. Per esempio, composizioni adatte per iniezione possono venire somministrate mediante la via di somministrazione intravenosa, intramuscolare, intradermica, sottocutanea, sublinguale, intraossea o altra.

In alcuni casi, la somministrazione dell'unità di dosaggio al soggetto comprende la somministrazione intravenosa

dell'unità di dosaggio al soggetto. In alcuni casi, la somministrazione dell'unità di dosaggio al soggetto comprende la somministrazione intramuscolare dell'unità di dosaggio al soggetto.

In alcuni casi, la somministrazione dell'unità di dosaggio ricostituita al soggetto comprende la somministrazione intravenosa dell'unità di dosaggio ricostituita al soggetto. In alcuni casi, la somministrazione dell'unità di dosaggio ricostituita al soggetto comprende la somministrazione intramuscolare dell'unità di dosaggio ricostituita al soggetto.

In certe realizzazioni, che non sono rivendicate, il metodo comprende la somministrazione dell'unità di dosaggio al soggetto secondo un regime di trattamento. Per esempio, in alcuni casi, a un soggetto da trattare può essere stato prescritto un regime di trattamento da un operatore sanitario. In alcuni casi, un regime di trattamento comprende somministrazione cinque volte al giorno, quattro volte al giorno, tre volte al giorno, due volte al giorno, una volta al giorno, tre volte alla settimana, due volte alla settimana, una volta alla settimana, una volta ogni due settimane, una volta ogni tre settimane, una volta al mese, una volta ogni 5 settimane, una volta ogni 6 settimane, una volta ogni 7 settimane, una volta ogni due mesi, e qualsiasi loro combinazione.

In alcune realizzazioni, il regime di trattamento comprende la somministrazione di una o più dosi per un periodo di tempo prolungato. In certi casi, una dose singola (per esempio una unità di dosaggio singola) viene somministrata al soggetto, e la dose iniziale può essere seguita da una o più dosi somministrate al soggetto in un tempo successivo. In alcuni casi, più di una dose (per esempio più di una unità di dosaggio) viene somministrata al soggetto, e le dosi iniziali possono essere seguite da una o più dosi somministrate al soggetto in un tempo successivo. Per esempio, una dose singola (per esempio una singola unità di dosaggio) può venire somministrata al soggetto, e la dose singola può venire seguita da una dose singola somministrata al soggetto in un tempo successivo. Dosi singole addizionali possono venire somministrate in punti di tempo successivi. In altri casi, una dose singola (per esempio una singola unità di dosaggio) può venire somministrata al soggetto, e la dose singola può venire seguita da due dosi somministrate al soggetto in un tempo successivo. Dosi singole o multiple addizionali possono venire somministrate in punti di tempo successivi.

In certi casi, il regime di trattamento comprende fasi multiple. Il regime di trattamento può comprendere fasi

multiple in cui il programma di dosaggio è diverso in ciascuna fase del regime di trattamento. In alcuni casi, a un soggetto viene prescritto un regime di trattamento con due fasi; una fase di induzione e una fase di consolidamento. In certi casi, a un soggetto viene prescritto un regime di trattamento con due fasi in cui il programma di dosaggio della prima fase è diverso dal programma di dosaggio nella seconda fase. Per esempio, a un soggetto può venire prescritto un regime di trattamento con due fasi comprendenti una fase di induzione e una fase di consolidamento, in cui il programma di dosaggio della fase di induzione è diverso dal programma di dosaggio della fase di consolidamento. In altre realizzazioni, a un soggetto può venire prescritto un regime di trattamento con tre fasi; una fase di induzione, una fase di consolidamento e una fase di mantenimento. In alcuni casi, a un soggetto viene prescritto un regime di trattamento con tre fasi comprendenti una fase di induzione, una fase di consolidamento e una fase di mantenimento, in cui il programma di dosaggio di ciascuna fase è diverso dalle altre fasi. Per esempio, a un soggetto può venire prescritto un regime di trattamento con tre fasi comprendenti una fase di induzione, una fase di consolidamento e una fase di mantenimento, in cui i programmi di dosaggio della fase di induzione, della fase di consolidamento e della fase di mantenimento sono ciascuno differente dagli altri.

In certe realizzazioni, il periodo di tempo di trattamento durante ciascuna fase del regime di trattamento è uguale, o in altri casi può essere diverso. Per esempio, il periodo di tempo durante la fase di induzione può essere una settimana o più, come 2 settimane o più, o 3 settimane o più, o 4 settimane o più, o 5 settimane o più, o 6 settimane o più, o 7 settimane o più, o 8 settimane o più. In alcuni casi, il periodo di tempo durante la fase di induzione è 4 settimane. In alcuni casi, il periodo di tempo durante la fase di induzione è 5 settimane.

In certe realizzazioni, il periodo di tempo durante la fase di consolidamento è una settimana o più, come 2 settimane o più, o 3 settimane o più, o 4 settimane o più, o 5 settimane o più, o 6 settimane o più, o 7 settimane o più, o 8 settimane o più, o 9 settimane o più, o 10 settimane o più, o 11 settimane o più, o 12 settimane o più, o 13 settimane o più, o 14 settimane o più, o 15 settimane o più, o 16 settimane o più, o 17 settimane o più, o 18 settimane o più, o 19 settimane o più, o 20 settimane o più, o 21 settimane o più, o 22 settimane o più, o 23 settimane o più, o 24 settimane o più, o 25 settimane o più, o 26 settimane o più, o 27 settimane o più, o 28 settimane o più, o 29 settimane o più, o 30 settimane o più, o 31 settimane o più, o 32 settimane o più. In alcuni casi, il periodo di tempo

durante la fase di consolidamento è 8 settimane. In alcuni casi, il periodo di tempo durante la fase di consolidamento è 27 settimane. In alcuni casi, il periodo di tempo durante la fase di consolidamento è 30 settimane. In certe realizzazioni, il periodo di tempo durante la fase di mantenimento è una settimana o più, come 2 settimane o più, o 3 settimane o più, o 4 settimane o più, o 5 settimane o più, o 6 settimane o più, o 7 settimane o più, o 8 settimane o più, o 9 settimane o più, o 10 settimane o più, o 12 settimane o più, o 16 settimane o più, o 20 settimane o più, o 24 settimane o più, o 28 settimane o più, o 32 settimane o più, o 36 settimane o più, o 40 settimane o più, o 44 settimane o più, o 48 settimane o più, o 52 settimane o più, o 56 settimane o più, o 60 settimane o più, o 64 settimane o più, o 68 settimane o più, o 72 settimane o più, o 76 settimane o più, o 80 settimane o più, o 84 settimane o più, o 88 settimane o più, o 92 settimane o più, o 96 settimane o più, o 100 settimane o più, o 104 settimane o più, o 108 settimane o più, o 112 settimane o più, o 116 settimane o più, o 120 settimane o più, o 124 settimane o più, o 128 settimane o più, o 132 settimane o più, o 136 settimane o più, o 140 settimane o più, o 144 settimane o più, o 148 settimane o più, o 152 settimane o più, o 156 settimane o più, o 160 settimane o più, o 164 settimane o più, o 168 settimane o più, o 172 settimane o più, o 176 settimane o più, o 180 settimane o più. In alcuni casi, il periodo di tempo durante la fase di mantenimento è 8 settimane. In alcuni casi, il periodo di tempo durante la fase di mantenimento è 88 settimane. In alcuni casi, il periodo di tempo durante la fase di mantenimento è 104 settimane. In alcuni casi, il periodo di tempo durante la fase di consolidamento è 140 settimane. In alcuni casi, il periodo di tempo durante la fase di mantenimento è 156 settimane. In alcuni casi, il periodo di tempo durante la fase di mantenimento è nell'intervallo da 88 fino a 104 settimane. In alcuni casi, il periodo di tempo durante la fase di mantenimento è nell'intervallo da 88 fino a 140 settimane. In alcuni casi, il periodo di tempo durante la fase di mantenimento è nell'intervallo da 88 fino a 156 settimane.

Esempi dei regimi di trattamento che possono venire somministrati a un soggetto comprendono quelli descritti in questa sede. In certe realizzazioni, il regime di trattamento comprende la somministrazione di una unità di dosaggio singola a un soggetto in una fase di induzione e unità di dosaggio multiple durante una fase di mantenimento. In certe realizzazioni, il regime di trattamento comprende la somministrazione di una unità di dosaggio singola a un soggetto in una fase di induzione e unità di dosaggio multiple durante una fase di consolidamento. Per esempio, le

unità di dosaggio multiple possono venire somministrate al soggetto somministrando una unità di dosaggio al soggetto ogni 3 settimane (per esempio durante la fase di consolidamento). In alcuni casi, una unità di dosaggio singola viene somministrata al soggetto una volta ogni 3 settimane. Come descritto in precedenza, la fase di consolidamento può essere di 30 settimane, e quindi un totale di 10 unità di dosaggio può venire somministrato al soggetto (per esempio una unità di dosaggio singola può venire somministrata al soggetto una volta ogni 3 settimane per 30 settimane). Unità di dosaggio addizionali (o meno) possono venire somministrate al soggetto fra la fase di induzione e la fase di consolidamento, o dopo la fase di consolidamento, come desiderato o prescritto da un operatore sanitario.

In altri esempi, il regime di trattamento può comprendere la somministrazione di una unità di dosaggio singola a un soggetto in una fase di induzione e unità di dosaggio multiple durante una fase di consolidamento, in cui le unità di dosaggio multiple possono venire somministrate al soggetto somministrando una unità di dosaggio al soggetto ogni 2 settimane. In alcuni casi, una unità di dosaggio singola viene somministrata al soggetto una volta ogni 2 settimane. Come suddescritto, la fase di consolidamento può essere di 30 settimane, e quindi un totale di 15 unità di dosaggio può venire somministrato al soggetto (per esempio una unità di dosaggio singola può venire somministrata al soggetto una volta ogni 2 settimane per 30 settimane). Unità di dosaggio addizionali (o meno) possono venire somministrate al soggetto fra la fase di induzione e la fase di consolidamento, o dopo la fase di consolidamento, come desiderato o prescritto da un operatore sanitario.

In altre realizzazioni, il regime di trattamento comprende la somministrazione di una unità di dosaggio singola a un soggetto in una fase di induzione, unità di dosaggio multiple durante una fase di consolidamento, e unità di dosaggio multiple durante una fase di mantenimento. Per esempio, le unità di dosaggio multiple durante la fase di consolidamento possono venire somministrate al soggetto certi giorni dopo l'inizio della fase di consolidamento. In alcuni casi, le unità di dosaggio multiple durante la fase di consolidamento possono venire somministrate al soggetto somministrando più di una unità di dosaggio al soggetto contemporaneamente. Per esempio, le unità di dosaggio multiple durante la fase di consolidamento possono venire somministrate al soggetto somministrando più di una unità di dosaggio al soggetto un giorno particolare dopo l'inizio della fase di consolidamento e più di

una unità di dosaggio al soggetto un giorno successivo durante la fase di consolidamento. Un esempio di questo regime di trattamento può comprendere la somministrazione di 2 unità di dosaggio al soggetto il giorno 15 dopo l'inizio della fase di consolidamento e 2 unità di dosaggio il giorno 43 dopo l'inizio della fase di consolidamento. Unità di dosaggio addizionali (o meno) possono venire somministrate al soggetto fra la fase di induzione e la fase di consolidamento, o dopo la fase di consolidamento, ma prima della fase di mantenimento, come desiderato o prescritto da un operatore sanitario.

In certe realizzazioni, le unità di dosaggio multiple durante la fase di mantenimento possono venire somministrate al soggetto certi giorni dopo l'inizio della fase di mantenimento. In alcuni casi, le unità di dosaggio multiple durante la fase di mantenimento possono venire somministrate al soggetto somministrando più di una unità di dosaggio al soggetto contemporaneamente. Per esempio, le unità multiple durante la fase di mantenimento possono venire somministrate al soggetto somministrando più di una unità di dosaggio al soggetto un giorno particolare dopo l'inizio della fase di mantenimento e più di una unità di dosaggio al soggetto un giorno successivo durante la fase di mantenimento. Un esempio di questo tipo di regime di trattamento può comprendere la somministrazione di 2 unità di dosaggio al soggetto il giorno 2 dopo l'inizio della fase di mantenimento e 2 unità di dosaggio il giorno 22 dopo l'inizio della fase di mantenimento. Un altro esempio di un regime di trattamento durante la fase di mantenimento può comprendere la somministrazione di 2 unità di dosaggio al soggetto il giorno 4 dopo l'inizio della fase di mantenimento e 2 unità di dosaggio il giorno 43 dopo l'inizio della fase di mantenimento. In alcuni casi, un regime di trattamento può comprendere fasi di mantenimento multiple. In certi casi, il programma di dosaggio durante ciascuna fase di mantenimento può essere uguale, o in altri casi il programma di dosaggio durante ciascuna fase di mantenimento può essere diverso. Unità di dosaggio addizionali (o meno) possono venire somministrate al soggetto fra la fase di consolidamento e la fase di mantenimento, o dopo la fase di mantenimento, o fra fasi di mantenimento diverse, come desiderato o prescritto da un operatore sanitario.

In certe realizzazioni, le unità di dosaggio della presente descrizione possono venire somministrate prima di, contemporaneamente con o dopo altri agenti attivi per trattare condizioni correlate o non correlate, per esempio in terapia in combinazione. Esempi di tali terapie addizionali comprendono radioterapie, terapie chirurgiche e terapie

chemioterapeutiche. Se fornite contemporaneamente ad altri agenti attivi, le unità di dosaggio della presente descrizione possono venire fornite nella stessa formulazione o in una diversa. Per esempio, terapia contemporanea può venire ottenuta somministrando una unità di dosaggio e una composizione farmaceutica avente almeno un altro agente attivo, come un agente chemioterapeutico, che in combinazione forniscono una dose terapeuticamente efficace, secondo un particolare regime di trattamento. La somministrazione di composizioni farmaceutiche separate può venire eseguita simultaneamente o a tempi differenti (per esempio sequenzialmente, in qualsiasi ordine, lo stesso giorno o in giorni diversi), purché l'effetto terapeuticamente efficace della combinazione di queste sostanze venga causato nel soggetto sottoposto a terapia.

Per conseguenza, aspetti della presente descrizione comprendono inoltre terapie in combinazione. In certe realizzazioni, il metodo in oggetto comprende la somministrazione di una quantità terapeuticamente efficace di uno o più agenti attivi addizionali. Con terapia in combinazione si intende che ossido di polialchilene-asparaginasi (per esempio come descritto in questa sede) può venire usato in una combinazione con un altro agente terapeutico per trattare una malattia o condizione singola. In certe realizzazioni, un composto della presente descrizione viene somministrato contemporaneamente con la somministrazione di un altro agente terapeutico, che può venire somministrato come un componente di una composizione comprendente il composto della presente descrizione o come un componente di una composizione diversa. In certe realizzazioni, una composizione comprendente un composto della presente descrizione viene somministrata prima della o dopo la somministrazione di un altro agente terapeutico.

I composti in oggetto possono venire usati congiuntamente con qualsiasi agente utile nel trattamento di una condizione neoplastica, come agenti anti-cancro e agenti anti-tumorali. Una classe di agenti anti-cancro di interesse comprende agenti chemioterapeutici. "Chemioterapia" indica la somministrazione di uno o più farmaci chemioterapeutici e/o altri agenti a un paziente affetto da cancro mediante vari metodi, comprendenti intravenoso, orale, intramuscolare, intraperitoneale, intravescicale, sottocutaneo, transdermico, buccale o inalazione. Agenti di interesse che possono venire usati congiuntamente con i composti in oggetto comprendono agenti chemioterapeutici per il cancro, agenti che agiscono per ridurre la proliferazione cellulare, agenti antimetaboliti,

agenti che interessano i microtubuli, modulatori di ormoni e steroidi, prodotti naturali e modificatori della risposta biologica, per esempio come descritto più in dettaglio in seguito.

Agenti chemioterapeutici per il cancro comprendono composti non peptidici (cioè non proteici) che riducono la proliferazione di cellule cancerose, e comprendono agenti citotossici e agenti citostatici. Esempi non limitativi di agenti chemioterapeutici comprendono agenti alchilanti, nitrosouree, antimetaboliti, antibiotici antitumorali, alcaloidi di piante (vinca) e ormoni steroidei. Possono anche venire usati composti peptidici. Agenti chemioterapeutici per il cancro adatti comprendono dolastatina e suoi analoghi e derivati attivi; e auristatina e suoi analoghi e derivati attivi (per esempio monometil auristatina D (MMAD), monometil auristatina E (MMAE), monometil auristatina F (MMAF)). Vedere, per esempio, WO 96/33212, WO 96/14856 e U.S. 6.323.315. Per esempio, dolastatina 10 o auristatina PE può venire inclusa in un coniugato anticorpo-farmaco della presente descrizione. Agenti chemioterapeutici per il cancro adatti comprendono anche maitansinoidi e loro analoghi e derivati attivi (vedere, per esempio, EP 1391213; e Liu et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623); duocarmicine e loro analoghi e derivati attivi (per esempio comprendenti gli analoghi sintetici KW-2189 e CB 1-TM1); e benzodiazepine e loro analoghi e derivati attivi (per esempio pirrolobenzodiazepina (PBD)).

Agenti che agiscono per ridurre la proliferazione cellulare sono noti nella tecnica e largamente usati. Tali agenti comprendono agenti alchilanti come mostarde azotate, nitrosouree, derivati di etilenimina, alchilsolfonati e triazeni, comprendenti mecloretamina, ciclofosfamide (CytoxanTM), melphalan (L-sarcolisina), carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), semustina (metil-CCNU), streptozocina, clorozotocina, mostarda di uracile, clormetino, ifosfamide, clorambucile, pipobromano, trietilenmelamina, trietilenti fosforamina, busulfan, dacarbazina e temozolomide.

Agenti antimetabolitici comprendono analoghi dell'acido folico, analoghi di pirimidina, analoghi di purina e inibitori di adenosina deamminasi, comprendenti citarabina (CYTOSAR-U), citosina arabinoside, fluorouracile (5-FU), floxuridina (FudR), 6-tioguanina, 6-mercaptopurina (6-MP), pentostatina, 5-fluorouracile (5-FU), metotrexato, 10-propargil-5,8-dideazafolato (PDDF, CB3717), acido 5,8-dideazatetraidrofolic (DDATHF), leucovorina, fludarabina fosfato, pentostatina e gemcitabina.

Prodotti naturali e loro derivati adatti (per esempio alcaloidi vinca, antibiotici antitumorali, enzimi, linfochine ed epipodofilottossine) comprendono Ara-C, paclitaxel (Taxol[®]), docetaxel (Taxotere[®]), deossicoformicina, mitomicina-C, azatioprina; brequinar; alcaloidi, per esempio vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, ecc.; podofilottossine, per esempio etoposide, teniposide, ecc.; antibiotici, per esempio antraciclina, daunorubicina cloridrato (daunomicina, rubidomicina, cerubidina), idarubicina, doxorubicina, epirubicina e derivati di morfolino, ecc.; fenoxizone bisciclopeptidi, per esempio dactinomicina; glicopeptidi basici, per esempio bleomicina; glicosidi di antrachinone, per esempio plicamicina (mitramicina); antracendioni, per esempio mitoxantrone; azirinopirrolindoldioni, per esempio mitomicina; immunosoppressori macrociclici, per esempio ciclosporina, FK-506 (tacrolimo, prograf), rapamicina, ecc.

Altri agenti citotossici anti-proliferativi sono navelbene, CPT-11, anastrozolo, letrozolo, capecitabina, reloxafina, ciclofosfamide, ifosammide e droloxafine. Agenti che influenzano i microtubuli che hanno attività antiproliferativa sono anche adatti per l'uso e comprendono allocolchicina (NSC 406042), alicondrina B (NSC 609395), colchicina (NSC 757), derivati di colchicina (per esempio NSC 33410), dolstatina 10 (NSC 376128), maitansina (NSC 153858), rizoxina (NSC 332598), paclitaxel (Taxol[®]), derivati di Taxol[®], docetaxel (Taxotere[®]), tiocolchicina (NSC 361792), tritilcisterina, vinblastina solfato, vincristina solfato, eptiloni naturali e sintetici comprendenti eptilone A, eptilone B, discodermolide; estramustina, nocodazolo.

Modulatori di ormoni e steroidi (compresi analoghi sintetici) che sono adatti per l'uso comprendono adrenocorticosteroidi, per esempio prednisone, dexametasone, ecc.; estrogeni e progestinici, per esempio idrossiprogesterone caproato, medrossiprogesterone acetato, megesterol acetato, estradiolo, clomifene, tamoxifene; ecc.; e soppressori corticosurrenali, per esempio amminoglutetimmide; 17 α -etinilestradiolo; dietilstilbestrolo, testosterone, fluossimesterone, dromostanolone propionato, testolattone, metilprednisolone, metil-testosterone, prednisolone, triamcinolone, clortrianisene, idrossiprogesterone, amminoglutetimmide, estramustina, medrossiprogesterone acetato, leuprolide, flutammide (Drogenil), toremifene (Fareston) e Zoladex[®]. Gli estrogeni stimolano la proliferazione e la differenziazione; quindi, composti che si legano al recettore degli estrogeni vengono usati per bloccare questa attività. I corticosteroidi possono inibire la proliferazione di cellule T.

Altri agenti chemioterapeutici adatti comprendono complessi di metallo, per esempio cisplatino (cis-DDP), carboplatino, ecc.; uree, per esempio idrossiurea; e idrazine, per esempio N-metilidrazina; epidofillotossina; un inibitore di topoisomerasi; procarbazina; mitoxantrone; leucovorina; tegafur; ecc. Altri agenti anti-proliferativi di interesse comprendono immunosoppressori, per esempio acido micofenolico, talidomide, desossispergualina, azasporina, leflunomide, mizoribina, azaspirano (SKF 105685); Iressa® (ZD 1839, 4-(3-cloro-4-fluorofenilammino)-7-metossi-6-(3-(4-morfolinil)propossi)chinazolina); ecc.

I tassani sono adatti per l'uso. I "tassani" comprendono paclitaxel, nonché qualsiasi derivato o pro-farmaco di tassano attivo. "Paclitaxel" (che può venire compreso in questa sede per comprendere analoghi, formulazioni e derivati come, per esempio, docetaxel, TAXOL™, TAXOTERE™ (una formulazione di docetaxel), analoghi 10-desacetilici di paclitaxel e analoghi 3'N-desbenzoil-3'N-t-butossicarbonilici di paclitaxel) può venire preparato facilmente utilizzando tecniche note agli esperti nella tecnica (vedere anche WO 94/07882, WO 94/07881, WO 94/07880, WO 94/07876, WO 93/23555, WO 93/10076; brevetti U.S. n. 5,294,637; 5,283,253; 5,279,949; 5,274,137; 5,202,448; 5,200,534; 5,229,529; ed EP 590.267), o ottenuto da una varietà di fonti del commercio comprendenti, per esempio, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. (T7402 ottenuto da *Taxus brevifolia*; o T-1912 ottenuto da *Taxus yunnanensis*). Si comprenderà che paclitaxel non si riferisce solo alla forma comune chimicamente disponibile di paclitaxel, ma ad analoghi e derivati (per esempio Taxotere™ docetaxel, come indicato in precedenza) e coniugati di paclitaxel (per esempio paclitaxel-PEG, paclitaxel-destrano o paclitaxel-xilosio). È anche inclusa nel termine "tassano" una varietà di derivati noti comprendenti derivati idrofili e derivati idrofobi. I derivati di tassano comprendono derivati di galattosio e mannosio descritti nella domanda di brevetto internazionale n. WO 99/18113; piperazino e altri derivati descritti in WO 99/14209; derivati di tassano descritti in WO 99/09021, WO 98/22451 e nel brevetto U.S. n. 5.869.680; 6-tio-derivati descritti in WO 98/28288; derivati di solfonammide descritti nel brevetto U.S. n. 5.821.263; e derivato di tassolo descritto nel brevetto U.S. n. 5.415.869. Esso comprende inoltre profarmaci di paclitaxel comprendenti quelli descritti in WO 98/58927; WO 98/13059; e nel brevetto U.S. n. 5.824.701.

Modificatori della risposta biologica adatti per l'uso comprendono (1) inibitori dell'attività di tirosina chinasi

(RTK); (2) inibitori dell'attività di serina/treonina chinasi; (3) antagonisti antigenici associati a tumore come anticorpi che si legano specificamente a un antigene tumorale; (4) agonisti del recettore dell'apoptosi; (5) interleuchina-2; (6) IFN- α ; (7) IFN- γ ; (8) fattori di stimolazione della colonia; e (9) inibitori dell'angiogenesi.

Soggetti che possono venire trattati usando i metodi e le composizioni della presente descrizione comprendono soggetti di qualsiasi età. In alcuni casi, il soggetto può essere un adulto. Per esempio, un soggetto adulto umano può avere 18 anni o più. Soggetti che possono venire trattati usando i metodi e le composizioni della presente descrizione comprendono anche soggetti giovani. Per esempio, un soggetto giovane umano può avere meno di 18 anni di età. In alcuni casi, i soggetti sono nell'intervallo di età da un mese fino a 18 anni, come da un anno fino a 18 anni, comprendenti da 2 anni fino a 18 anni, per esempio da 5 anni fino a 16 anni.

In alcuni casi, i metodi comprendono il diagnosticare un soggetto avente AML. Un soggetto può venire diagnosticato come avente AML usando qualsiasi protocollo conveniente. In alcuni casi, viene impiegato il sistema di classificazione francese, statunitense e britannico (FAB) per diagnosticare e classificare leucemia mieloide acuta. La diagnosi di leucemia mieloide acuta richiede che i mieloblasti costituiscano il 30% (o il 20% in base a un recente sistema di classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS)) o più delle cellule del midollo osseo o dei globuli bianchi circolanti. Le proprietà ematologiche della malattia definiscono i vari sottotipi descritti in seguito. La nomenclatura FAB (da M1 fino a M7) classifica i sottotipi di leucemia mieloide acuta in base a elementi del midollo normale ai quali i blasti assomigliano strettamente. In alcuni casi, i metodi comprendono la determinazione dell'idoneità di un soggetto diagnosticato come avente AML per il trattamento usando una composizione di ossido di polialchilene-asparaginasi, per esempio come descritto in questa sede. In alcuni casi, i metodi comprendono il controllo dell'efficacia del trattamento. L'efficacia del trattamento può venire controllata usando qualsiasi protocollo conveniente.

METODI DI PREPARAZIONE

Aspetti della presente descrizione comprendono metodi di preparazione delle composizioni di ossido di polialchilene-asparaginasi descritte in questa sede. In certi casi, il metodo è un metodo di preparazione di una composizione di ossido di polialchilene-asparaginasi liquida come descritto in questa sede. Il metodo può

comprendere la produzione di una composizione acquosa che comprende ossido di polialchilene-asparaginasi avente un gruppo di ossido di polialchilene legato covalentemente mediante un legante a una asparaginasi, un tampone e un sale.

Realizzazioni dei metodi di preparazione della composizione di ossido di polialchilene-asparaginasi possono comprendere la produzione di una composizione concentrata acquosa. Per esempio, il metodo per la produzione della composizione concentrata acquosa può comprendere una o più delle fasi di: preparare una soluzione di asparaginasi (per esempio L-asparaginasi); attaccare un ossido di polialchilene (per esempio polietilenglicole) all'asparaginasi; chiarificare ossido di polialchilene-asparaginasi; filtrare e concentrare la soluzione di ossido di polialchilene-asparaginasi; diluire la soluzione di ossido di polialchilene-asparaginasi; filtrare la soluzione di ossido di polialchilene-asparaginasi e riempire la soluzione di ossido di polialchilene-asparaginasi in un contenitore sterile; e conservare la soluzione di ossido di polialchilene-asparaginasi.

Nel metodo per produrre la composizione concentrata acquosa, può venire preparata una soluzione di asparaginasi (per esempio L-asparaginasi). L'asparaginasi può venire miscelata con una soluzione, come una soluzione acquosa (per esempio una soluzione acquosa tamponata). Esempi di tamponi adatti comprendono un tampone fosfato, soluzione salina tamponata con fosfato (PBS), soluzione salina tamponata con fosfato di Dulbecco (DPBS), soluzione di sale equilibrata di Hank (HBSS), soluzione di sale equilibrata di Earle (EBSS), tampone Tris, tampone lattato di Ringer, tampone borato e loro combinazioni. Nell'invenzione rivendicata, l'asparaginasi viene miscelata con un tampone fosfato.

Il tampone fosfato comprende fosfato di sodio bibasico e fosfato di sodio monobasico. In alcuni casi, la quantità di fosfato di sodio bibasico nella composizione concentrata acquosa è nell'intervallo dallo 0,1 fino allo 0,8% in peso, o dallo 0,1 fino allo 0,7% in peso, o dallo 0,1 fino allo 0,6% in peso, o dallo 0,2 fino allo 0,6% in peso, o dallo 0,3 fino allo 0,6% in peso, o dallo 0,4 fino allo 0,6% in peso, o dallo 0,5 fino allo 0,6% in peso. In certi casi, il fosfato di sodio bibasico può essere presente nella composizione in una quantità nell'intervallo dallo 0,2 fino allo 0,8% in peso. In certi casi, il fosfato di sodio bibasico può essere presente nella composizione in una quantità nell'intervallo dallo 0,3 fino allo 0,6% in peso. In certi casi, il fosfato di sodio bibasico può essere presente nella

composizione in una quantità nell'intervallo dallo 0,5 fino allo 0,6% in peso. Per esempio, il fosfato di sodio bibasico può essere presente nella composizione in una quantità di circa lo 0,6% in peso, come 0,56% in peso (o 0,558% in peso). In certe realizzazioni, la quantità di fosfato di sodio monobasico nella composizione concentrata acquosa è nell'intervallo dallo 0,01 fino allo 0,4% in peso, o dallo 0,01 fino allo 0,2 % in peso, o dallo 0,02 fino allo 0,18% in peso, o dallo 0,03 fino allo 0,16% in peso, o dallo 0,04 fino allo 0,16% in peso, o dallo 0,045 fino allo 0,15% in peso, o dallo 0,04 fino allo 0,14% in peso, o dallo 0,05 fino allo 0,14% in peso, o dallo 0,1 fino allo 0,2% in peso, o dallo 0,1 fino allo 0,15% in peso. Per esempio, il fosfato di sodio monobasico può essere presente nella composizione concentrata acquosa in una quantità nell'intervallo dallo 0,05 fino allo 0,2 in peso. In certi casi, il fosfato di sodio monobasico può essere presente nella composizione in una quantità nell'intervallo dallo 0,01 fino allo 0,2% in peso. In certi casi, il fosfato di sodio monobasico può essere presente nella composizione in una quantità nell'intervallo dallo 0,09 fino allo 0,15% in peso. In certi casi, il fosfato di sodio monobasico può essere presente nella composizione in una quantità nell'intervallo dallo 0,1 fino allo 0,2% in peso. In certi casi, il fosfato di sodio monobasico può essere presente nella composizione in una quantità nell'intervallo dallo 0,1 fino allo 0,15% in peso. Per esempio, il fosfato di sodio monobasico può essere presente nella composizione in una quantità dello 0,12% in peso (o 0,129% in peso).

Componenti aggiuntivi inclusi nella composizione concentrata acquosa comprendono un sale. Esempi di sali adatti comprendono cloruro di sodio, cloruro di potassio, cloruro di calcio, cloruro di magnesio e loro combinazioni. In certi casi, il sale è cloruro di sodio. In alcuni casi, la quantità di sale (per esempio cloruro di sodio) nella composizione concentrata acquosa è nell'intervallo dallo 0,1 fino all'1% in peso, o dallo 0,2 fino all'1% in peso, o dallo 0,3 fino all'1% in peso, o dallo 0,4 fino all'1% in peso, o dallo 0,5 fino all'1% in peso, o dallo 0,6 fino all'1% in peso, o dallo 0,7 fino all'1% in peso, o dallo 0,8 fino all'1% in peso, o dallo 0,8 fino allo 0,9% in peso. Per esempio, il sale (per esempio cloruro di sodio) può essere presente nella composizione in una quantità nell'intervallo dallo 0,5 fino all'1% in peso. In certi casi, il sale (per esempio cloruro di sodio) può essere presente nella composizione in una quantità nell'intervallo dallo 0,7 fino all'1% in peso. In certi casi, il sale (per esempio cloruro di sodio) può essere presente nella composizione in una quantità nell'intervallo dallo 0,8 fino allo

0,9% in peso. Per esempio, il sale (per esempio cloruro di sodio) può essere presente nella composizione in una quantità dello 0,85% in peso.

Altri aspetti della presente descrizione comprendono metodi di preparazione delle composizioni stabili alla conservazione liofilizzate descritte in questa sede. In certi casi, il metodo è un metodo di preparazione di una composizione di ossido di polialchilene-asparaginasi liofilizzata come descritto in questa sede. Il metodo può comprendere la liofilizzazione di una composizione acquosa che comprende ossido di polialchilene-asparaginasi avente un gruppo di ossido di polialchilene legato covalentemente mediante un legante a una asparaginasi, un tampone, un sale e uno zucchero in un modo sufficiente per produrre una composizione di ossido di polialchilene-asparaginasi stabile alla conservazione liofilizzata.

In certe realizzazioni, liofilizzazione viene usata per disidratare la composizione concentrata acquosa. In alcuni casi, la liofilizzazione comprende la rimozione dell'acqua dalla composizione concentrata acquosa. L'acqua può venire rimossa sublimando l'acqua nella composizione. Per esempio, l'acqua nella composizione può subire una transizione di fase da un solido a un gas. In certi casi, la liofilizzazione comprende il congelamento della composizione (per esempio congelamento dell'acqua nella composizione) e quindi la riduzione della pressione che circonda la composizione affinché l'acqua nella composizione subisca sublimazione. Durante la liofilizzazione, la temperatura della composizione può venire ridotta, per esempio a una temperatura al disotto del punto di congelamento dell'acqua nella composizione. Per esempio, la temperatura della composizione può venire ridotta a 0°C o meno, o -5°C o meno, o -10°C o meno, o -15°C o meno, o -20°C o meno, o -25°C o meno, o -30°C o meno, o -35°C o meno, o -40°C o meno, o -45°C o meno, o -50°C o meno, o -55°C o meno, o -60°C o meno, o -65°C o meno, o -75°C o meno. In alcuni casi, la temperatura della composizione viene ridotta a -45°C. In alcuni casi, la temperatura della composizione viene ridotta a -30°C.

In certe realizzazioni, la pressione che circonda la composizione viene ridotta a meno della pressione atmosferica standard. L'unità SI per la pressione è Pascal, che può venire convertito come 1 Torr = 133.322 Pa. Per esempio, la pressione che circonda la composizione può venire ridotta a 500 T o meno, come 250 T o meno, o 100 T o meno, o 50 T o meno, o 10 T o meno, o 1 T o meno, o 500 mT o meno, o 400 mT o meno, o 300 mT o meno, o

200 mT o meno, o 100 mT o meno, o 90 mT o meno, o 80 mT o meno, o 70 mT o meno, o 60 mT o meno, o 50 mT o meno, o 40 mT o meno, o 30 mT o meno, o 20 mT o meno, o 10 mT o meno. In alcuni casi, la pressione che circonda la composizione viene ridotta a 60 mT o meno, come 50 mT.

In alcune realizzazioni, la liofilizzazione può anche comprendere l'aumento della temperatura della composizione mentre la pressione che circonda la composizione viene ridotta. Per esempio, la temperatura della composizione può venire aumentata da una temperatura minima come suddescritto fino a una temperatura maggiore della temperatura minima. In alcuni casi, la temperatura viene aumentata per facilitare la sublimazione dell'acqua nella composizione alla pressione circostante ridotta.

Realizzazioni del metodo di preparazione della composizione di ossido di polialchilene-asparaginasi liofilizzata possono anche comprendere la produzione della composizione concentrata acquosa, che viene successivamente liofilizzata. Un diagramma di flusso del procedimento di un metodo per produrre la composizione concentrata acquosa è mostrato nella FIGURA 1. Come mostrato nella FIGURA 1, il metodo per produrre la composizione concentrata acquosa può comprendere una o più delle fasi di: preparare una soluzione di asparaginasi (per esempio L-asparaginasi) (10); attaccare un ossido di polialchilene (per esempio polietilenglicole) all'asparaginasi (20); chiarificare ossido di polialchilene-asparaginasi (30); filtrare e concentrare la soluzione di ossido di polialchilene-asparaginasi (40); diluire la soluzione di ossido di polialchilene-asparaginasi (50); filtrare la soluzione di ossido di polialchilene-asparaginasi e riempire la soluzione di ossido di polialchilene-asparaginasi in un contenitore sterile (60); e conservare la soluzione di ossido di polialchilene-asparaginasi (70).

Nel metodo per produrre la composizione concentrata acquosa, può venire preparata una soluzione di asparaginasi (per esempio L-asparaginasi). L'asparaginasi può venire miscelata con una soluzione, come una soluzione acquosa (per esempio una soluzione acquosa tamponata). Esempi di tamponi adatti comprendono un tampone fosfato, soluzione salina tamponata con fosfato (PBS), soluzione salina tamponata con fosfato di Dulbecco (DPBS), soluzione di sale equilibrata di Hank (HBSS), soluzione di sale equilibrata di Earle (EBSS), tampone Tris, tampone lattato di Ringer, tampone borato e loro combinazioni. Nell'invenzione rivendicata, l'asparaginasi viene miscelata con un tampone fosfato.

Nell'invenzione rivendicata, il tampone fosfato comprende fosfato di sodio bibasico e fosfato di sodio monobasico. In alcuni casi, la quantità di fosfato di sodio bibasico nella composizione concentrata acquosa è nell'intervallo dallo 0,1 fino allo 0,8% in peso, o dallo 0,1 fino allo 0,7% in peso, o dallo 0,1 fino allo 0,6% in peso, o dallo 0,1 fino allo 0,5% in peso, o dallo 0,1 fino allo 0,4% in peso, o dallo 0,2 fino allo 0,4% in peso, o dallo 0,2 fino allo 0,3% in peso, o dallo 0,25 fino allo 0,3% in peso. Per esempio, il fosfato di sodio bibasico può essere presente nella composizione concentrata acquosa in una quantità nell'intervallo dallo 0,1 fino allo 0,5% in peso. La quantità di fosfato di sodio monobasico nella composizione concentrata acquosa è nell'intervallo dallo 0,01 fino allo 0,5% in peso, o dallo 0,01 fino allo 0,4% in peso, o dallo 0,01 fino allo 0,3% in peso, o dallo 0,01 fino allo 0,2% in peso, o dallo 0,01 fino allo 0,1% in peso, o dallo 0,02 fino allo 0,09% in peso, o dallo 0,03 fino allo 0,08% in peso, o dallo 0,04 fino allo 0,08% in peso, o dallo 0,045 fino allo 0,075% in peso, o dallo 0,04 fino allo 0,07% in peso, o dallo 0,05 fino allo 0,07% in peso. Per esempio, il fosfato di sodio monobasico può essere presente nella composizione concentrata acquosa in una quantità nell'intervallo dallo 0,01 fino allo 0,1 in peso.

Componenti aggiuntivi inclusi nella composizione concentrata acquosa comprendono un sale. Esempi di sali adatti comprendono cloruro di sodio, cloruro di potassio, cloruro di calcio, cloruro di magnesio e loro combinazioni. In certi casi, il sale è cloruro di sodio.

La quantità di sale (per esempio cloruro di sodio) nella composizione concentrata acquosa è nell'intervallo dallo 0,05 fino all'1% in peso, come dallo 0,1 fino allo 0,9% in peso, o dallo 0,1 fino allo 0,8% in peso, o dallo 0,1 fino allo 0,7% in peso, o dallo 0,1 fino allo 0,6% in peso, o dallo 0,1 fino allo 0,5% in peso, o dallo 0,2 fino allo 0,5% in peso, o dallo 0,3 fino allo 0,5% in peso, o dallo 0,4 fino allo 0,5% in peso, o dallo 0,4 fino allo 0,45% in peso. Per esempio, il sale (per esempio cloruro di sodio) può essere presente nella composizione concentrata acquosa in una quantità nell'intervallo dallo 0,1 fino all'1% in peso.

Un altro componente incluso nella composizione concentrata acquosa è uno zucchero. Esempi di zuccheri adatti comprendono saccarosio, mannitolo, maltosio, trealosio, 2-idrossipropil-beta-ciclodestrina (β -HPCD), lattosio, glucosio, fruttosio, galattosio, glucosammina e loro combinazioni. In certi casi, lo zucchero è un disaccaride. Per esempio, il disaccaride può essere saccarosio.

La quantità di zucchero (per esempio saccarosio) nella composizione concentrata acquosa è nell'intervallo dallo 0,1 fino al 25% in peso, come dallo 0,5 fino al 20% in peso, o dall'1 fino al 15% in peso, o dall'1 fino al 10% in peso, o dall'1 fino al 9% in peso, o dall'1 fino all'8% in peso, o dal 2 fino al 7% in peso, o dal 2 fino al 6% in peso, o dal 3 fino al 5% in peso, o dal 4 fino al 5% in peso. Per esempio, lo zucchero (per esempio saccarosio) può essere presente nella composizione concentrata acquosa in una quantità nell'intervallo dall'1 fino al 10% in peso. Dopo preparazione della soluzione di asparaginasi, l'asparaginasi può venire attaccata a un ossido di polialchilene (per esempio polietilenglicole), per cui l'ossido di polialchilene viene legato covalentemente all'asparaginasi per produrre un coniugato ossido di polialchilene-asparaginasi. Dopo preparazione di ossido di polialchilene-asparaginasi, la soluzione può venire sottoposta a chiarificazione. In alcuni casi, la chiarificazione comprende filtrazione della soluzione attraverso un filtro per rimuovere materiale particolato dalla soluzione. La fase di filtrazione può produrre ossido di polialchilene-asparaginasi sostanzialmente purificato.

In alcuni casi, la soluzione di ossido di polialchilene-asparaginasi filtrata viene quindi sottoposta a una fase di diafiltrazione e concentrazione. La soluzione di ossido di polialchilene-asparaginasi può venire diafiltrata usando una membrana di ultrafiltrazione e può venire ottenuto un concentrato risultante di ossido di polialchilene-asparaginasi. Il concentrato ottenuto dalla fase di diafiltrazione può quindi venire diluito per cui la soluzione contiene una concentrazione desiderata di ossido di polialchilene-asparaginasi. Tamponi adatti utili per la fase di diluizione comprendono quelli suddescritti. In alcuni casi, un tampone fosfato viene usato per diluire la soluzione di ossido di polialchilene-asparaginasi, producendo così la composizione concentrata acquosa desiderata. Per esempio, il concentrato ottenuto dalla fase di diafiltrazione può venire diluito affinché la composizione concentrata acquosa risultante comprenda una quantità di ossido di polialchilene-asparaginasi avente una potenza (attività) nell'intervallo da 100 fino a 5.000 IU/ml, come da 500 fino a 4.500 IU/ml, o da 500 fino a 4.000 IU/ml, o da 500 fino a 3.500 IU/ml, o da 500 fino a 3.000 IU/ml, o da 1.000 fino a 3.000 IU/ml, o da 1.500 fino a 3.000 IU/ml. In certi casi, la composizione concentrata acquosa comprende ossido di polialchilene-asparaginasi in una quantità nell'intervallo da 1.500 fino a 3.000 IU/ml. In alcuni casi, la quantità di ossido di polialchilene-asparaginasi nella composizione concentrata acquosa è maggiore della quantità di ossido di polialchilene-asparaginasi nella

composizione liofilizzata ricostituita descritta in questa sede. In alcuni casi, la diafiltrazione produce ossido di polialchilene-asparaginasi sostanzialmente purificato.

La composizione concentrata acquosa può quindi venire filtrata e riempita in un contenitore sterile. Esempi di materiali per il contenitore adatti per il contenitore comprendono polimeri come polipropilene, polimetilpentene, politetrafluoroetilene (PTFE), perfluoroeteri (PFE), etilene propilene fluorurato (FEP), perfluoroalcolossialcane (PFA), polietilentereftalato (PET), polietilene (PE), polietereeterchetone (PEEK), polistirene. Per esempio, il contenitore può essere una sacca in polimero sterile. La composizione concentrata acquosa può venire conservata nel contenitore per un periodo di tempo, e può venire lavorata nella composizione stabile alla conservazione liofilizzata della presente descrizione.

Realizzazioni del metodo possono inoltre comprendere trasporto della composizione concentrata acquosa in una posizione lontana. Una "posizione lontana" è una posizione diversa dalla posizione in cui la composizione concentrata acquosa viene prodotta. Per esempio, una posizione lontana può essere un'altra posizione (per esempio ufficio, laboratorio, ecc.) nella stessa città, un'altra posizione in una città diversa, un'altra posizione in uno stato diverso, un'altra posizione in una nazione diversa, ecc. Come tale, quando una voce viene indicata come "lontana" da un'altra, ciò che si intende consiste nel fatto che le due voci possono essere nello stesso ambiente ma separate, o in almeno ambienti diversi o edifici diversi, e possono essere separate di almeno un miglio, dieci miglia o cento miglia o più.

In certe realizzazioni, come suddescritto, il metodo comprende la liofilizzazione della composizione concentrata acquosa in un modo sufficiente per produrre una composizione di ossido di polialchilene-asparaginasi stabile alla conservazione liofilizzata. In certi casi, la liofilizzazione può venire eseguita in un contenitore di dosaggi unitari. La liofilizzazione della composizione concentrata acquosa per produrre la composizione di ossido di polialchilene-asparaginasi stabile alla conservazione liofilizzata nel contenitore di dosaggi unitari può facilitare la produzione della composizione liofilizzata nel contenitore di dosaggi unitari, per esempio eliminando la necessità di liofilizzare la composizione concentrata acquosa in un contenitore separato e quindi trasferire la composizione liofilizzata dal contenitore separato nel contenitore di dosaggi unitari. Come tale, in alcune realizzazioni, il metodo

comprende l'introduzione della composizione concentrata acquosa in un contenitore di dosaggi unitari e la liofilizzazione della composizione concentrata acquosa nel contenitore di dosaggi unitari. Come suddescritto, il contenitore di dosaggi unitari può essere una fiala, come una fiala in vetro.

Dopo la liofilizzazione, il metodo può inoltre comprendere la sigillatura della composizione liofilizzata nel contenitore di dosaggi unitari. Per esempio, un dispositivo di tenuta o un tappo può venire applicato all'apertura del contenitore di dosaggi unitari, sigillando così il contenitore di dosaggi unitari. I contenitori sigillati possono venire conservati per un periodo di tempo prolungato, come una settimana o più, o 2 settimane o più, o 3 settimane o più, o un mese o più, o 2 mesi o più, o 3 mesi o più, o 4 mesi o più, o 6 mesi o più, o 9 mesi o più, o un anno o più, o 1,5 anni (per esempio 18 mesi) o più, o 2 anni o più, o 2,5 anni (per esempio 30 mesi) o più, o 3 anni o più, o 3,5 anni (per esempio 42 mesi) o più, o 4 anni o più, o 4,5 anni (per esempio 54 mesi) o più, o 5 anni o più. Per esempio, un periodo di tempo prolungato può essere 6 mesi o più. In alcuni casi, i contenitori sigillati possono venire conservati per 9 mesi o più. In alcuni casi, i contenitori sigillati possono venire conservati per un anno (per esempio 12 mesi) o più. In alcuni casi, i contenitori sigillati possono venire conservati per 1,5 anni (per esempio 18 mesi) o più. In alcuni casi, i contenitori sigillati possono venire conservati per 2 anni (per esempio 24 mesi) o più.

KIT

Vengono anche forniti kit per l'uso nella pratica dei metodi in oggetto, in cui i kit possono comprendere una o più delle composizioni liquide e/o liofilizzate precedenti. Per esempio, il kit può comprendere un contenitore di dosaggi unitari che contiene una composizione liquida come descritto in questa sede. Oppure, per esempio, il kit può comprendere un contenitore di dosaggi unitari che contiene una composizione liofilizzata come descritto in questa sede. In alcuni casi, il kit comprende due o più contenitori di dosaggi unitari ciascuno contenente una composizione liquida come descritto in questa sede. In alcuni casi, il kit comprende due o più contenitori di dosaggi unitari ciascuno contenente una composizione liofilizzata come descritto in questa sede. In alcuni casi, il kit comprende due o più contenitori di dosaggi unitari, in cui uno o più dei contenitori di dosaggi unitari contengono una composizione liquida come descritto in questa sede e uno o più dei contenitori di dosaggi unitari contengono

una composizione liofilizzata come descritto in questa sede. In certe realizzazioni, il kit comprende una confezione configurata per contenere il contenitore(i) di dosaggi unitari. La confezione può essere una confezione sigillata, come una confezione sigillata sterile. Una confezione sterile può venire configurata per venire sigillata nei confronti dell'ambiente esterno, affinché non vi siano sostanzialmente microbi (come funghi, batteri, virus, forme di spore, ecc.) all'interno della confezione. In alcuni casi, la confezione è sigillata, come una confezione resistente al vapore acqueo, opzionalmente con un dispositivo di tenuta a vuoto e/o nei confronti dell'aria.

In certe realizzazioni, il kit comprende un tampone. Per esempio, il kit può comprendere un liquido di diluizione, per esempio un tampone di diluizione, che può essere adatto per la somministrazione a un soggetto. Il kit può inoltre comprendere altri componenti, per esempio dispositivi di somministrazione, fonti di liquido, ecc., che possono trovare uso nella pratica dei metodi in oggetto. I vari componenti nei kit possono venire confezionati come desiderato, per esempio insieme o separatamente. Componenti dei kit in oggetto possono essere presenti in contenitori separati, o componenti multipli possono essere presenti in un singolo contenitore, in cui i contenitori e/o la confezione (o una sua porzione) del kit possono essere sterili, come desiderato.

Oltre ai componenti summenzionati, i kit in oggetto possono inoltre comprendere istruzioni per usare i componenti del kit per praticare i metodi in oggetto. Le istruzioni per praticare i metodi in oggetto sono generalmente registrate su un supporto di registrazione adatto. Per esempio, le istruzioni possono essere stampate, come su carta o plastica, ecc. Come tali, le istruzioni possono essere presenti nei kit come un inserto della confezione, nell'etichetta del contenitore del kit o suoi componenti (cioè associate con la confezione o una subconfezione), ecc. In altre realizzazioni, le istruzioni sono presenti come un file di dati di memorizzazione elettronica presente su un supporto di memorizzazione leggibile da un computer adatto, per esempio flash drive portatile, CD-ROM, DVD-ROM, Blu-ray, ecc. In ancora altre realizzazioni, le istruzioni reali non sono presenti nel kit, ma vengono fornite direttive per ottenere le istruzioni da una fonte a distanza, per esempio tramite Internet. Un esempio di questa realizzazione è un kit che comprende un indirizzo web in cui le istruzioni possono venire viste e/o dal quale le istruzioni possono venire scaricate. Come con le istruzioni, questa realizzazione per ottenere le istruzioni è registrata su un substrato adatto.

UTILITÀ

Le composizioni (per esempio composizioni stabili alla conservazione liquide o liofilizzate) e i metodi in oggetto trovano uso in applicazioni in cui vi è un desiderio di trattare un soggetto per una malattia o condizione suscettibile a trattamento mediante somministrazione di ossido di polialchilene-asparaginasi. Per esempio, le composizioni (per esempio composizioni stabili alla conservazione liquide o liofilizzate) e i metodi in oggetto trovano uso nel trattamento di una condizione neoplastica in un soggetto. In alcuni casi, le composizioni (per esempio composizioni stabili alla conservazione liofilizzate o liquide) e i metodi in oggetto trovano uso nel trattamento di un cancro nel soggetto. Esempi di tipi di cancri suscettibili al trattamento usando le composizioni (per esempio composizioni stabili alla conservazione liofilizzate o liquide) e i metodi in oggetto comprendono leucemia come leucemia linfoblastica acuta (ALL), leucemia mieloide acuta (AML). Per conseguenza, le composizioni stabili alla conservazione liofilizzate e i metodi in oggetto trovano uso nel fornire un trattamento terapeuticamente efficace per condizioni neoplastiche come un cancro, comprendente leucemia come leucemia linfoblastica acuta (ALL), leucemia mieloide acuta (AML).

Le composizioni stabili alla conservazione liofilizzate e i metodi (non rivendicati) della presente descrizione trovano uso nel trattamento di soggetti di qualsiasi età. In alcuni casi, le composizioni (per esempio composizioni stabili alla conservazione liofilizzate o liquide) e i metodi in oggetto trovano uso nel trattamento di un adulto. Per esempio, un soggetto adulto umano può avere 18 anni o più. In altri casi, le composizioni (per esempio composizioni stabili alla conservazione liofilizzate o liquide) e i metodi trovano uso nel trattamento di un giovane. Per esempio, un soggetto giovane umano può avere meno di 18 anni di età.

Le composizioni e i metodi della presente descrizione trovano uso in applicazioni in cui si desidera una composizione stabile alla conservazione. Per esempio, le composizioni e i metodi della presente descrizione trovano uso nel fornire una composizione stabile alla conservazione che è stabile (per esempio non si degrada significativamente e/o mantiene sostanzialmente tutta la sua attività) per un periodo di tempo prolungato. Per esempio, le composizioni e i metodi della presente descrizione trovano uso nel fornire una composizione stabile alla conservazione che è stabile per un periodo di tempo prolungato, come una settimana o più, o 2 settimane o

più, o 3 settimane o più, o un mese o più, o 2 mesi o più, o 3 mesi o più, o 4 mesi o più, o 6 mesi o più, o 9 mesi o più, o un anno o più, o 1,5 anni (per esempio 18 mesi) o più, o 2 anni o più, o 2,5 anni (per esempio 30 mesi) o più, o 3 anni o più, o 3,5 anni (per esempio 42 mesi) o più, o 4 anni o più, o 4,5 anni (per esempio 54 mesi) o più, o 5 anni o più. In alcuni casi, le composizioni e i metodi della presente descrizione trovano uso nel fornire una composizione stabile alla conservazione che è stabile per 9 mesi o più. In alcuni casi, le composizioni e i metodi della presente descrizione trovano uso nel fornire una composizione stabile alla conservazione che è stabile per un anno (per esempio 12 mesi) o più. In alcuni casi, le composizioni e i metodi della presente descrizione trovano uso nel fornire una composizione stabile alla conservazione che è stabile per 1,5 anni (per esempio 18 mesi) o più. In alcuni casi, le composizioni e i metodi della presente descrizione trovano uso nel fornire una composizione stabile alla conservazione che è stabile per 2 anni (per esempio 24 mesi) o più. In certe realizzazioni, le composizioni e i metodi della presente descrizione trovano uso nel fornire una composizione stabile alla conservazione che aumenta la semivita della composizione di fino a una settimana, o 2 settimane, o 3 settimane, o un mese, o 2 mesi, o 3 mesi, o 4 mesi, o 6 mesi, o 9 mesi, o un anno, o 1,5 anni (per esempio 18 mesi), o 2 anni, o 2,5 anni (per esempio 30 mesi), o 3 anni, o 3,5 anni (per esempio 42 mesi), o 4 anni o più, o 4,5 anni (per esempio 54 mesi), o 5 anni. In certe realizzazioni, le composizioni e i metodi della presente descrizione trovano uso nel fornire una composizione stabile alla conservazione che aumenta la semivita della composizione da un mese fino a 5 anni, o da 6 mesi fino a 4 anni, o da 9 mesi fino a 3 anni, o da un anno fino a 2 anni.

In certe realizzazioni, dosaggi della presente descrizione possono venire somministrati prima di, contemporaneamente con, o dopo una o più altre terapie per una condizione neoplastica per trattare condizioni correlate o non correlate. Se forniti contemporaneamente ad altre terapie per una condizione neoplastica, i dosaggi della presente descrizione possono venire forniti in una formulazione uguale o diversa. Per esempio, terapia contemporanea può venire ottenuta somministrando un dosaggio e una composizione farmaceutica avente almeno un altro agente attivo, come un agente chemioterapeutico, che in combinazione forniscono una dose terapeuticamente efficace, secondo un particolare regime di trattamento. La somministrazione di composizioni farmaceutiche o trattamenti separati può venire eseguita simultaneamente o a tempi diversi (per esempio

sequenzialmente, in qualsiasi ordine, lo stesso giorno, o in giorni diversi), purché un effetto terapeuticamente efficace della combinazione di queste sostanze venga causato nel soggetto sottoposto a terapia. Per conseguenza, metodi e composizioni della presente descrizione trovano uso nel trattamento di un soggetto usando una terapia in combinazione che comprende somministrazione di ossido di polialchilene-asparaginasi della presente descrizione in combinazione con uno o più agenti attivi e/o terapie aggiuntive (per esempio radiazione, chemioterapia, immunoterapia, ecc.).

Se non indicato diversamente, parti sono parti in peso, il peso molecolare è il peso molecolare ponderale medio, la temperatura è in gradi Celsius, e la pressione corrisponde a o è vicina a quella atmosferica.

Gli esempi seguenti vengono offerti solo per scopi illustrativi, e non sono destinati a limitare il campo delle realizzazioni della presente descrizione in alcun modo. Sono stati fatti sforzi per assicurare la precisione per quanto riguarda i numeri usati (per esempio quantità, temperature, ecc.), ma naturalmente possono venire concessi un certo errore sperimentale e scostamento.

ESEMPI

Esempio 1

Una composizione in massa concentrata che comprende polietilenglicole-asparaginasi avente un legante SS-PEG è stata prodotta secondo il protocollo seguente. Dopo produzione della composizione in massa concentrata, una composizione liofilizzata è stata prodotta dalla composizione in massa concentrata secondo il protocollo descritto in seguito. La FIGURA 1 mostra un diagramma di flusso del procedimento per un metodo di preparazione di una composizione stabile alla conservazione liofilizzata secondo realizzazioni della presente descrizione.

Preparazione di una soluzione di L-asparaginasi

La quantità di L-asparaginasi richiesta per il trattamento è stata calcolata, pesata in un beaker in acciaio inossidabile da 6 l, e miscelata per 5 fino a 10 minuti. La quantità di tampone fosfato necessaria per diluire la L-asparaginasi a una concentrazione bersaglio di 5 mg/ml è stata calcolata e pesata. La L-asparaginasi è stata quindi aggiunta al tampone fosfato e miscelata in un contenitore in pressione in acciaio inossidabile da 7 galloni per 10 fino a 15 minuti. Campioni sono stati prelevati e sottoposti a valutazione delle proteine e dell'attività specifica.

PEGilazione

La quantità di SS-PEG richiesta per questa fase è stata calcolata e pesata. Il contenitore in pressione in acciaio inossidabile da 7 galloni contenente la soluzione di L-asparaginasi diluita è stato riscaldato a 29 fino a 31°C sotto delicata agitazione. Quando la soluzione di L-asparaginasi ha raggiunto l'intervallo di temperatura appropriato, la velocità del miscelatore è stata aumentata, ed è stata avviata la pompa di titolazione. Quando il pH è stato regolato a 7,7-7,9 con NaOH 0,5 N, il SS-PEG è stato aggiunto al contenitore in pressione in acciaio inossidabile da 7 galloni. Dopo 30 minuti, la pompa di titolazione è stata arrestata e la camicia di temperatura è stata scollegata.

Chiarificazione

Il materiale del procedimento è stato quindi filtrato attraverso un filtro da 0,45 µm (Millipore, Billerica, Massachusetts) in un altro contenitore in pressione in acciaio inossidabile da 7 galloni usando una pompa peristaltica per diafiltrazione. Dopo la chiarificazione, tampone fosfato è stato aggiunto al contenitore in pressione in acciaio inossidabile da 7 galloni originale e pompato attraverso il filtro da 0,45 µm nel contenitore in pressione in acciaio inossidabile da 7 galloni come un risciacquo.

Diafiltrazione/concentrazione

La quantità di PBS richiesta per la diafiltrazione 15X è stata calcolata ed è stato preparato il sistema di diafiltrazione. Il contenitore in pressione in acciaio inossidabile da 7 galloni è stato posto su una bilancia. Un sistema di diafiltrazione Millipore Pellicon[®]-2 è stato predisposto con membrane con limiti di peso molecolare nominali di 100.000 Da, che erano state pre-condizionate usando una pompa peristaltica di diafiltrazione e 5 l di PBS. Il sistema di controllo del livello, comprendente una pompa peristaltica del tampone, è stato quindi predisposto e il contenitore in pressione in acciaio inossidabile da 7 galloni è stato posto su una bilancia. Il sistema Pellicon[®]-2 è stato riempito con polietilenglicole-asparaginasi per il condizionamento e fatto ricircolare per 5 minuti. Dopo condizionamento, la linea di scarico del permeato è stata aperta e la diafiltrazione è stata iniziata. Dopo 15 e 30 minuti, un campione è stato ottenuto dalla linea di scarico del permeato in una fiala e sottoposto a valutazione dell'attività e delle proteine. Il materiale destinato alla liofilizzazione è stato diafiltrato quindi concentrato a 18,0 mg/ml o più e una potenza di 1.850 IU/ml o più. Quando la diafiltrazione era completa, il

volume di materiale nel procedimento nel contenitore in pressione in acciaio inossidabile da 7 galloni è stato regolato per raggiungere la concentrazione bersaglio (18,0 mg/ml o più per il procedimento per la formulazione liofilizzata) rimuovendo la quantità appropriata di permeato. PBS è stata quindi pompata attraverso il sistema nel contenitore in pressione in acciaio inossidabile da 7 galloni come un risciacquo.

Sono stati eseguiti saggi di controllo della qualità del prodotto dopo diafiltrazione, comprendenti una determinazione del profilo delle impurità del prodotto. L'attività enzimatica dell'enzima (EEA) nel permeato è stata misurata dopo 15 minuti e 30 minuti per assicurare che il prodotto sia stato trattenuto mediante la membrana di diafiltrazione. PEG libero e N-idrossisuccinimide (NHS) erano i componenti del profilo delle impurità correlato al procedimento misurati nel prodotto finale. Controlli formali nel procedimento per il funzionamento dell'unità di diafiltrazione vengono presentati nella tabella 1 seguente.

I dati di NHS e PEG libero generati dalle tre composizioni di sostanza farmaceutica (per esempio composizioni di sostanza farmaceutica in massa concentrata) destinate alla liofilizzazione sono mostrati nella tabella 2 seguente. I dati generati dimostrano che piccoli cambiamenti al procedimento di diafiltrazione/concentrazione non influenzano la qualità del prodotto.

Tabella 1: specifiche per composizioni di sostanza farmaceutica in massa destinate alla liofilizzazione

Test	Criteri di accettazione per composizioni di sostanza farmaceutica per la liofilizzazione
N-idrossisuccinimide (NHS)	≤ 6,0 ppm
Modifica mediante acido 2,4,6-trinitrobenzensolfonico (TNBS)	69-82 moli di PEG/mole di proteina
Endotossina	≤ 35 EU/ml
Carica microbica	≤ 2 CFU/20 ml
Sterilità (eseguito dopo filtrazione sterile)	Conformi

Tabella 2: analisi dei lotti di composizione di sostanza farmaceutica in massa concentrata

Test	Criteri di accettazione	Lotto 1	Lotto 2	Lotto 3
Concentrazione di proteina	19,0 fino a 21,0 mg/ml	20.94	19.65*	18.37
Potenza (attività)	≥ 1.850 IU/ml	2305	2360*	2091
Aspetto	Soluzione incolore	Conforme	Conforme	Conforme
Chiarezza	Chiara, assenza di particelle visibili	Conforme	Conforme	Conforme
pH	7,2 fino a 7,4	7.2	7.2	7.2
Attività specifica	≥ 85 IU/mg di proteina	110	116	114
Purezza mediante GF-HPLC	$\geq 95\%$ componenti attivi; $\leq 8\%$ aggregati	98.30 5.07	98.26 5.23	97.80 0.70
PEG libero totale mediante RP-HPLC	$\leq 6,0$ mg/ml	< 0.07	< 0.07	0.74
PEG 10 K libero mediante RP-HPLC	$\leq 0,6$ mg/ml	< 0.07	< 0.07	< 0.07
N-idrossisuccinimide (NHS)	$\leq 6,0$ ppm	Non testato	1.87	0.65
Modifica mediante acido 2,4,6-trinitrobenzensolfonico (TNBS)	69-82 moli di PEG/mole di proteina	Non testato	76	73
Endotossina	≤ 35 EU/ml	< 5	< 5	< 5
Carica microbica	≤ 2 CFU/20 ml	0	0	0
Sterilità (eseguito dopo filtrazione sterile)	Supera USP	Non testato	Non testato	Conforme

* valori ottenuti dalla valutazione di campioni post-diafiltrazione/pre-diluizione

Diluizione

Il materiale nel procedimento è stato miscelato nel contenitore in pressione in acciaio inossidabile da 7 galloni prima del prelievo di campioni per la valutazione dell'attività e delle proteine. Il volume del materiale nel procedimento è stato quindi diluito con PBS per portare la concentrazione di proteina a un valore bersaglio di $\geq 18,0$ mg/ml (bersaglio 20,0 mg/ml), (attività ≥ 1.850 IU/ml) per la sostanza farmaceutica destinata alla composizione liofilizzata. Il materiale nel procedimento diluito è stato quindi miscelato prima del prelievo di campioni per la valutazione di assicurazione qualità (vedere la tabella 1).

Filtrazione sterile

La soluzione concentrata per la liofilizzazione è stata filtrata a $0,2 \mu\text{m}$ in una sacca sterile da 20 l monouso per la conservazione fino a quando è stata eseguita la liofilizzazione. Un campione è stato raccolto e sottoposto a

valutazione della sterilità. La composizione di sostanza farmaceutica in massa che comprendeva polietilenglicole-asparaginasi per la liofilizzazione può venire mantenuta nella sacca da 20 l a 2-8°C per fino a 2 mesi prima della liofilizzazione.

Chiusura del contenitore

La composizione di sostanza farmaceutica in massa che comprende polietilenglicole-asparaginasi per la liofilizzazione è stata trattata nella composizione liofilizzata dopo la fase di filtrazione da 0,2 µm ed erogazione in una sacca per bioprocedimento da 20 l pre-sterilizzata monouso. Il materiale di costruzione della sacca comprendeva strati di polietilene a bassa densità (LDPE), polietilene a bassa densità lineare (LLDPE), nylon ed etilene alcool vinilico (EVOH). La superficie in contatto diretto con il prodotto (strato interno) era LDPE. Ciascuna sacca aveva due aperture con attaccata una tubazione che era fissata alla sacca ed era chiusa per strozzatura con pinzette fino a quando era pronta per ricevere la composizione di sostanza farmaceutica in massa che comprende polietilenglicole-asparaginasi per la liofilizzazione. Le sacche sono state irradiate e rilasciate in base a esposizione di 25-40 kGy, e sottoposte a valutazione dell'endotossina del lisato dell'amebocita *Limulus* (LAL), valutazione della sigillatura visiva al 100% e della perdita di aria, nonché a ispezione visiva del 100% dopo l'assemblaggio. I risultati della valutazione di qualificazione hanno dimostrato che lo strato interno della sacca ha superato i test di reattività biologica, comprendenti la valutazione di plastiche classe IV USP <88>, valutazione della citotossicità USP <87> e valutazione USP <661> di attributi fisicochimici. Inoltre, le sacche erano conformi con USP <788> per materiale particolato in iniezioni e la valutazione dei prodotti estraibili era conforme ai requisiti del produttore.

Tempi di mantenimento della stabilità della sostanza farmaceutica

Il materiale di sostanza farmaceutica in massa concentrata è stato controllato a 0, 2, 4, 6, 8 e 12 settimane a 2-8°C. Campioni per la stabilità sono stati mantenuti in sacche per campione da 250 ml con la superficie a contatto con il prodotto di polietilene. Dati per il piano di valutazione sono presentati nella tabella 3 per il lotto 1, nella tabella 4 per il lotto 2 e nella tabella 5 per il lotto 3.

I dati di stabilità per la sostanza farmaceutica in massa concentrata destinata a composizioni liofilizzate soddisfano i criteri di accettazione durante il piano di valutazione di 12 settimane e indicano che un tempo di permanenza di

2 mesi fra la produzione della sostanza farmaceutica in massa concentrata e la produzione della composizione liofilizzata era accettabile.

Tabella 3: dati di stabilità per il lotto 1 conservato a 2-8°C

Test	Criteri di accettazione	Tempo (settimane)					
		Iniziale	2	4	6	8	12
Concentrazione di proteina	≥ 18,0 mg/ml	20.94	21.31	21.31	21.18	21.15	21.34
Potenza (attività)	≥ 1.850 IU/ml	2305	2413	2448	2432	2498	2538
Aspetto	Soluzione incolore	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Chiarezza	Limpida, assenza di particelle visibili	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
pH	7,2 fino a 7,4	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.3
Attività specifica	≥ 85 IU/mg di proteina	110	113	115	115	118	119
Purezza mediante GF-HPLC	≥ 95% componenti attivi; ≤ 8% aggregati	98.30, 5.07	97.83, 4.48	98.99, 4.38	99.24, 4.39	98.14, 4.43	97.34, 3.36
PEG 10 K libero mediante RP-HPLC	≤ 0,6 mg/ml	< 0.07	< 0.07	< 0.07	0.24	0.24	0.33
PEG libero totale mediante RP-HPLC	≤ 6,0 mg/ml	0.07	3.03	2.41	3.07	3.11	4.19
N-idrossisuccinimide (NHS)	≤ 6,0 mg/ml	Non testato	2.23	2.31	2.31	2.32	2.34
Modifica mediante TNBS	69-82 moli di PEG/mole di proteina	Non testato	76	75	76	74	73

Tabella 4: dati di stabilità per il lotto 2 conservato a 2-8°C

Test	Criteri di accettazione	Tempo (settimane)					
		Iniziale	2	4	6	8	12
Concentrazione di proteina	≥ 18,0 mg/ml	19.65*	20.28	20.11	19.82	20.25	20.09
Potenza (attività)	≥ 1.850 IU/ml	2279*	2248	2263	2344	2360	2426
Aspetto	Soluzione incolore	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Chiarezza	Limpida, assenza di	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme

	particelle visibili						
pH	7,2 fino a 7,4	7.2	7.2	7.2	7.3	7.2	7.2
Attività specifica	≥ 85 IU/mg di proteina	116	111	113	118	117	128
Purezza mediante GF-HPLC	≥ 95% componenti attivi; ≤ 8% aggregati	98.26, 5.23	98.17, 5.19	98.16, 4.71	98.27, 4.79	97.19, 4.21	98.24, 4.30
PEG 10 K libero mediante RP-HPLC	≤ 0,6 mg/ml	< 0.07	0.27	0.33	0.37	0.44	0.47
PEG libero totale mediante RP-HPLC	≤ 6,0 mg/ml	< 0.07	1.25	2.05	2.75	4.15	4.50
N-idrossisuccinimide (NHS)	≤ 6,0 mg/ml	1.87	2.55	2.76	2.79	2.82	2.83
Modifica mediante TNBS	69-82 moli di PEG/mole di proteina	76	74	78	75	75	76

* valori ottenuti dalla valutazione di campioni post-diafiltrazione/pre-diluizione

Tabella 5: dati di stabilità per il lotto 3 conservato a 2-8°C

Test	Criteri di accettazione	Tempo (settimane)					
		Iniziale	2	4	6	8	12
Concentrazione di proteina	≥ 18,0 mg/ml	18.39	17.79	18.22	18.20	18.56	18.49
Potenza (attività)	≥ 1.850 IU/ml	2091	2212	2256	2202	2199	2290
Aspetto	Soluzione incolore	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Chiarezza	Limpida, assenza di particelle visibili	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
pH	7,2 fino a 7,4	7.2	7.3	7.2	7.3	7.3	7.3
Attività specifica	≥ 85 IU/mg di proteina	114	124	124	121	118	124
Purezza mediante GF-HPLC	≥ 95% componenti attivi; ≤ 8% aggregati	97.80, 0.7	98.00, 0.65	97.61, 0	97.76, 0	97.24, 0.55	97.94, 0
PEG 10 K libero mediante RP-HPLC	≤ 0,6 mg/ml	< 0.07	< 0.07	< 0.07	< 0.07	0.07	< 0.07

PEG libero totale mediante RP-HPLC	≤ 6,0 mg/ml	< 0.07	2.23	2.00	3.00	3.98	5.00
N- idrossisuccinimide (NHS)	≤ 6,0 mg/ml	0.65	0.70	0.70	0.70	0.68	0.64
Modifica mediante TNBS	69-82 moli di PEG/mole di proteina	73	Non testato	70	70	74	76

Composizione liofilizzata

La polvere di composizione liofilizzata per l'iniezione è stata prodotta in una fiala monouso contenente 3.750 IU di L-asparaginasi PEGilata attiva (750 IU/ml dopo ricostituzione con 5,2 ml di WFI). I componenti della composizione liofilizzata comprendevano il 4,5% di saccarosio, fosfato di sodio bibasico, fosfato di sodio monobasico e cloruro di sodio dopo la ricostituzione. La composizione della composizione liofilizzata viene fornita nella tabella 6. Inoltre, la composizione liofilizzata è stata fornita in un contenitore a fiala in vetro trattato (Nipro tipo 1) avente un dispositivo di tenuta asportabile in alluminio da 20 mm.

Tabella 6: componenti della composizione di polietilenglicole-asparaginasi

Componente	Grado	Quantità per g*
Polietilenglicole-asparaginasi	n/a	750 IU
Fosfato di sodio bibasico	USP	2,79 mg
Fosfato di sodio monobasico	USP	0,60 mg
Cloruro di sodio	USP	4,25 mg
Saccarosio	National Formulary (NF)	45 mg
Acqua per iniezione (WFI)	USP	QS a 1,0 g

* i valori sono post-ricostituzione con WFI

Sviluppo della formulazione di polietilenglicole-asparaginasi liofilizzato

Lo scopo dello sviluppo di una formulazione di polietilenglicole-asparaginasi liofilizzata consisteva nell'ottenere una composizione liofilizzata stabile che fosse adatta per la conservazione a 2-8°C o 25°C per almeno 18 mesi.

Sono stati eseguiti esperimenti iniziali per valutare la fattibilità di una composizione liofilizzata di polietilenglicole-asparaginasi. Sono state studiate 5 variazioni di composizioni liofilizzate. Ciascuna formulazione conteneva ~5 mg/ml di polietilenglicole-asparaginasi in tampone fosfato 50 mM, pH 6,5, e il 5% peso/volume di uno di cinque agenti di crioprotezione diversi (mannitolo, maltosio, saccarosio, trealosio e/o β-HPCD). Inoltre,

polietilenglicole-asparaginasi senza un agente di crioprotezione è stato anche sottoposto a liofilizzazione. Queste sei composizioni liofilizzate sono state confrontate a un lotto di polietilenglicole-asparaginasi in formulazione liquida (Oncaspar®) che è stata usata per la preparazione di queste differenti formulazioni. Il metodo per la purezza SEC (GF-HPLC) è stato usato per la valutazione della qualità delle composizioni di polietilenglicole-asparaginasi. I risultati dello studio vengono presentati nella tabella 7. Come si vede dalla tabella 7, il saccarosio è stato trovato il più efficace nella conservazione della purezza di polietilenglicole-asparaginasi durante la liofilizzazione. La purezza (83,0%) della composizione liofilizzata con il 5% di saccarosio era paragonabile alla purezza (83,8%) della formulazione di polietilenglicole-asparaginasi liquida che è stata usata per la preparazione delle sei formulazioni per la successiva liofilizzazione.

Tabella 7: risultati dello studio di fattibilità per liofilizzare polietilenglicole-asparaginasi

Composizione ¹	% purezza (SEC-HPLC; RT-minuti)				
	10.0	10.2	10.5	11.2 ²	12.0
Oncaspar (controllo, composizione liquida)	-	-	3.0	83.8	13.2
5% di mannitolo	-	0.9	1.4	74.7	23.1
5% di maltosio	-	0.9	2.3	78.8	17.9
5% di saccarosio	-	-	3.1	83.0	14.0
5% di trealosio	-	-	3.2	79.5	17.3
5% di β -HPCD	-	-	2.9	78.9	18.3
liofilizzata, senza conservante	0.4	0.8	9.4	65.7	23.7

¹ Tutte le formulazioni contenevano anche ~5 ml di Oncaspar in tampone fosfato 5 mM, pH 6,5

² tempo di ritenzione previsto di Oncaspar

Diversi eccipienti differenti (per esempio saccarosio, trealosio, mannitolo, polisorbato 80) sono stati valutati come agenti stabilizzanti potenziali da includere nella composizione liofilizzata. Sono stati eseguiti quattro esperimenti, ciascuno comprendente quattro composizioni diverse. Lotti di polietilenglicole-asparaginasi liofilizzati in scala pilota piccoli sono stati preparati con differenti eccipienti e valutati per la stabilità. Un elenco di formulazioni che sono state valutate è mostrato nella tabella 8.

Tabella 8: composizioni testate di polietilenglicole-asparaginasi

Lotto	Composizione
1A	5% di saccarosio, 12,5 mg/ml di PEG-asparaginasi, tampone fosfato
1B	2,5% di saccarosio, 2,5% di mannitolo, 12,5 mg/ml di PEG-asparaginasi, tampone fosfato
1C	2,5% di saccarosio, 2,5% di mannitolo, 0,01% di polisorbato-80, 12,5 mg/ml di PEG-asparaginasi, tampone fosfato
1D	5% di saccarosio, 0,01% di polisorbato-80, 12,5 mg/ml di PEG-asparaginasi, tampone fosfato
2A	5% di trealosio, 12,5 mg/ml di PEG-asparaginasi, tampone fosfato
2B	2,5% di trealosio, 2,5% di mannitolo, 12,5 mg/ml di PEG-asparaginasi, tampone fosfato
2C	2,5% di trealosio, 2,5% di mannitolo, 0,01% di polisorbato-80, 12,5 mg/ml di PEG-asparaginasi, tampone fosfato
2D	5% di trealosio, 0,01% di polisorbato-80, 12,5 mg/ml di -asparaginasi, tampone fosfato
3A	5% di saccarosio, 6,5 mg/ml di PEG-asparaginasi, tampone fosfato
3B	2,5% di saccarosio, 2,5% di mannitolo, 6,5 mg/ml di L-asparaginasi, tampone fosfato
3C	2,5% di saccarosio, 2,5% di mannitolo, 0,01% di polisorbato-80, 6,5 mg/ml di L-asparaginasi, tampone fosfato
3D	5% di saccarosio, 0,01% di polisorbato-80, 6,5 mg/ml di L-asparaginasi, tampone fosfato
4A	5% di trealosio, 6,5 mg/ml di L-asparaginasi, tampone fosfato
4B	2,5% di trealosio, 2,5% di mannitolo, 6,5 mg/ml di L-asparaginasi, tampone fosfato
4C	2,5% di trealosio, 2,5% di mannitolo, 0,01% di polisorbato-80, 6,5 mg/ml di L-asparaginasi, tampone fosfato
4D	5% di trealosio, 0,01% di polisorbato-80, 6,5 mg/ml di L-asparaginasi, tampone fosfato

Tutti i lotti descritti nella tabella 8 sono stati valutati in test di stabilità a 5°C, 25°C e 40°C, e valutati con un gruppo di test (attività, attività specifica, proteina, pH, purezza (GF-HPLC), aggregati (GF-HPLC) e particolati), che hanno valutato gli attributi di qualità primari di polietilenglicole-asparaginasi al momento del rilascio e sulla stabilità. In base a queste analisi dei dati di stabilità raccolti dalle 16 formulazioni diverse descritte nella tabella 8, saccarosio è stato identificato come un agente di crioprotezione adatto (per esempio agente stabilizzante).

Varie concentrazioni di saccarosio sono state testate per valutare la concentrazione adatta per un prodotto più robusto (cioè un protocollo di liofilizzazione con meno impatto) e più stabile. Sono stati preparati lotti in scala pilota addizionali contenenti concentrazioni differenti di saccarosio, come riassunto nella tabella 9. Le concentrazioni di saccarosio e PEG-asparaginasi mostrate nella tabella 9 mostrano le quantità presenti nella sostanza farmaceutica in massa concentrata. Durante il procedimento di liofilizzazione, fiale sono state riempite a

2,5 ml prima di iniziare la liofilizzazione. Queste fiale liofilizzate sono state ricostituite con 5,0 ml, ottenendo concentrazioni finali di saccarosio e PEG-asparaginasi che erano approssimativamente metà di quelle mostrate nella tabella. Questo studio ha dimostrato che l'aumento nel contenuto di zucchero ha permesso temperature di liofilizzazione maggiori, il che era meno stressante per il prodotto liofilizzato, e ha anche ridotto il tempo totale del ciclo di liofilizzazione e portato a un prodotto liofilizzato più anidro (più stabile).

Tabella 9: composizioni di saccarosio testate

Lotto	Tampone fosfato (M)	NaCl (%)	Saccarosio (mg/ml) ¹	PEG-asparaginasi (mg/ml) ¹
5A	0.1	0.85	10 (1%)	12.5
5B	0.1	0.85	25 (2.5%)	12.5
5C	0.1	0.85	50 (5%)	12.5
5D	0.1	0.85	75 (7.5%)	12.5
5E	0.1	0.85	100 (10%)	12.5

¹ Concentrazione durante la liofilizzazione in 2,5 ml/fiala. La concentrazione è diminuita a metà dopo la ricostituzione del prodotto finale con 5 ml/fiala di WFI.

I cinque lotti descritti nella tabella 9 sono anche stati valutati in test di stabilità a 5°C, 25°C e 40°C. Attributi di qualità come attività, attività specifica, proteina, pH, purezza (GF-HPLC), aggregati (GF-HPLC) e particolati sono stati valutati durante questo studio di stabilità. I risultati per purezza e potenza ottenuti da studi di stabilità accelerati (25°C) e sotto stress (40°C) per questi lotti sono mostrati nelle FIGURE 2-5. Questi dati di stabilità indicano che la formulazione contenente il 10% di saccarosio (5% di saccarosio dopo la ricostituzione del prodotto finale con 5 ml/fiala di WFI) fornisce un prodotto con la stabilità migliore per quanto riguarda purezza e potenza. Altri attributi di qualità sono stati meno influenzati da differenti formulazioni, ed erano anche stabili nel lotto con il 10% di saccarosio. La FIGURA 2 mostra un grafico della purezza (%) rispetto al tempo (settimane) a 40°C per composizioni di PEG-asparaginasi liofilizzate dei lotti 5A, 5B, 5C, 5D, 5E e 1A. La FIGURA 3 mostra un grafico della potenza (IU/ml) rispetto al tempo (settimane) a 40°C per composizioni di PEG-asparaginasi liofilizzate dei lotti 5C, 5D, 5E e 1A. La FIGURA 4 mostra un grafico della purezza (%) rispetto al tempo (settimane) a 25°C per composizioni di PEG-asparaginasi liofilizzate dei lotti 5A, 5B, 5C, 5D, 5E e 1A. La FIGURA 5 mostra un grafico della potenza (IU/ml) rispetto al tempo (settimane) a 25°C per composizioni di PEG-asparaginasi liofilizzate dei

lotti 5C, 5D, 5E e 1A.

Liofilizzazione

È stato preparato un tampone che comprende acqua per iniezione (WFI), fosfato di sodio bibasico, fosfato di sodio monobasico, cloruro di sodio e saccarosio. Il tampone è stato usato per la diluizione della sostanza farmaceutica in massa concentrata.

WFI è stata aggiunta a un beaker al 90% del peso bersaglio richiesto per produrre la soluzione tampone. Fosfato di sodio monobasico, fosfato di sodio bibasico e cloruro di sodio sono quindi stati pesati singolarmente e aggiunti alla WFI e miscelati fino a quando disciolti. La quantità richiesta di saccarosio è stata pesata e aggiunta alla soluzione tampone di miscelazione e miscelata fino a quando disciolta. Il pH della soluzione è stato quindi misurato e regolato a $7,3 \pm 0,1$ con lenta aggiunta di NaOH. WFI è stata aggiunta alla soluzione tampone come necessario, e la densità della soluzione in massa concentrata è stata usata per pesare il volume richiesto di soluzione in massa concentrata necessario per la dimensione del lotto. Un campione del tampone è stato prelevato per un saggio del saccarosio. La soluzione in massa concentrata è stata aggiunta alla soluzione tampone e la soluzione finale è stata miscelata per non meno di (NLT) 10 minuti. Dopo completamento della miscelazione, misurazioni del pH confirmatorie ($7,3 \pm 0,1$) sono state ottenute dalla parte superiore, intermedia e dal fondo del contenitore, e campioni sono stati raccolti per la valutazione nel procedimento di proteina, densità, saccarosio e carica microbica pre-filtrazione.

Dopo la formulazione finale, la soluzione è stata sottoposta a filtrazione sterile. Un gruppo di tubazione per filtrazione precedentemente sterilizzato è stato posto nel contenitore della massa formulata e la massa è stata quindi filtrata attraverso due filtri da $0,22 \mu\text{m}$ posti sul gruppo di tubazione di filtrazione in una sacca per bioprocedimento da 10 l pre-sterilizzata in preparazione del riempimento. Quando l'intero prodotto è stato trasferito alla sacca per bioprocedimento da 10 l, il gruppo di tubazione di filtrazione è stato scollegato dalla sacca per il bioprocedimento e i filtri sono stati testati per l'integrità. Un campione pre-liofilizzazione da 20 ml è stato raccolto a monte del filtro (non filtrato) e testato per le specifiche del prodotto farmaceutico finale.

Un diagramma di flusso che illustra la formulazione finale e la fase del procedimento di filtrazione sterile è

mostrato nella FIGURA 6.

Riempimento asettico e liofilizzazione

Dopo il completamento della filtrazione sterile, la biosacca da 10 l contenente la soluzione di API in massa è stata collegata al gruppo di tubazione di riempimento e le fiale di prodotto sono quindi state riempite a un peso di riempimento bersaglio di 2,5 g/fiala e parzialmente tappate usando il riempitivo Flexicon FMB210. I pesi di riempimento sono stati controllati eseguendo un minimo di un controllo del peso (una fiala) per ogni vassoio riempito (limite di azione: 2,43-2,57 g, limite di allerta: 2,38-2,62 g) durante l'operazione di riempimento. Quando l'operazione di riempimento era completa, 20 fiale pre-liofilizzate sono state testate e tutte le fiale riempite rimanenti sono state trasferite in vassoi di liofilizzazione in acciaio inossidabile e successivamente caricate in un sistema di congelamento-essiccamento Hull da 270 ft² pre-raffreddato (5°C) per la liofilizzazione. Il procedimento di liofilizzazione comprende le fasi mostrate nella tabella 10.

Tabella 10: ciclo di liofilizzazione - parametri del procedimento

Fase di trattamento termico				
Fase	Temperatura (°C)	Tempo di aumento (minuti)	Tempo di permanenza (minuti)	
1	5	0	30	
2	-45	100	120	
Condensatore per raffreddamento e fase di creazione del vuoto				
Condensatore S.P.		-45 °C		
Vuoto S.P.		60 mT		
Fase di essiccamento primario				
Fase	Temperatura (°C)	Tempo di aumento (minuti)	Tempo di permanenza (minuti)	S.P. Cont. vuoto (mT)
1	-45	0	30	50
2	-28	60	3860	50
Fase di essiccamento secondario				
Fase	Temperatura (°C)	Tempo di aumento (minuti)	Tempo di permanenza (minuti)	S.P. Cont. vuoto (mT)
1	35	630	1920	50

Dopo che il ciclo di liofilizzazione era completo, la camera con il vuoto è stata riempita con gas di azoto e le fiale sono state completamente tappate. Un diagramma di flusso che illustra il riempimento asettico e la fase del procedimento di liofilizzazione è mostrato nella FIGURA 7. Le fiale completamente tappate sono quindi state confezionate in cartoni (90 fiale/cartone) e quindi immagazzinate e/o trasportate.

Caratteristiche della composizione liofilizzata

Le caratteristiche del prodotto per la composizione liofilizzata sono mostrate nella tabella 11.

Tabella 11: caratteristiche per la composizione liofilizzata

Test	Criteri di accettazione	
	Metodo	Composizione liofilizzata ¹
Aspetto	ACM-1504	Torta da bianca a biancastra (pre-ricostituzione); soluzione incolore dopo ricostituzione
Chiarezza		Limpida, assenza di particelle visibili dopo la ricostituzione
Volume di riempimento		Per somministrare 5,0 ml (USP)
pH		7,2-7,4
Potenza (attività)	RDM-10004	600-900 IU/ml
Attività specifica	ACM-1510	≥ 85 IU/mg di proteina
Purezza mediante GF-HPLC	ACM-1517	Componenti attivi ≥ 95%
	RDM-10006	Aggregati ≤ 8%
PEG libero totale mediante RP-HPLC	ACM-1509	≤ 2,0 mg/ml
PEG 10 K libero mediante RP-HPLC	RDM-10007	≤ 0,2 mg/ml
N-idrossisuccinimide (NHS)	ACM-1505	≤ 2,0 ppm
Modifica mediante TNBS	ACM-1507 RDM-10015	69-82 moli di PEG/mole di proteina
Concentrazione di proteina	ACM-1506 RDM-10005	4,5-8,5 mg/ml
Sterilità	USP <71>	Supera il test di sterilità USP
Sicurezza generale	USP <88> 21 CFR 610.11	Supera il test USP in cavie Supera il test USP in topi
Endotossina mediante LAL	ACM-1511	≤ 35 EU/ml
Materiale particolato	ACM-0070	≥ 2 µm NMT 27.000 particelle/contenitore ¹ ≥ 10 µm NMT 6.000 particelle/contenitore ≥ 25 µm NMT 600 particelle/contenitore
Test di identità	ACM-1805	Asparagina deamminata
Uniformità del contenuto	RDM-10004	Conforme con USP
Tempo di ricostituzione	LSNE SOP CQC032 ¹	NMT 3 minuti
Acqua (KF)	LSNE SOP CQC0320	NMT 3,0%

¹ Con l'eccezione della valutazione dell'aspetto pre-ricostituzione, tutte le valutazioni sono state eseguite post-ricostituzione con WFI.

Analisi dei lotti

Analisi dei lotti per lotti di prodotto di composizione liofilizzata vengono fornite nella tabella 12 seguente. I risultati per tutti e tre i lotti erano entro specifiche di rilascio.

Tabella 12: analisi dei lotti per composizioni liofilizzate

Test	Criteri di accettazione	Lotto 1	Lotto 2	Lotto 3
Aspetto	Torta da bianca a biancastra	Conforme	Conforme	Conforme
Aspetto dopo ricostituzione	Soluzione incolore	Conforme	Conforme	Conforme
Chiarezza dopo ricostituzione	Limpida, assenza di particelle visibili dopo ricostituzione	Conforme	Conforme	Conforme
Volume di riempimento	Per fornire 5,0 ml (USP)	5.5	5.4	5.2
pH	7.2-7.4	7.4	7.4	7.4
Potenza (attività)	600-900 IU/ml	805	718	741
Attività specifica	≥ 85 IU/mg di proteina	114	111	113
Purezza mediante GF-HPLC	Componenti attivi ≥ 95% Aggregati ≤ 8%	97 5	97 4	97 1
PEG libero totale mediante RP-HPLC	≤ 2,0 mg/ml	0.9	1.3	0.5
PEG 10 K libero mediante RP-HPLC	≤ 0,2 mg/ml	0.1	0.2	0.1
N-idrossisuccinimmide (NHS)	≤ 2.0 ppm	0.1	0.9	0.2
Modifica mediante TNBS	69-82 moli di PEG/ mole di proteina	77	77	75
Concentrazione di proteina	4,5-8,5 mg/ml	7.1	6.5	6.6
Sterilità	Supera il test di sterilità USP	n/a	Conforme	Conforme
Sicurezza generale	Supera il test USP in cavie Supera il test USP in topi	Conforme	Conforme	Conforme
Endotossina mediante LAL	≤ 35 EU/ml	< 4	< 4	< 4

Materiale particolato	≥ 2 µm NMT 27.000 particelle/contenitore	1835	530	5834
	≥ 10 µm NMT 6.000 particelle/contenitore	116	12	96
	≥ 25 µm NMT 600 particelle/contenitore	1	1	2
Test di identità	Asparagina deamminata	n/a	n/a	n/a
Uniformità del contenuto	Conforme con USP	Conforme	Conforme	Conforme
Tempo di ricostituzione	NMT 3 minuti	< 1	< 1	< 1
Acqua (KF)	NMT 3.0%	0.1	0.2	0.1

Studi di stabilità

I lotti di prodotto farmaceutico liofilizzato 1, 2 e 3 sono stati posti in test di stabilità a lungo termine (2-8°C) e accelerato (25 ± 3°C; umidità relativa 60% ± 5%). Questi lotti sono anche stati posti in un test di stabilità nei confronti dello stress termico (40 ± 2°C; umidità relativa 75% ± 5%) per valutare il profilo di degradazione indotto dal calore del prodotto.

Stabilità a lungo termine (2-8°C)

Dati di stabilità generati per lotti di prodotto farmaceutico liofilizzato conservati in condizioni a lungo termine (2-8°C) vengono forniti nelle tabelle 13-16. I dati di stabilità a lungo termine hanno indicato che il prodotto farmaceutico liofilizzato conservato a 5 ± 3°C è rimasto perfettamente entro i criteri di accettazione per tutti i punti di tempo della stabilità. I dati del contenuto di acqua (KF) erano nell'intervallo dallo 0,96% fino all'1,35% (specifico = NMT 3,0%) alla condizione di conservazione a 2-8°C per 12 settimane. Diversamente dal prodotto farmaceutico liquido del commercio, che ha dimostrato un aumento in attività e una diminuzione in purezza nel tempo, questa tendenza non è stata osservata per composizioni liofilizzate. Grafici di stabilità per la purezza (FIGURA 8) e potenza (FIGURA 9), nonché aggregati (FIGURA 10), a 2-8°C sono mostrati nelle figure allegate.

Tabella 13: dati di stabilità a lungo termine del lotto 1

Test	Criteri di accettazione	Tempo (mesi)			
		Iniziale	3	6	9
Aspetto	Torta da bianca a biancastra; soluzione incolore dopo ricostituzione	Conforme	Conforme	Conforme	-
Chiarezza	Limpida, assenza di particelle visibili dopo ricostituzione	Conforme	Conforme	Conforme	-
pH	7.2-7.4	7.4	7.4	7.4	-
Potenza (attività)	600-900 IU/ml	805	750	801	-
Attività specifica	≥ 85 IU/mg di proteina	114	107	111	-
Purezza mediante GF-HPLC	Componenti attivi ≥ 85%	97.07	96.53	97.68	-
	Aggregati ≤ 8%	4.73	3.82	5.05	
PEG libero totale mediante RP-HPLC	≤ 6,0 mg/ml	0.86	0.86	1.13	-
PEG 10 K totale mediante RP-HPLC	≤ 0,6 mg/ml	0.13	0.13	0.14	-
Concentrazione di proteina	4,5-8,5 mg/ml	7.06	7.01	7.20	-
Materiale particolato	≥ 2 µm NMT 27.000 particelle/contenitore	1835	-	-	204 ¹
	≥ 10 µm NMT 6.000 particelle/contenitore	116	21	126	-
	≥ 25 µm NMT 600 particelle/contenitore	1	0	2	-
Tempo di ricostituzione	NMT 3 minuti	0.99	0.99	0.99	-
Acqua (KF)	NMT 3.0%	-	-	-	-

¹ Il test è stato eseguito a 9 mesi usando acqua MilliQ per la ricostituzione del prodotto farmaceutico.

Tabella 14: dati di stabilità a lungo termine del lotto 2

Test	Criteri di accettazione	Tempo (mesi)			
		Iniziale	3	6	9
Aspetto	Torta da bianca a biancastra; soluzione incolore dopo ricostituzione	Conforme	Conforme	Conforme	-
Chiarezza	Limpida, assenza di particelle visibili dopo ricostituzione	Conforme	Conforme	Conforme	-
pH	7.2-7.4	7.4	7.4	7.4	-
Potenza (attività)	600-900 IU/ml	718	738	741	-
Attività specifica	≥ 85 IU/mg di proteina	111	115	115	-
Purezza mediante GF-HPLC	Componenti attivi ≥ 85%	97.16	96.94	96.99	-
	Aggregati ≤ 8%	4.35	3.85	0.79	
PEG libero totale mediante RP-HPLC	≤ 6,0 mg/ml	1.31	1.11	0.88	-
PEG 10 K totale mediante RP-HPLC	≤ 0,6 mg/ml	0.15	0.13	0.069	-
Concentrazione di proteina	4,5-8,5 mg/ml	6.48	6.44	6.44	-
Materiale particolato	≥ 2 µm NMT 27.000 particelle/contenitore	530	-	-	207 ¹
	≥ 10 µm NMT 6.000 particelle/contenitore	12	55	69	-
	≥ 25 µm NMT 600 particelle/contenitore	1	0	0	-
Tempo di ricostituzione	NMT 3 minuti	0.99	0.99	0.99	-
Acqua (KF)	NMT 3.0%	0.2%	-	-	-

¹ Il test è stato eseguito a 9 mesi usando acqua MilliQ per la ricostituzione del prodotto farmaceutico.

Tabella 15: dati di stabilità a lungo termine del lotto 3 (in verticale)

Test	Criteri di accettazione	Tempo (mesi)			
		Iniziale	3	6	9
Aspetto	Torta da bianca a biancastra; soluzione incolore dopo ricostituzione	Conforme	Conforme	-	-
Chiarezza	Limpida, assenza di particelle visibili dopo ricostituzione	Conforme	Conforme	-	-
pH	7.2-7.4	7.4	7.4	-	-
Potenza (attività)	600-900 IU/ml	741	733	-	-
Attività specifica	≥ 85 IU/mg di proteina	113	117	-	-
Purezza mediante GF-HPLC	Componenti attivi ≥ 85% Aggregati ≤ 8%	97.05 0.55	98.87 0.65	-	-
PEG libero totale mediante RP-HPLC	≤ 6,0 mg/ml	0.45	1.20	-	-
PEG 10 K totale mediante RP-HPLC	≤ 0,6 mg/ml	0.11	0.069	-	-
Concentrazione di proteina	4,5-8,5 mg/ml	6.55	6.25	-	-
Materiale particolato	≥ 2 µm NMT 27.000 particelle/contenitore	5834	-	165 ¹	-
	≥ 10 µm NMT 6.000 particelle/contenitore	96	90	-	-
	≥ 25 µm NMT 600 particelle/contenitore	2	0	-	-
Tempo di ricostituzione	NMT 3 minuti	0.99	0.99	-	-
Acqua (KF)	NMT 3.0%	0.1%	-	-	-

¹ Il test è stato eseguito a 9 mesi usando acqua MilliQ per la ricostituzione del prodotto farmaceutico.

Tabella 16: dati di stabilità a lungo termine del lotto 3 (capovolto)

Test	Criteri di accettazione	Tempo (mesi)			
		Iniziale	3	6	9
Aspetto	Torta da bianca a biancastra; soluzione incolore dopo ricostituzione	Conforme	Conforme	-	-
Chiarezza	Limpida, assenza di particelle visibili dopo ricostituzione	Conforme	Conforme	-	-
pH	7.2-7.4	7.4	7.4	-	-
Potenza (attività)	600-900 IU/ml	741	745	-	-
Attività specifica	≥ 85 IU/mg di proteina	113	118	-	-
Purezza mediante GF-HPLC	Componenti attivi ≥ 85%	97.05	98.90	-	-
	Aggregati ≤ 8%	0.55	0.63	-	-
PEG libero totale mediante RP-HPLC	≤ 6,0 mg/ml	0.45	1.18	-	-
PEG 10 K totale mediante RP-HPLC	≤ 0,6 mg/ml	0.11	< 0.07	-	-
Concentrazione di proteina	4,5-8,5 mg/ml	6.55	6.29	-	-
Materiale particolato	≥ 2 µm NMT 27.000 particelle/contenitore	5834	-	-	-
	≥ 10 µm NMT 6.000 particelle/contenitore	96	50	-	-
	≥ 25 µm NMT 600 particelle/contenitore	2	0	-	-
Tempo di ricostituzione	NMT 3 minuti	0.99	0.99	-	-
Acqua (KF)	NMT 3.0%	0.1%	-	-	-

Stabilità accelerata (25 ± 3°C; umidità relativa 60% ± 5%)

I dati di stabilità per lotti di prodotto farmaceutico liofilizzato conservati in condizioni accelerate (25 ± 3°C; umidità relativa 60% ± 5%) vengono forniti nelle tabelle 17-20. I dati di stabilità indicano che prodotti farmaceutici liofilizzati conservati alla condizione accelerata sono rimasti perfettamente entro i criteri di accettazione per tutti i punti di tempo della stabilità. Il contenuto di acqua (KF) era nell'intervallo dall'1,12% fino all'1,23% (specifico = NMT 3,0%) alla condizione di conservazione a 25°C per 4 settimane. Grafici di stabilità per gli attributi di qualità purezza (FIGURA 11) e potenza (FIGURA 12), nonché aggregati (FIGURA 13), a 25 ± 3°C vengono forniti nelle figure allegate.

Tabella 17: dati di stabilità accelerata del lotto 1

Test	Criteri di accettazione	Tempo (mesi)				
		Iniziale	1	2	3	6
Aspetto	Torta da bianca a biancastra; soluzione incolore dopo ricostituzione	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Chiarezza	Limpida, assenza di particelle visibili dopo ricostituzione	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
pH	7.2-7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4
Potenza (attività)	600-900 IU/ml	805	782	809	778	805
Attività specifica	≥ 85 IU/mg di proteina	114	111	112	111	-
Purezza mediante GF-HPLC	Componenti attivi ≥ 85% Aggregati ≤ 8%	97.07	96.43	96.58	96.29	96.88
		4.73	-	4.6	4.11	5.9
PEG libero totale mediante RP-HPLC	≤ 6,0 mg/ml	0.86	0.99	1.12	0.74	0.88
PEG 10 K totale mediante RP-HPLC	≤ 0,6 mg/ml	0.13	0.14	0.17	0.12	0.13
Concentrazione di proteina	4,5-8,5 mg/ml	7.06	7.03	7.2	7.02	7.13
Materiale particolato	≥ 2 µm NMT 27.000 particelle/contenitore	1835	-	-	11,753	12,096
	≥ 10 µm NMT 6.000 particelle/contenitore	116	-	-	70	116
	≥ 25 µm NMT 600 particelle/contenitore	1	-	-	1	1
Tempo di ricostituzione	NMT 3 minuti	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Acqua (KF)	NMT 3.0%	-	-	-	-	-

Tabella 18: dati di stabilità accelerata del lotto 2

Test	Criteri di accettazione	Tempo (mesi)				
		Iniziale	1	2	3	6
Aspetto	Torta da bianca a biancastra; soluzione incolore dopo ricostituzione	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	-
Chiarezza	Limpida, assenza di particelle visibili dopo ricostituzione	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	-
pH	7.2-7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	-
Potenza (attività)	600-900 IU/ml	718	748	733	720	-
Attività specifica	≥ 85 IU/mg di proteina	111	115	113	116	-
Purezza mediante GF-HPLC	Componenti attivi ≥ 85%	97.16	96.69	96.52	96.79	-
		4.35	4.01	3.76	4.31	-

	Aggregati $\leq 8\%$					
PEG libero totale mediante RP-HPLC	$\leq 6,0$ mg/ml	1.31	1.48	1.12	1.16	-
PEG 10 K totale mediante RP-HPLC	$\leq 0,6$ mg/ml	0.15	0.18	0.16	0.14	-
Concentrazione di proteina	4,5-8,5 mg/ml	6.48	6.51	6.46	6.21	-
Materiale particolato	$\geq 2 \mu\text{m}$ NMT 27.000 particelle/contenitore	530	-	-	10,051	-
	$\geq 10 \mu\text{m}$ NMT 6.000 particelle/contenitore	12	-	-	121	-
	$\geq 25 \mu\text{m}$ NMT 600 particelle/contenitore	1	-	-	6	-
Tempo di ricostituzione	NMT 3 minuti	< 1	< 1	< 1	< 1	-
Acqua (KF)	NMT 3.0%	0.2%	-	-	-	-

Tabella 19: dati di stabilità accelerata del lotto 3 (in verticale)

Test	Criteri di accettazione	Tempo (mesi)				
		Iniziale	1	2	3	6
Aspetto	Torta da bianca a biancastra; soluzione incolore dopo ricostituzione	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	-
Chiarezza	Limpida, assenza di particelle visibili dopo ricostituzione	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	-
pH	7.2-7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	-
Potenza (attività)	600-900 IU/ml	741	700	750	718	-
Attività specifica	≥ 85 IU/mg di proteina	113	111	113	-	-
Purezza mediante GF-HPLC	Componenti attivi $\geq 85\%$ Aggregati $\leq 8\%$	97.05	96.88	97.25	96.98	-
		0.55	0.62	0.75	0.89	
PEG libero totale mediante RP-HPLC	$\leq 6,0$ mg/ml	0.45	0.95	1.06	0.87	-
PEG 10 K totale mediante RP-HPLC	$\leq 0,6$ mg/ml	0.11	< 0.07	< 0.07	< 0.07	-
Concentrazione di proteina	4,5-8,5 mg/ml	6.55	6.28	6.63	6.34	-
Materiale particolato	$\geq 2 \mu\text{m}$ NMT 27.000 particelle/contenitore	5834	-	-	8000	-
	$\geq 10 \mu\text{m}$ NMT 6.000 particelle/contenitore	96	-	-	83	-
	$\geq 25 \mu\text{m}$ NMT 600 particelle/contenitore	2	-	-	2	-
Tempo di ricostituzione	NMT 3 minuti	< 1	< 1	< 1	< 1	-
Acqua (KF)	NMT 3.0%	0.1%	-	-	-	-

Tabella 20: dati di stabilità accelerata del lotto 3 (capovolto)

Test	Criteri di accettazione	Tempo (mesi)				
		Iniziale	1	2	3	6
Aspetto	Torta da bianca a biancastra; soluzione incolore dopo ricostituzione	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	-
Chiarezza	Limpida, assenza di particelle visibili dopo ricostituzione	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	-
pH	7.2-7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	-
Potenza (attività)	600-900 IU/ml	741	719	733	721	-
Attività specifica	≥ 85 IU/mg di proteina	113	113	113	113	-
Purezza mediante GF-HPLC	Componenti attivi ≥ 85% Aggregati ≤ 8%	97.05	96.76	97.31	97.02	-
		0.55	0.63	0.72	0.74	
PEG libero totale mediante RP-HPLC	≤ 6,0 mg/ml	0.45	0.92	1.04	1.22	-
PEG 10 K totale mediante RP-HPLC	≤ 0,6 mg/ml	0.11	< 0.07	< 0.07	0.14	-
Concentrazione di proteina	4,5-8,5 mg/ml	6.55	6.37	6.49	6.38	-
Materiale particolato	≥ 2 µm NMT 27.000 particelle/contenitore	5834	-	-	10,277	-
	≥ 10 µm NMT 6.000 particelle/contenitore	96	-	-	113	-
	≥ 25 µm NMT 600 particelle/contenitore	2	-	-	1	-
Tempo di ricostituzione	NMT 3 minuti	< 1	< 1	< 1	< 1	-
Acqua (KF)	NMT 3.0%	0.1%	-	-	-	-

Stabilità nei confronti dello stress termico ($40 \pm 2^\circ\text{C}$; umidità relativa $75\% \pm 5\%$)

Dati di stabilità per lotti di prodotto farmaceutico liofilizzato conservati in condizioni di stress ($40 \pm 2^\circ\text{C}$; umidità relativa $75\% \pm 5\%$) vengono forniti nelle tabelle 21-24. I dati di stabilità hanno indicato che un prodotto farmaceutico liofilizzato conservato in condizioni di stress è rimasto perfettamente entro i criteri di accettazione per la durata dello studio. Il contenuto di acqua (KF) era nell'intervallo dall'1,16% fino all'1,45% (specifica = NMT 3,0%) alla condizione di conservazione a 40°C per 4 settimane. Grafici della stabilità per la potenza (FIGURA 14) e purezza (FIGURA 15), nonché aggregati (FIGURA 16), a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ vengono forniti nelle figure allegate.

Tabella 21: dati di stabilità con stress termico del lotto 1

Test	Criteri di accettazione	Tempo (mesi)				
		Iniziale	1	2	3	6
Aspetto	Torta da bianca a biancastra; soluzione incolore dopo ricostituzione	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Chiarezza	Limpida, assenza di particelle visibili dopo ricostituzione	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
pH	7.2-7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4
Potenza (attività)	600-900 IU/ml	805	757	747	759	746
Attività specifica	≥ 85 IU/mg di proteina	114	109	107	107	-
Purezza mediante GF-HPLC	Componenti attivi ≥ 85% Aggregati ≤ 8%	97.07	95.02	94.52	93.64	92.64
		4.73	-	4.74	4.31	6.01
PEG libero totale mediante RP-HPLC	≤ 6,0 mg/ml	0.86	1.07	1.15	0.86	1.07
PEG 10 K totale mediante RP-HPLC	≤ 0,6 mg/ml	0.13	0.15	0.16	0.13	0.14
Concentrazione di proteina	4,5-8,5 mg/ml	7.06	6.94	7.01	7.09	7.08
Materiale particolato	≥ 2 µm NMT 27.000 particelle/contenitore	1835	-	-	-	12,025
	≥ 10 µm NMT 6.000 particelle/contenitore	116	-	-	-	53
	≥ 25 µm NMT 600 particelle/contenitore	1	-	-	-	1
Tempo di ricostituzione	NMT 3 minuti	< 1	< 1	< 1	< 1	-
Acqua (KF)	NMT 3.0%	-	-	-	-	-

Tabella 22: dati di stabilità con stress termico del lotto 2

Test	Criteri di accettazione	Tempo (mesi)				
		Iniziale	1	2	3	6
Aspetto	Torta da bianca a biancastra; soluzione incolore dopo ricostituzione	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	-
Chiarezza	Limpida, assenza di particelle visibili dopo ricostituzione	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	-
pH	7.2-7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	-
Potenza (attività)	600-900 IU/ml	718	738	690	694	-
Attività specifica	≥ 85 IU/mg di proteina	114	109	107	107	-
Purezza mediante GF-HPLC	Componenti attivi ≥ 85% Aggregati ≤ 8%	97.16	93.91	93.92	93.70	-
		4.35	3.99	3.71	4.33	
PEG libero totale mediante RP-HPLC	≤ 6,0 mg/ml	1.31	1.45	1.15	1.26	-
PEG 10 K totale mediante RP-HPLC	≤ 0,6 mg/ml	0.15	0.17	0.16	0.14	-
Concentrazione di proteina	4,5-8,5 mg/ml	6.48	6.42	6.4	6.3	-
Materiale particolato	≥ 2 µm NMT 27.000 particelle/contenitore	530	-	-	-	-
	≥ 10 µm NMT 6.000 particelle/contenitore	12	-	-	-	-
	≥ 25 µm NMT 600 particelle/contenitore	1	-	-	-	-
Tempo di ricostituzione	NMT 3 minuti	< 1	< 1	< 1	< 1	-
Acqua (KF)	NMT 3,0%	0.2%	-	-	-	-

Tabella 23: dati di stabilità con stress termico del lotto 3 (in verticale)

Test	Criteri di accettazione	Tempo (mesi)				
		Iniziale	1	2	3	6
Aspetto	Torta da bianca a biancastra; soluzione incolore dopo ricostituzione	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	-
Chiarezza	Limpida, assenza di particelle visibili dopo ricostituzione	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	-
pH	7.2-7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	-

Potenza (attività)	600-900 IU/ml	741	722	691	681	-
Attività specifica	≥ 85 IU/mg di proteina	113	112	111	109	-
Purezza mediante GF-HPLC	Componenti attivi ≥ 85% Aggregati ≤ 8%	97.05	96.11	95.4	93.1	-
		0.55	0.98	2.58	2.88	
PEG libero totale mediante RP-HPLC	≤ 6,0 mg/ml	0.45	1.1	1.25	0.64	-
PEG 10 K totale mediante RP-HPLC	≤ 0,6 mg/ml	0.11	< 0.07	< 0.07	< 0.07	-
Concentrazione di proteina	4,5-8,5 mg/ml	6.55	6.43	6.23	6.25	-
Materiale particolato	≥ 2 µm NMT 27.000 particelle/contenitore	5834	-	-	8989	-
	≥ 10 µm NMT 6.000 particelle/contenitore	96	-	-	116	-
	≥ 25 µm NMT 600 particelle/contenitore	2	-	-	2	-
Tempo di ricostituzione	NMT 3 minuti	< 1	< 1	< 1	< 1	-
Acqua (KF)	NMT 3.0%	0.1%	-	-	-	-

Tabella 24: dati di stabilità con stress termico del lotto 3 (capovolto)

Test	Criteri di accettazione	Tempo (mesi)				
		Iniziale	1	2	3	6
Aspetto	Torta da bianca a biancastra; soluzione incolore dopo ricostituzione	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	-
Chiarezza	Limpida, assenza di particelle visibili dopo ricostituzione	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	-
pH	7.2-7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	-
Potenza (attività)	600-900 IU/ml	741	719	668	663	-
Attività specifica	≥ 85 IU/mg di proteina	113	113	107	106	-
Purezza mediante GF-HPLC	Componenti attivi ≥ 85% Aggregati ≤ 8%	97.05	96.12	95.31	96.45	-
		0.55	1.02	1.01	2.74	
PEG libero totale mediante RP-HPLC	≤ 6,0 mg/ml	0.45	1.08	1.25	0.62	-
PEG 10 K totale mediante RP-HPLC	≤ 0,6 mg/ml	0.11	< 0.07	< 0.07	< 0.07	-
Concentrazione di proteina	4,5-8,5 mg/ml	6.55	6.38	6.23	6.25	-

Materiale particolato	≥ 2 µm NMT 27.000 particelle/contenitore	5834	-	-	9963	-
	≥ 10 µm NMT 6.000 particelle/contenitore	96	-	-	157	-
	≥ 25 µm NMT 600 particelle/contenitore	2	-	-	3	-
Tempo di ricostituzione	NMT 3 minuti	< 1	< 1	< 1	< 1	-
Acqua (KF)	NMT 3.0%	0.1%	-	-	-	-

Esempio 2

È stata prodotta una composizione che comprende polietilenglicole-asparaginasi avente un legante SC-PEG (cioè legante di succinimmidilcarbonato) - calaspargase pegol (succinimmidilcarbonato-polietilenglicole [SC-PEG] L-asparaginasi di E. coli). La composizione della composizione viene fornita nella tabella 25.

Tabella 25: componenti della composizione calaspargase pegol

Componente	Grado	Quantità per g*
Calaspargase pegol	n/a	750 IU
Fosfato di sodio bibasico	USP	5,58 mg
Fosfato di sodio monobasico	USP	1,29 mg
Cloruro di sodio	USP	8,50 mg
Acqua per iniezione (WFI)	USP	QS a 1,0 g

Esempio 3

Dopo produzione della composizione in massa concentrata, una composizione liofilizzata di calaspargase pegol può venire prodotta dalla composizione in massa concentrata. La FIGURA 1 mostra un esempio di un diagramma di flusso del procedimento che può venire usato per preparare una composizione stabile alla conservazione liofilizzata secondo realizzazioni della presente descrizione. La polvere di composizione liofilizzata per iniezione può venire prodotta in una fiala monouso contenente 3.750 IU di calaspargase pegol attivo (750 IU/ml dopo ricostituzione con 5,2 ml di WFI). I componenti della composizione liofilizzata possono comprendere il 4,5% di saccarosio, fosfato di sodio bibasico, fosfato di sodio monobasico e cloruro di sodio dopo la ricostituzione. La composizione della composizione liofilizzata viene fornita nella tabella 26.

Tabella 26: componenti della composizione di calaspargase pegol

Componente	Grado	Quantità per g*
Calaspargase pegol	n/a	750 IU
Fosfato di sodio bibasico	USP	2,79 mg
Fosfato di sodio monobasico	USP	0,60 mg
Cloruro di sodio	USP	4,25 mg
Saccarosio	National Formulary (NF)	45 mg
Acqua per iniezione (WFI)	USP	QS a 1,0 g

* i valori sono post-ricostituzione con WFI

Esempio 4

Lo scopo di questo studio consisteva nel fornire una informazione comparativa su farmacocinetica (PK), farmacodinamiche (PD) e immunogenicità per pegaspargasi liquida (PEG-L-asparaginasi; Oncaspar®) e pegaspargasi liofilizzata, quando somministrata intravenosamente mediante iniezione di bolo lenta, a cani Beagle una volta (giorno 1) o una volta alla settimana per 4 settimane (giorni 1, 15, 22, 29 e 36). Poiché la pegaspargasi liofilizzata ricostituita verrà somministrata intravenosamente a uomini, in questo studio è stata usata la stessa via di somministrazione. Uno studio PK/PD a dose singola e a dosi ripetute è stato necessario per determinare e confrontare le farmacocinetiche e le farmacodinamiche di versioni liquida e liofilizzata ricostituita a una dose equivalente.

A cani Beagle (nominalmente 5/sexo/gruppo) sono state somministrate 500 IU/mg di pegaspargasi liquida o pegaspargasi liofilizzata ricostituita mediante iniezione intravenosa a un volume della dose di 0,667 ml/kg (vedere la tabella 27). I Beagle avevano una età di approssimativamente 6 mesi con maschi da 7,2 kg fino a 10,7 kg e femmine da 5,6 kg fino a 8,2 kg.

Pegaspargasi liquida (5 ml di tampone di PBS con fosfato 50 mM e 0,85% di soluzione salina a pH 7,2-7,4) è stata usata come fornita e non è stata necessaria preparazione. Pegaspargasi liofilizzata (vedere l'esempio 1) è stata preparata per la somministrazione (usando una siringa da 21 gauge) ricostituendo i contenuti di una fiala con 5,2 ml di acqua per iniezione (WFI) usando tecniche asettiche per ottenere una concentrazione di 750 IU/ml. I contenuti della fiala sono stati delicatamente agitati a vortice fino a quando completamente disciolti. La miscela è

stata ispezionata visivamente per materiale particolato, torbidità o decolorazione prima della somministrazione. Formulazioni fresche sono state preparate per ciascun giorno di somministrazione delle dosi, mantenute a temperatura ambiente e usate entro 2 ore dalla preparazione.

Tabella 27: protocollo e regime di dosaggio

Gruppo	Trattamento	Dose (IU/kg)	Concentrazione (IU/ml)	Volume della dose (ml/kg)	Cani maschi	Cani femmina
1	Pegaspargasi liquida - Dose singola	500	750	0.667	5	6
2	Pegaspargasi liquida - Dose ripetuta	500	750	0.667	5	5
3	Pegaspargasi liofilizzata - Dose singola	500	750	0.667	5	5
4	Pegaspargasi liofilizzata - Dose ripetuta	500	750	0.667	6	5

Gli animali nei gruppi 1 e 3 hanno ricevuto una dose singola di pegaspargasi liquida o pegaspargasi liofilizzata rispettivamente il giorno 1. Agli animali nei gruppi 2 e 4 sono state somministrate dosi ripetute di, rispettivamente, pegaspargasi liquida o pegaspargasi liofilizzata. Iniezioni intravenose di bolo lento (in approssimativamente 2 minuti) entro 2 ore dalla preparazione dell'articolo di test sono state somministrate. È stato usato un catetere fisso (non un catetere a farfalla), facendo seguire lavaggio con soluzione salina per pulire la chiusura del catetere da qualsiasi volume della dose rimanente. Un ago diritto è stato inserito nella chiusura del catetere per garantire che il posizionamento dell'ago possa rimanere coerente per la durata di 2 minuti.

Campioni di sangue sono stati ottenuti da tutti gli animali i giorni 1 e 36 per l'analisi farmacocinetica e delle farmacodinamiche. Approssimativamente 1,0 ml di sangue intero sono stati ottenuti a ciascun punto di tempo. Gli animali non sono stati sottoposti ad anestesia e non erano a digiuno prima del prelievo del sangue. Il sangue è stato raccolto in provette contenenti anticoagulante di sodio eparina e sono state poste su ghiaccio secco in posizione verticale. La centrifugazione per 5 minuti (ad approssimativamente 3.000 giri/minuto, ad approssimativamente 4°C) del campione di sangue per ottenere plasma è iniziata entro 5 minuti dal prelievo del campione di sangue.

PD: una aliquota di 125 µl di plasma è stata pipettata in una crioprovetta pre-riempita con 125 µl di SeraPrep per la determinazione dell'asparagina. La provetta è stata capovolta 3 volte per miscelare SeraPrep e congelata rapidamente immediatamente con azoto liquido o metanolo/ghiaccio secco entro 15 minuti dal prelievo del campione di sangue. Tutte le aliquote contenenti SeraPrep sono state analizzate per la determinazione

dell'asparagina mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) con rilevazione spettrometrica di massa (LC-MS/MS).

PK: il rimanente del plasma è stato diviso in due crioprovette per la determinazione dell'attività di asparaginasi e congelato rapidamente entro 30 minuti dal prelievo del campione di sangue. Tutte le aliquote non contenenti SeraPrep sono state analizzate per l'attività di asparaginasi mediante reazione enzimatica mista colorimetrica.

Risultati

Le analisi condotte durante il periodo di trattamento per pegaspargasi liofilizzata hanno confermato che sono state somministrate formulazioni della dose di concentrazione appropriata (concentrazione di proteina prevista di 6,6 mg/ml e attività di 741 IU/ml, per analisi del lotto) (tabella 28).

Tabella 28: chimica analitica

Intervallo	Proteina (mg/ml)		Attività (IU/ml)	
	Maschio	Femmina	Maschio	Femmina
Iniezione giorno 1	6.36	6.30	738	722
Iniezione giorno 2	6.55	6.54	794	785
Iniezione giorno 36	6.30	6.44	722	741

Concentrazioni medie nel plasma (C_{max}) di asparaginasi per gruppi riunite e aree medie sotto le curve concentrazione di asparaginasi nel plasma-tempo stimate fino a 552 ore post-dose (AUC₀₋₅₅₂) per gruppi riunite il giorno 1 e dopo dosaggio ripetuto il giorno 36 sono riassunte per ciascun gruppo (sessi combinati) nella tabella 29.

Tabella 29: bioequivalenza: dati medi per gruppi riuniti (sessi combinati)

Formulazione (500 IU/kg)		C _{max} media per gruppi (mIU/ml)		AUC ₀₋₅₅₂ media per gruppi (mIU.h/ml)	
		Giorno 1	Giorno 36	Giorno 1	Giorno 36
Liquida	Media geometrica	9947	19440	2929202	4514287
	Media	10018	19580	2953000	4561000
	SD	1300	2404	405245	648322
	CV%	13.0	12.3	13.7	14.2
Liofilizzata	Media geometrica	9393	17416	2603255	4258048
	Media	9416	17480	2611000	4350000
	SD	688	1555	214758	797663
	CV%	7.3	8.9	8.2	18.3

Lo studio è stato progettato come un progetto in gruppi paralleli e i dati sono stati analizzati statisticamente usando tecniche di analisi della varianza. Dati C_{max} e AUC₀₋₅₅₂ ottenuti da entrambi i giorni sono stati analizzati usando

un modello ANOVA con formulazione, tempo, sesso e loro interazioni come fattori.

Le due formulazioni di pegaspargasi sono state analizzate rispetto a C_{max} e AUC_{0-552} e i corrispondenti IC al 90% da due lati per il rapporto delle medie geometriche sono riassunti nella tabella 30.

Tabella 30: dati farmacocinetici

Parametro	Tabella delle medie della formulazione (ritrasformate - mIU/ml)		Intervallo di confidenza del 90% del rapporto delle medie (liofilizzata/liquida)		
	Liofilizzata	Liquida	Minore	Rapporto	Superiore
C_{max}	12790	13943	0.867	0.917	0.970
AUC_{0-552}	3329382	3636380	0.841	0.916	0.996

Per C_{max} vi è stata evidenza di bioequivalenza quando l'intervallo di confidenza (0,867 fino a 0,970) era contenuto nella regione critica. Per AUC_{0-552} vi è stata evidenza di bioequivalenza quando l'intervallo di confidenza (0,841 fino a 0,996) era contenuto nella regione critica.

Le concentrazioni massime medie nel plasma (C_{max}) di pegaspargasi e le aree medie sotto le curve concentrazione di pegaspargasi nel plasma-tempo stimate fino a 552 ore post-dose (AUC_{0-552}) il giorno 1 e dopo dosaggio ripetuto il giorno 36 sono riassunte in seguito (per sesso) con deviazioni standard fra parentesi nella tabella 31.

Tabella 31: profili concentrazione nel plasma-tempo

Formulazione (500 IU/kg)	C_{max} (mIU/ml)				AUC_{0-552} (mIU.h/ml)			
	Giorno 1		Giorno 36		Giorno 1		Giorno 36	
	Maschi	Femmine	Maschi	Femmine	Maschi	Femmine	Maschi	Femmine
Liquida	10700 (1600)	9450 (610)	20200 (2700)	19000 (2200)	3250000 (370000)	2660000 (140000)	4660000 (690000)	4470000 (670000)
Liofilizzata	9580 (540)	9250 (840)	17800 (1400)	17200 (1800)	2700000 (190000)	2520000 (220000)	4170000 (1120000)	4530000 (320000)

Le relazioni fra le concentrazioni massime medie nel plasma (C_{max}) di asparaginasi, aree medie sotto le curve concentrazione di asparaginasi nel plasma-tempo (AUC_{0-552}) e il livello della dose per la formulazione liofilizzata sono espresse come un rapporto rispetto alla formulazione liquida e presentate nella tabella 32.

Tabella 32: relazione fra C_{max} media, AUC media e livello della dose

Formulazione (500 IU/kg)	Rapporto del livello della dose	Rapporto C_{max}				Rapporto AUC_{0-552}			
		Giorno 1		Giorno 36		Giorno 1		Giorno 36	
		Maschi	Femmine	Maschi	Femmine	Maschi	Femmine	Maschi	Femmine
Liquida	1	1	1	1	1	1	1	1	
Liofilizzata	1	0.90	0.98	0.88	0.91	0.83	0.95	0.89	1.0

I valori di C_{max} e AUC_{0-552} di esposizione sistemica di cani ad asparaginasi erano simili dopo somministrazione

di pegaspargasi liofilizzata ricostituita, rispetto alla formulazione liquida, il giorno 1 e dopo somministrazioni ripetute il giorno 36. Non vi è stata evidenza di una differenza significativa fra le formulazioni per AUC_{0-552} , ma vi è stata una certa evidenza di una differenza fra i valori di C_{max} delle differenti formulazioni in cui C_{max} dopo somministrazione del prodotto liofilizzato era leggermente minore (8%) rispetto a quando dosato come formulazione liquida.

I valori di C_{max} e AUC_{0-552} di esposizione sistemica di cani femmina ad asparaginasi erano generalmente simili a queglii indici di esposizione in maschi e non vi è stata evidenza di qualsiasi differenza correlata al sesso statisticamente significativa in esposizione sistemica per C_{max} o AUC_{0-552} .

Altri parametri valutati durante lo studio sono stati: vitalità, osservazioni cliniche, peso corporeo, consumo di cibo, frequenze respiratorie, temperatura corporea, ematologia, coagulazione e composizione chimica del sangue; per questi non sono stati osservati effetti avversi correlati all'articolo del test.

Dopo dosi intravenose ripetute (giorno 36) i valori di C_{max} e l'entità (AUC_{0-552}) di esposizione sistemica di cani ad asparaginasi erano superiori rispetto a quei valori dopo una singola dose (giorno 1) e queste differenze erano statisticamente significativa ($p < 0,001$). I rapporti di accumulo medi, calcolati in base ai valori di AUC_{0-552} (si noti che differenti animali hanno fornito i dati ciascun giorno), erano maggiori di 1 indicando che si è verificato accumulo di asparaginasi dopo somministrazione intravenosa ripetuta di pegaspargasi liquida.

Globalmente, le due formulazioni di pegaspargasi hanno dimostrato di essere equivalenti per quanto riguarda C_{max} e AUC_{0-552} , poiché IC al 90% da due lati corrispondenti per il rapporto delle medie geometriche cadono completamente entro i margini convenzionali di bioequivalenza nell'intervallo da 0,8 fino a 1,25. Non vi è stata differenza significativa fra le due formulazioni per AUC_{0-552} . L'esposizione sistemica ad asparaginasi è stata simile con i due prodotti e un certo accumulo si è verificato in entrambi i sessi con dosaggio ripetuto. L'asparagina è stata completamente soppressa per fino a 336 ore in tutti gli animali e fino a 552 ore nella maggior parte di loro.

Riassumendo, non vi sono state differenze evidenti fra dosi di 500 IU/kg con la pegaspargasi liquida o la pegaspargasi liofilizzata ricostituita e avevano profili farmacocinetici, farmacodinamici e immunogenici comparabili.

RIVENDICAZIONI

1. Composizione liofilizzata ricostituita comprendente:

ossido di polialchilene-asparaginasi a una concentrazione da 100 fino a 5.000 IU per ml di detta composizione;

fosfato di sodio bibasico a una concentrazione dallo 0,1 fino allo 0,8% in peso;

fosfato di sodio monobasico a una concentrazione dallo 0,01 fino allo 0,5% in peso;

un sale a una concentrazione dallo 0,05 fino all'1% in peso; e

uno zucchero a una concentrazione dallo 0,1 fino al 25% in peso,

in cui ossido di polialchilene-asparaginasi comprende una asparaginasi legata covalentemente a un gruppo di ossido di polialchilene.

2. Composizione secondo la rivendicazione 1, in cui:

a. la concentrazione di fosfato di sodio bibasico è dallo 0,1 fino allo 0,5% in peso, o dallo 0,2 fino allo 0,3% in peso; e

b. la concentrazione di fosfato di sodio monobasico è dallo 0,01 fino allo 0,1% in peso o 0,05-0,07% in peso.

3. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui

la concentrazione di zucchero è dallo 0,5 fino al 20% in peso, dall'1 fino al 10% in peso, o dal 4 fino al 5% in peso.

4. Composizione secondo qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui il sale è cloruro di sodio, cloruro di potassio, cloruro di calcio, cloruro di magnesio o una loro combinazione, opzionalmente in cui il sale è cloruro di sodio.

5. Composizione secondo qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui lo zucchero è un monosaccaride, un disaccaride o un polisaccaride; opzionalmente in cui lo zucchero è saccarosio, mannitolo, maltosio, trealosio, 2-idrossipropil-beta-ciclodestrina (β -HPCD), lattosio, glucosio, fruttosio, galattosio, glucosammina, o loro combinazioni, inoltre opzionalmente in cui lo zucchero è saccarosio.

6. Composizione secondo qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui la concentrazione di ossido di polialchilene-asparaginasi è:

a. da 500 fino a 1.000 IU per ml di detta composizione;

b. da 700 fino a 800 IU per ml di detta composizione; o

c. 750 IU per ml di detta composizione.

7. Composizione secondo qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui il gruppo di ossido di polialchilene comprende un gruppo di polietilenglicole, opzionalmente in cui

a. il gruppo di polietilenglicole ha un peso molecolare nell'intervallo da 2.000 fino a 10.000 dalton; o

b. il gruppo di polietilenglicole ha un peso molecolare di 5.000 dalton.

8. Composizione secondo qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui il legante è un legante di uretano o succinato.

9. Composizione secondo qualsiasi delle rivendicazioni 1-8, in cui la composizione comprende inoltre idrossido di sodio o acido cloridrico.

10. Composizione stabile alla conservazione liofilizzata comprendente:

ossido di polialchilene-asparaginasi;

un tampone che comprende fosfato di sodio bibasico e fosfato di sodio monobasico;

un sale; e

uno zucchero,

in cui la composizione stabile alla conservazione liofilizzata è in grado di formare la composizione di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-9 mediante ricostituzione della composizione stabile alla conservazione liofilizzata con acqua per iniezione (WFI).

11. Metodo di preparazione di una composizione di ossido di polialchilene-asparaginasi liofilizzata, in cui il metodo comprende la liofilizzazione di una composizione concentrata acquosa comprendente:

(i) ossido di polialchilene-asparaginasi comprendente un gruppo di ossido di polialchilene legato covalentemente mediante un legante a una asparaginasi;

(ii) un tampone, che comprende fosfato di sodio bibasico e fosfato di sodio monobasico;

(iii) un sale; e

(iv) uno zucchero

in un modo sufficiente per produrre una composizione di ossido di polialchilene-asparaginasi stabile alla conservazione liofilizzata della rivendicazione 10,

opzionalmente in cui il metodo comprende inoltre l'introduzione di una composizione concentrata acquosa in un contenitore di dosaggi unitari e la liofilizzazione della composizione concentrata acquosa nel contenitore di dosaggi unitari, opzionalmente in cui il contenitore di dosaggi unitari è una fiala, come una fiala in vetro sigillata.

12. Composizione di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-10, per l'uso in un metodo di trattamento di un soggetto per una condizione neoplastica.

13. Composizione per l'uso secondo la rivendicazione 12, in cui la condizione neoplastica è un cancro, opzionalmente in cui il cancro è leucemia, opzionalmente in cui la leucemia è:

(i) leucemia linfoblastica acuta (ALL), o

(ii) leucemia mieloide acuta (AML).

14. Composizione per l'uso secondo la rivendicazione 12 o la rivendicazione 13, in cui al soggetto è stato prescritto un regime di trattamento che comprende una fase di induzione, una fase di consolidamento e una fase di mantenimento,

opzionalmente in cui il metodo comprende la somministrazione di una unità di dosaggio singola al soggetto nella fase di induzione e unità di dosaggio multiple durante la fase di mantenimento,

inoltre opzionalmente in cui le unità di dosaggio multiple vengono somministrate al soggetto somministrando una unità di dosaggio al soggetto ogni 3 settimane o ogni 2 settimane.

15. Composizione per l'uso secondo qualsiasi delle rivendicazioni 12-14, in cui:

a. il soggetto è un giovane; o

b. il soggetto è un adulto.

16. Kit comprendente uno o più contenitori di dosaggi unitari, ciascuno contenente una composizione stabile alla conservazione liofilizzata secondo la rivendicazione 10.

LEGENDA – DISEGNI

TAVOLA 1/13	
FIG. 1	
ASPARAGINASE SOLUTION PREPARATION	PREPARAZIONE DI UNA SOLUZIONE DI ASPARAGINASI
PEGylation	PEGilazione
CLARIFICATION	CHIARIFICAZIONE
DIAFILTRATION/CONCENTRATION	DIAFILTRAZIONE/CONCENTRAZIONE
DILUTION	DILUIZIONE
STERILE FILTRATION & FILL INTO STERILE CONTAINER	FILTRAZIONE STERILE & RIEMPIMENTO IN CONTENITORE STERILE
STORE IN STERILE CONTAINER	CONSERVAZIONE IN CONTENITORE STERILE
TAVOLA 2/13	
FIG. 2	
ONCASPAR – LYOPHILIZED	ONCASPAR –LIOFILIZZATO
PURITY AT 40°C	PUREZZA A 40°C
PURITY (%)	PUREZZA (%)
LOT ...	LOTTO ...
WEEKS	SETTIMANE
TAVOLA 3/13	
FIG. 3	
ONCASPAR – LYOPHILIZED	ONCASPAR –LIOFILIZZATO
POTENCY AT 40°C	POTENZA A 40°C
POTENCY (IU/mL)	POTENZA (IU/ml)

LOT ...	LOTTO ...
WEEKS	SETTIMANE
TAVOLA 4/13	
FIG. 4	
ONCASPAR – LYOPHILIZED	ONCASPAR – LIOFILIZZATO
PURITY AT 25°C	PUREZZA A 25°C
PURITY (%)	PUREZZA (%)
LOT ...	LOTTO ...
WEEKS	SETTIMANE
TAVOLA 5/13	
FIG. 5	
ONCASPAR – LYOPHILIZED	ONCASPAR - LIOFILIZZATO
POTENCY AT 25°C	POTENZA A 25°C
POTENCY (IU/mL)	POTENZA (IU/ml)
LOT ...	LOTTO ...
WEEKS	SETTIMANE
TAVOLA 6/13	
FIG. 6	
COMPONENTS/RAW MATERIALS	COMPONENTI/MATERIALI GREZZI
<u>EXCIPIENT BUFFER</u>	<u>TAMPONE ECCIPIENTE</u>
WATER FOR INJECTION	ACQUA PER INIEZIONE
DIBASIC SODIUM PHOSPHATE	FOSFATO DI SODIO BIBASICO
MONOBASIC SODIUM PHOSPHATE	FOSFATO DI SODIO MONOBASICO
SODIUM CHLORIDE	CLORURO DI SODIO
SUCROSE	SACCAROSIO

CONCENTRATED ONCASPAR BULK	MASSA DI ONCASPAR CONCENTRATA
PROCESS STEP	FASE DEL PROCEDIMENTO
<u>FINAL FORMULATION:</u>	<u>FORMULAZIONE FINALE:</u>
2 μ M FILTRATION	FILTRAZIONE DA 2 μ M
<u>FILTRATION</u>	<u>FILTRAZIONE</u>
10 L BIOBAG	BIOSACCA DA 10 l
IN-PROCESS TESTING	VALUTAZIONE DURANTE IL PROCEDIMENTO
SUCROSE ASSAY	SAGGIO PER SACCAROSIO
pH TESTING	VALUTAZIONE DEL pH
<u>PRE-LYO (STPS)</u>	PRE-LIOFILIZZAZIONE (STPS)
DRUG PRODUCT RELEASE	RILASCIO DEL PRODOTTO FARMACEUTICO
<u>FINAL FORMULATION</u>	FORMULAZIONE FINALE
PROTEIN	PROTEINA
DENSITY	DENSITÀ
SUCROSE ASSAY	SAGGIO DI SACCAROSIO
PRE-FILTRATION BIOBURDEN (> 10 cfu/100 mL)	CARICA MICROBICA PRE-FILTRAZIONE (> 10 cfu/100 ml)
TAVOLA 7/13	
FIG. 7	
COMPONENTS/RAW MATERIALS	COMPONENTI/MATERIALI GREZZI
APYROGENIC AND STERILE GLASS VIALS	FIALA IN VETRO APIROGENA E STERILE
STERILE FILLING EQUIPMENT	APPARECCHIATURA PER RIEMPIMENTO STERILE
STERILE STOPPERS	TAPPI STERILI
PROCESS STEP	FASE DEL PROCEDIMENTO

ASEPTIC FILLING PARTIAL	RIEMPIMENTO ASETTICO
STOPPERING VIALS	CHIUSURA PARZIALE DELLE FIALE
<u>LYOPHILIZATION</u>	<u>LIOFILIZZAZIONE</u>
THERMAL TREATMENT PHASE	FASE DI TRATTAMENTO TERMICO
FREEZE CONDENSER AND EVACUATE PHASE	CONDENSATORE DI CONGELAMENTO E FASE DI FORMAZIONE DEL VUOTO
PRIMARY DRY PHASE	FASE DI ESSICCAMENTO PRIMARIO
SECONDARY DRY PHASE	FASE DI ESSICCAMENTO SECONDARIO
STOPPERING PHASE	FASE DI CHIUSURA
IN-PROCESS TESTING	VALUTAZIONE DURANTE IL PROCEDIMENTO
FILL WEIGHT	PESO DI RIEMPIMENTO
ALERT: 2.38-2.62 g	ALLERTA: 2,38-2,62 g
ACTION: 2.43-2.57 g	AZIONE: 2,43-2,57 g
VISUAL INSPECTION	ISPEZIONE VISIVA
VIALS	FIALE
STOPPERS	TAPPI
<u>CRITICAL PROCESS PARAMETERS:</u>	<u>PARAMETRI CRITICI DEL PROCEDIMENTO:</u>
TEMPERATURE SET POINT	PUNTO DI REGOLAZIONE DELLA TEMPERATURA
RAMP TIME	TEMPO DI AUMENTO
SOAK TIME	TEMPO DI PERMANENZA
VAC. CONT. S. P. mT	CONTENITORE SOTTO VUOTO S. P. mT
TAVOLA 8/13	
FIG. 8-9	
PURITY BY GF-HPLC (%) VS. TIME (MONTHS)	PUREZZA MEDIANTE GF-HPLC (%) RISPETTO

	AL TEMPO (MESI)
LOT ...	LOTTO ...
PURITY BY GF-HPLC (%)	PUREZZA MEDIANTE GF-HPLC (%)
SPECIFICATION	SPECIFICA
TIME (MONTHS)	TEMPO (MESI)
POTENCY (ACTIVITY) (U/mL) VS. TIME (MONTHS)	POTENZA (ATTIVITÀ) (U/ml) RISPETTO AL TEMPO (MESI)
UPPER SPECIFICATION	SPECIFICA SUPERIORE
POTENCY (ACTIVITY) (U/mL)	POTENZA (ATTIVITÀ) (U/ml)
LOWER SPECIFICATION	SPECIFICA INFERIORE
TAVOLA 9/13	
FIG. 10	
% TOTAL AGGREGATES BY GF-HPLC VS. TIME (MONTHS)	% AGGREGATI TOTALI MEDIANTE GF-HPLC RISPETTO AL TEMPO (MESI)
SPECIFICATION	SPECIFICA
LOT ...	LOTTO ...
% TOTAL AGGREGATES BY GF-HPLC	% AGGREGATI TOTALI MEDIANTE GF-HPLC
TIME (MONTHS)	TEMPO (MESI)
TAVOLA 10/13	
FIG. 11-12	
PURITY BY GF-HPLC (%) VS. TIME (MONTHS)	PUREZZA MEDIANTE GF-HPLC (%) RISPETTO AL TEMPO (MESI)
LOT ...	LOTTO ...
PURITY BY GF-HPLC (%)	PUREZZA MEDIANTE GF-HPLC (%)
SPECIFICATION	SPECIFICA

TIME (MONTHS)	TEMPO (MESI)
POTENCY (ACTIVITY) (U/mL) VS. TIME (MONTHS)	POTENZA (ATTIVITÀ) (U/ml) RISPETTO AL TEMPO (MESI)
UPPER SPECIFICATION	SPECIFICA SUPERIORE
POTENCY (ACTIVITY) (U/mL)	POTENZA (ATTIVITÀ) (U/ml)
LOWER SPECIFICATION	SPECIFICA INFERIORE
TAVOLA 11/13	
FIG. 13	
% TOTAL AGGREGATES BY GF-HPLC VS. TIME (MONTHS)	% AGGREGATI TOTALI MEDIANTE GF-HPLC RISPETTO AL TEMPO (MESI)
LOT ...	LOTTO ...
SPECIFICATION	SPECIFICA
% TOTAL AGGREGATES BY GF-HPLC	% AGGREGATI TOTALI MEDIANTE GF-HPLC
TIME (MONTHS)	TEMPO (MESI)
TAVOLA 12/13	
FIG. 14-15	
PURITY BY GF-HPLC (%) VS. TIME (MONTHS)	PUREZZA MEDIANTE GF-HPLC (%) RISPETTO AL TEMPO (MESI)
LOT ...	LOTTO ...
PURITY BY GF-HPLC (%)	PUREZZA MEDIANTE GF-HPLC (%)
SPECIFICATION	SPECIFICA
TIME (MONTHS)	TEMPO (MESI)
POTENCY (ACTIVITY) (U/mL) VS. TIME (MONTHS)	POTENZA (ATTIVITÀ) (U/ml) RISPETTO AL TEMPO (MESI)
UPPER SPECIFICATION	SPECIFICA SUPERIORE

POTENCY (ACTIVITY) (U/mL)	POTENZA (ATTIVITÀ) (U/ml)
LOWER SPECIFICATION	SPECIFICA INFERIORE
TAVOLA 13/13	
FIG. 16	
% TOTAL AGGREGATES BY GF-HPLC VS. TIME (MONTHS)	% AGGREGATI TOTALI MEDIANTE GF-HPLC RISPETTO AL TEMPO (MESI)
LOT ...	LOTTO ...
SPECIFICATION	SPECIFICA
% TOTAL AGGREGATES BY GF-HPLC	% AGGREGATI TOTALI MEDIANTE GF-HPLC
TIME (MONTHS)	TEMPO (MESI)

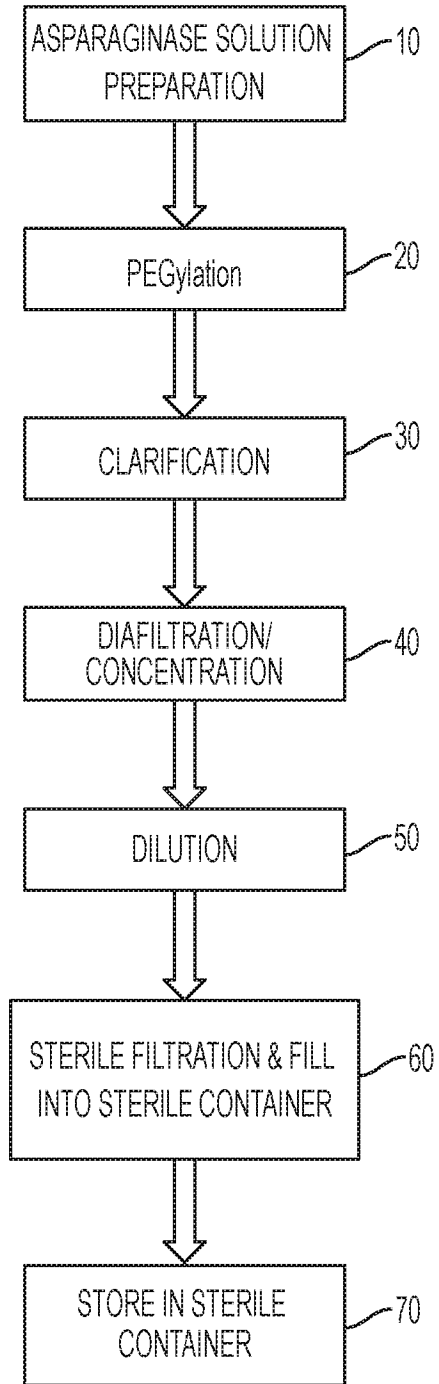


FIG. 1

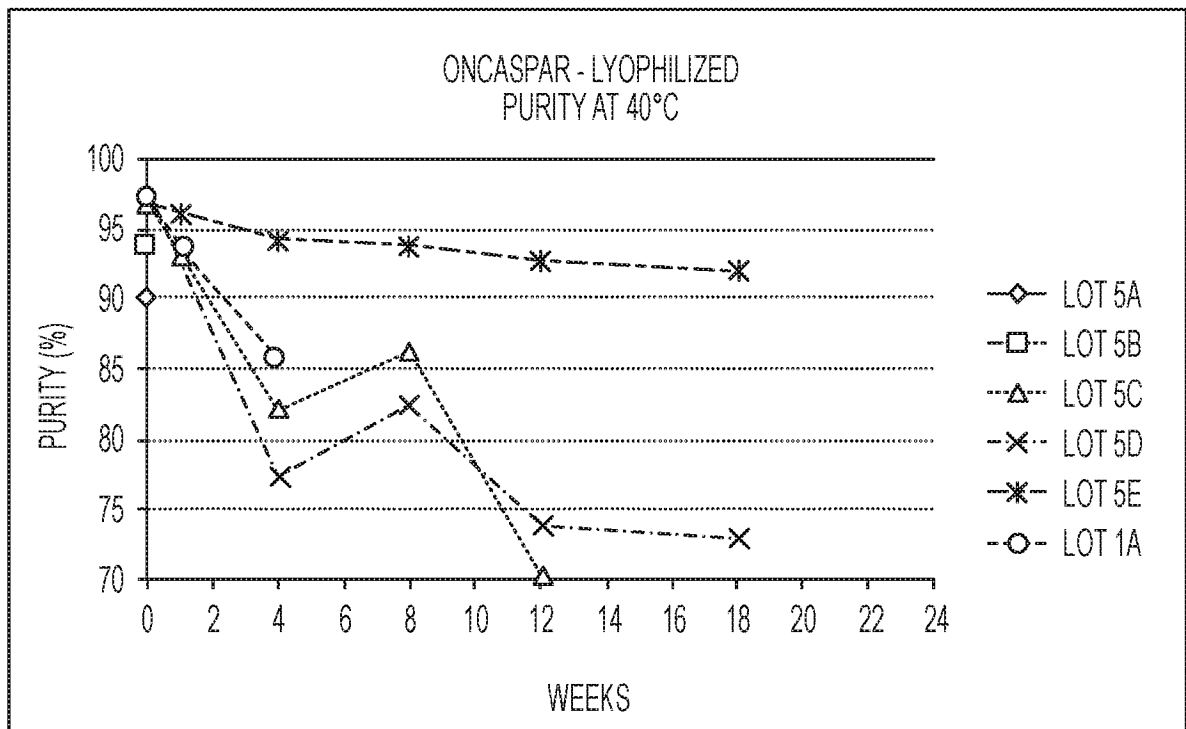


FIG. 2

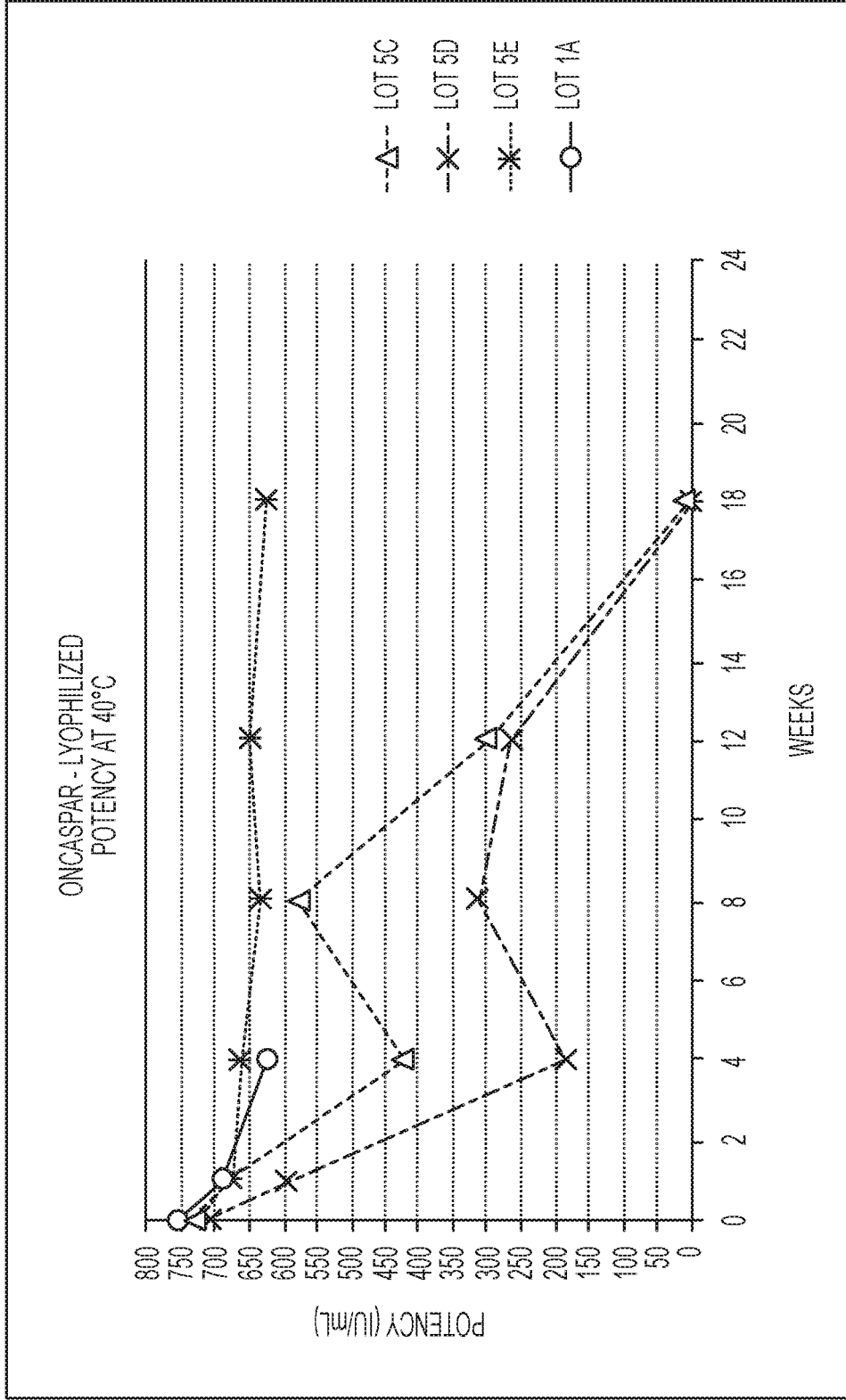


FIG. 3

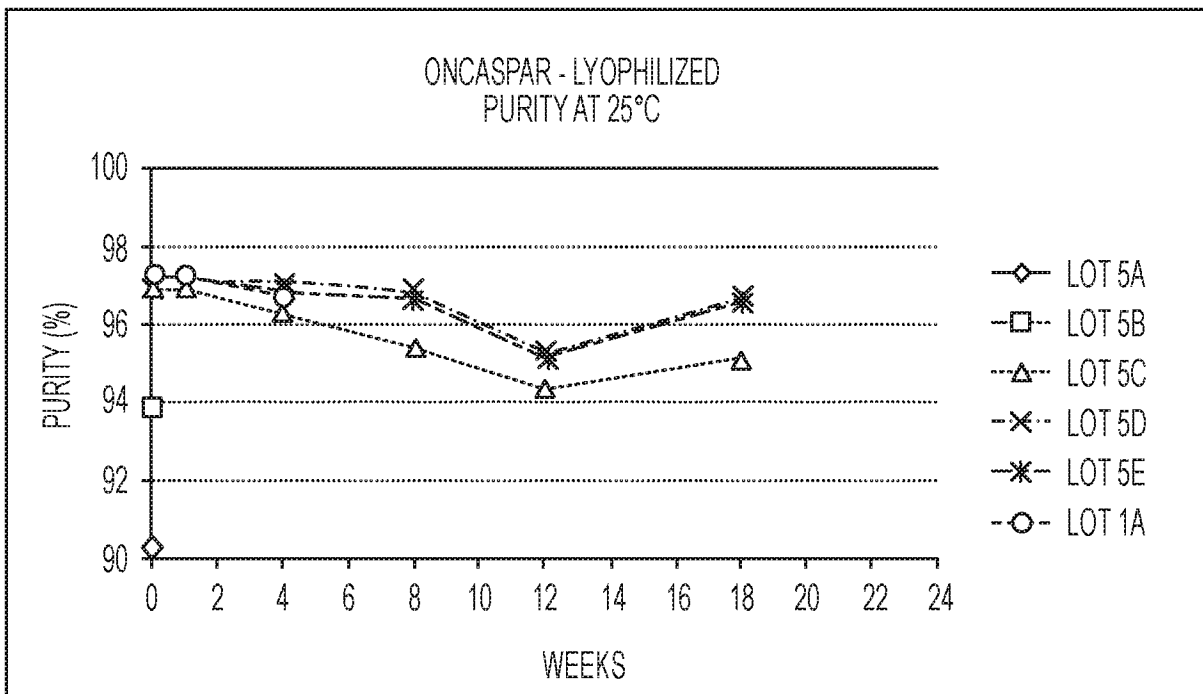


FIG. 4

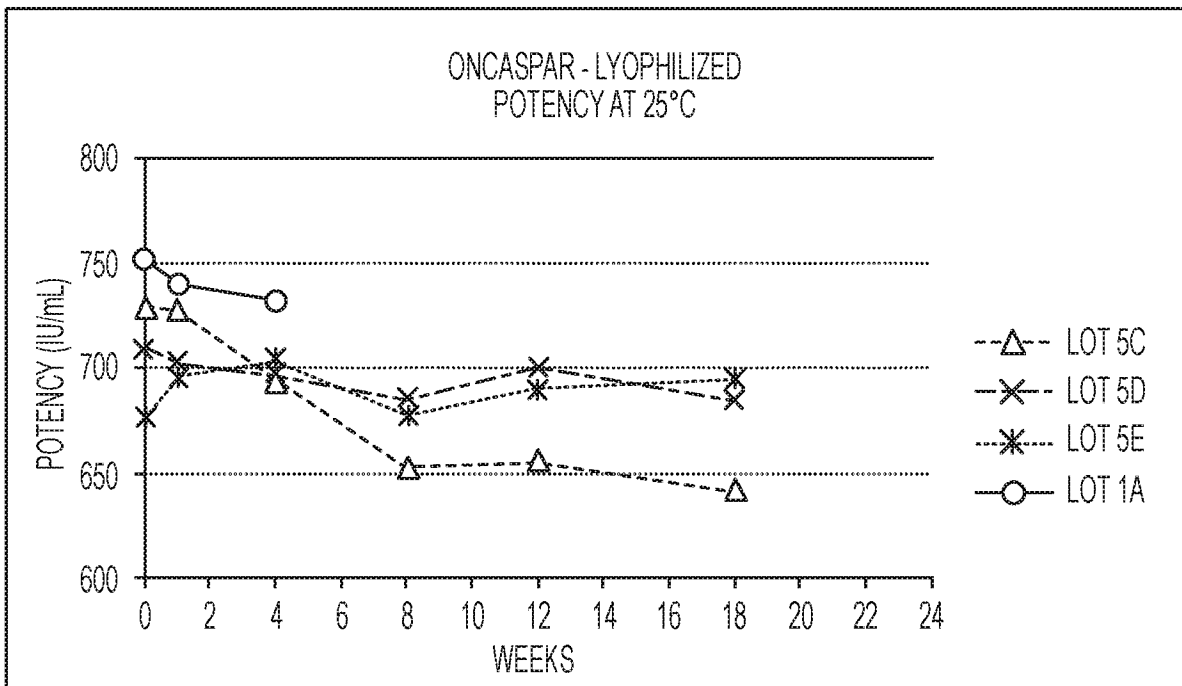


FIG. 5

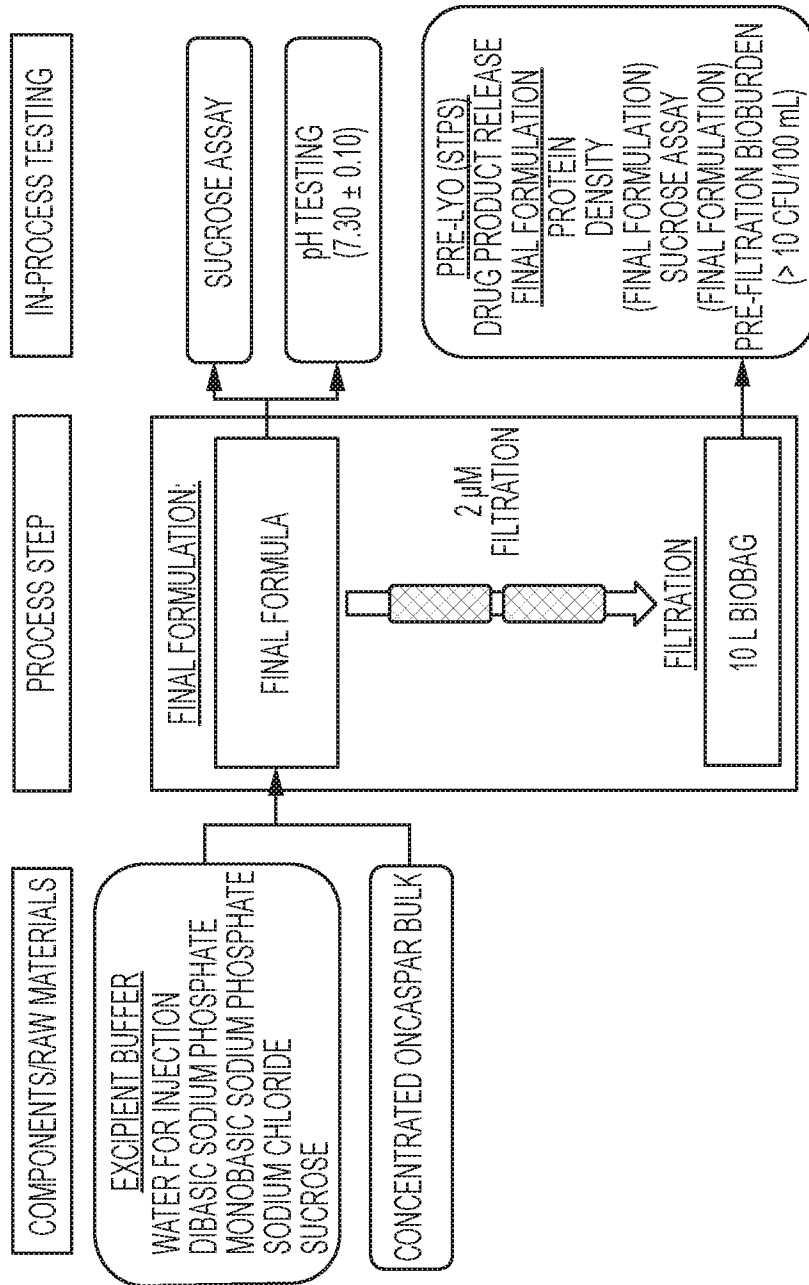


FIG. 6

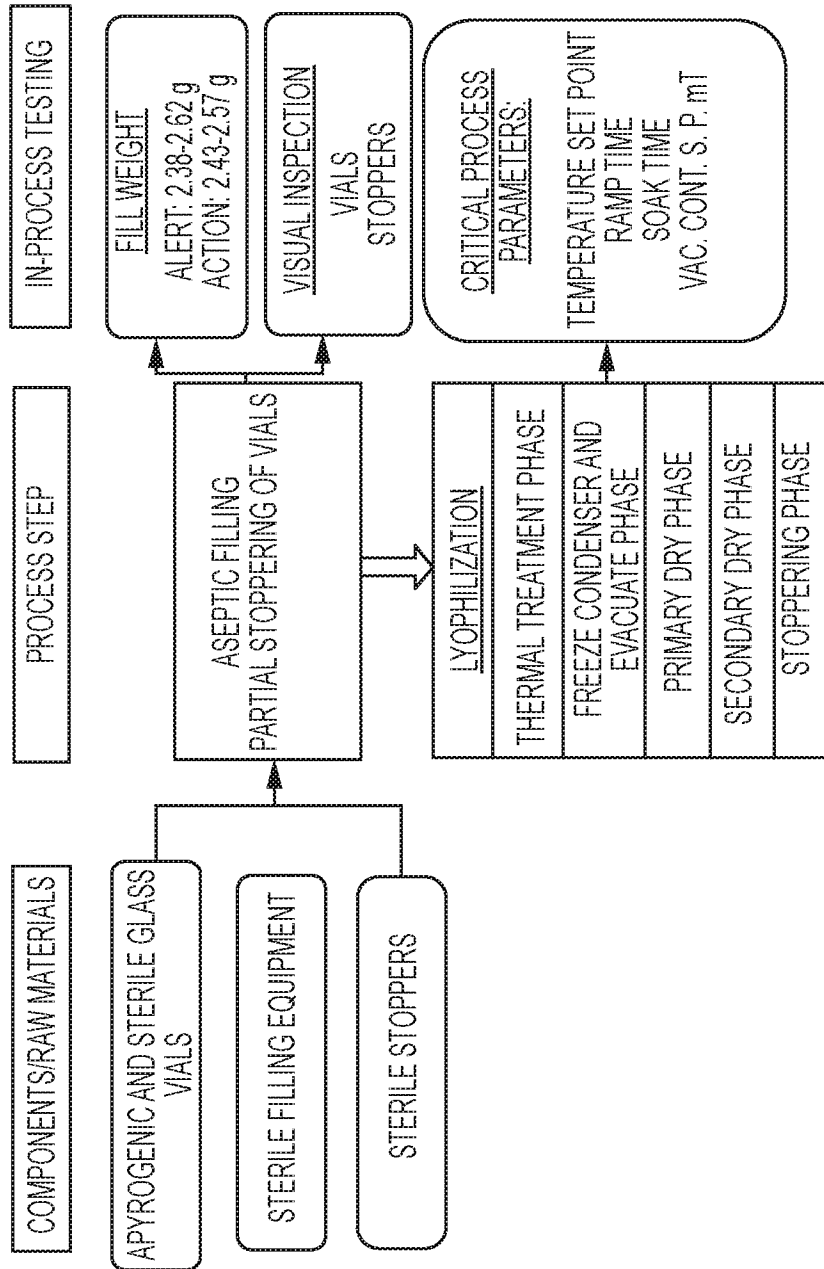


FIG. 7

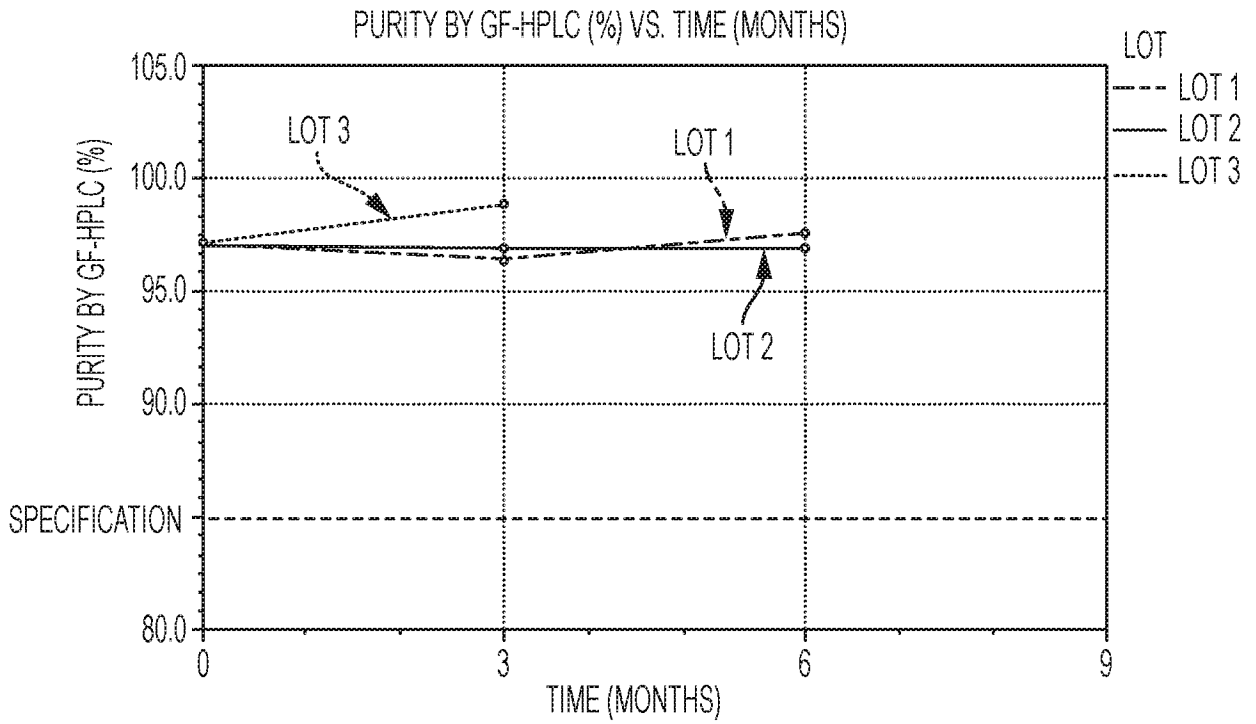


FIG. 8

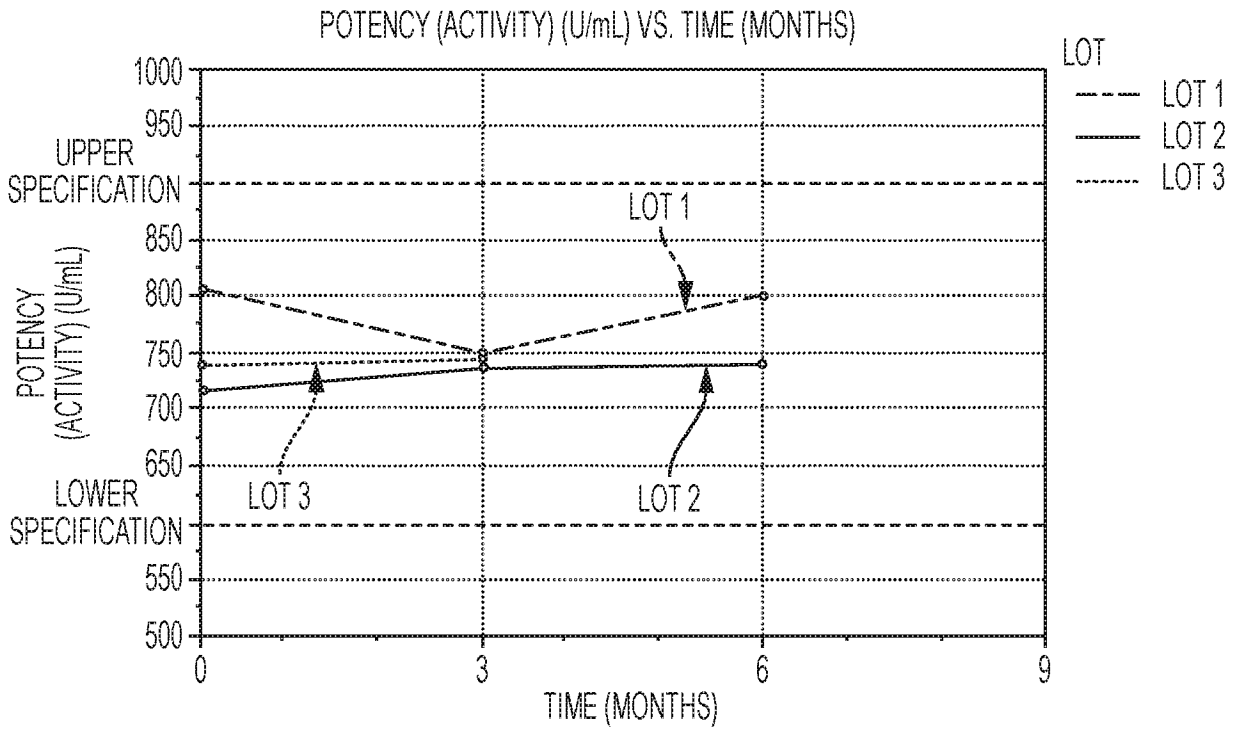


FIG. 9

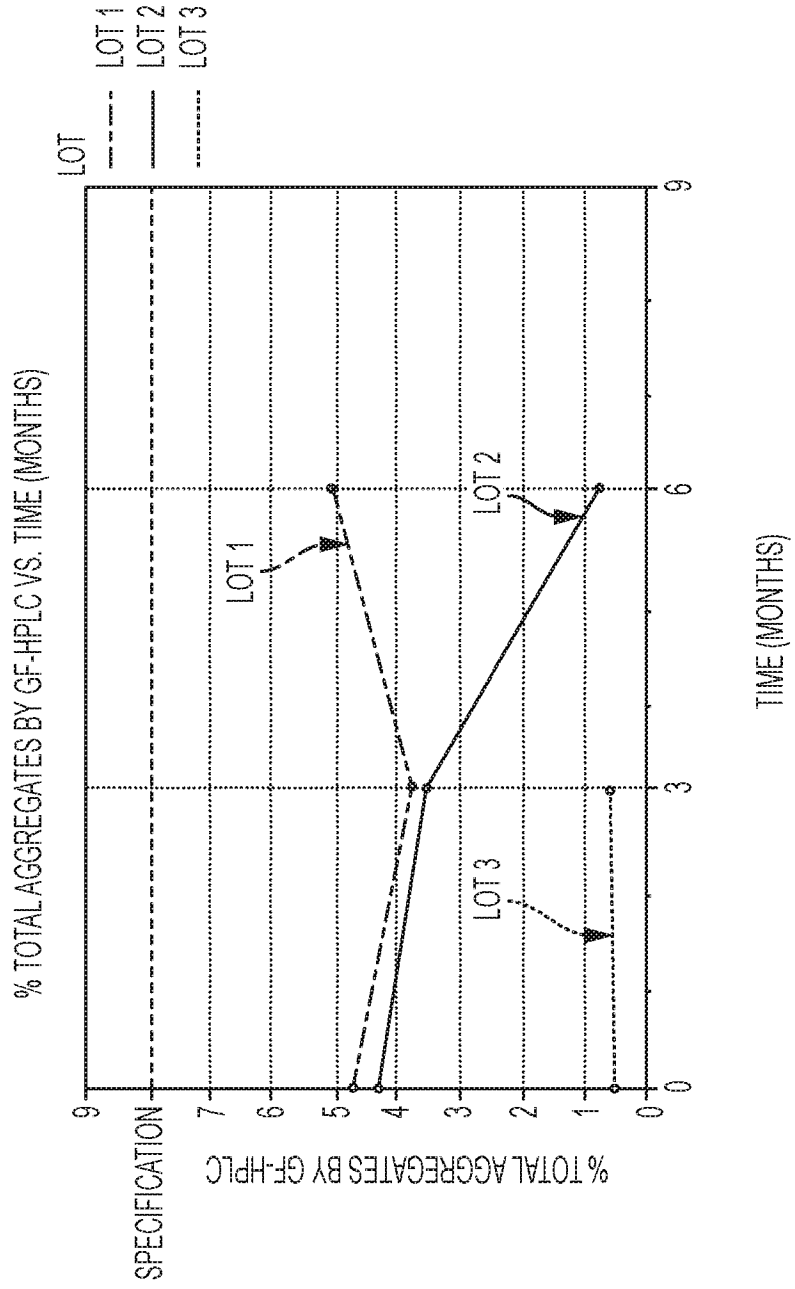


FIG. 10

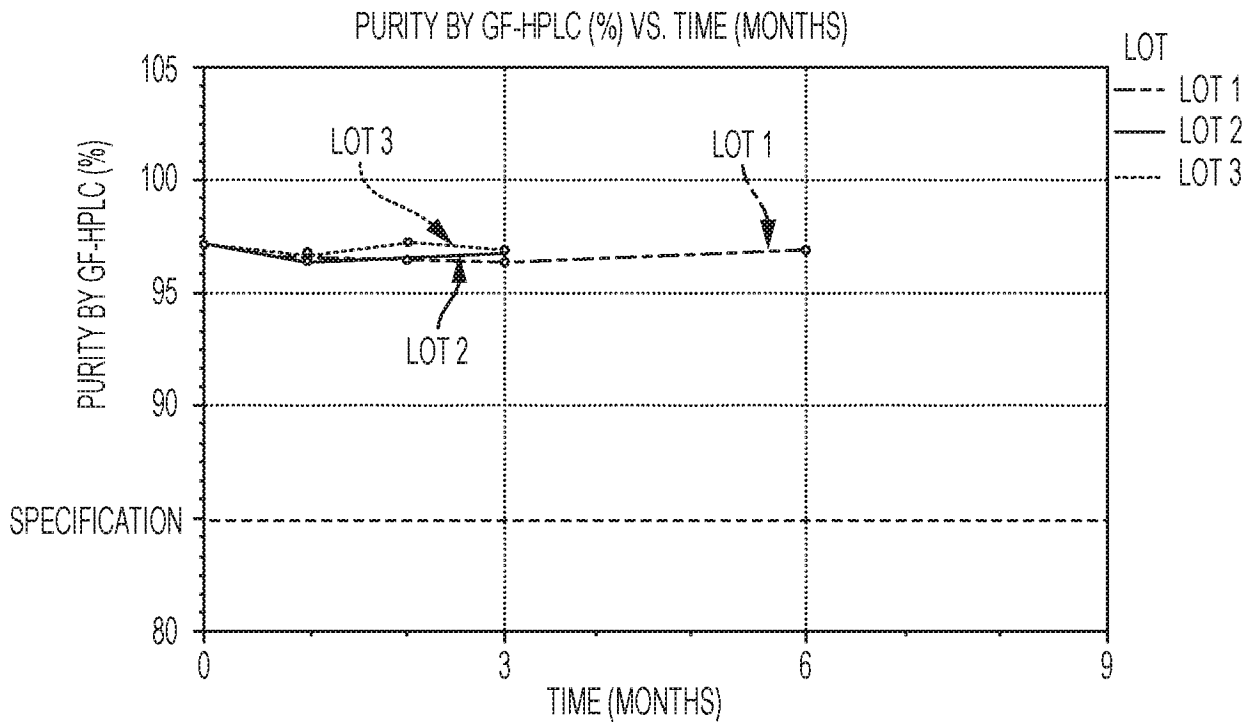


FIG. 11

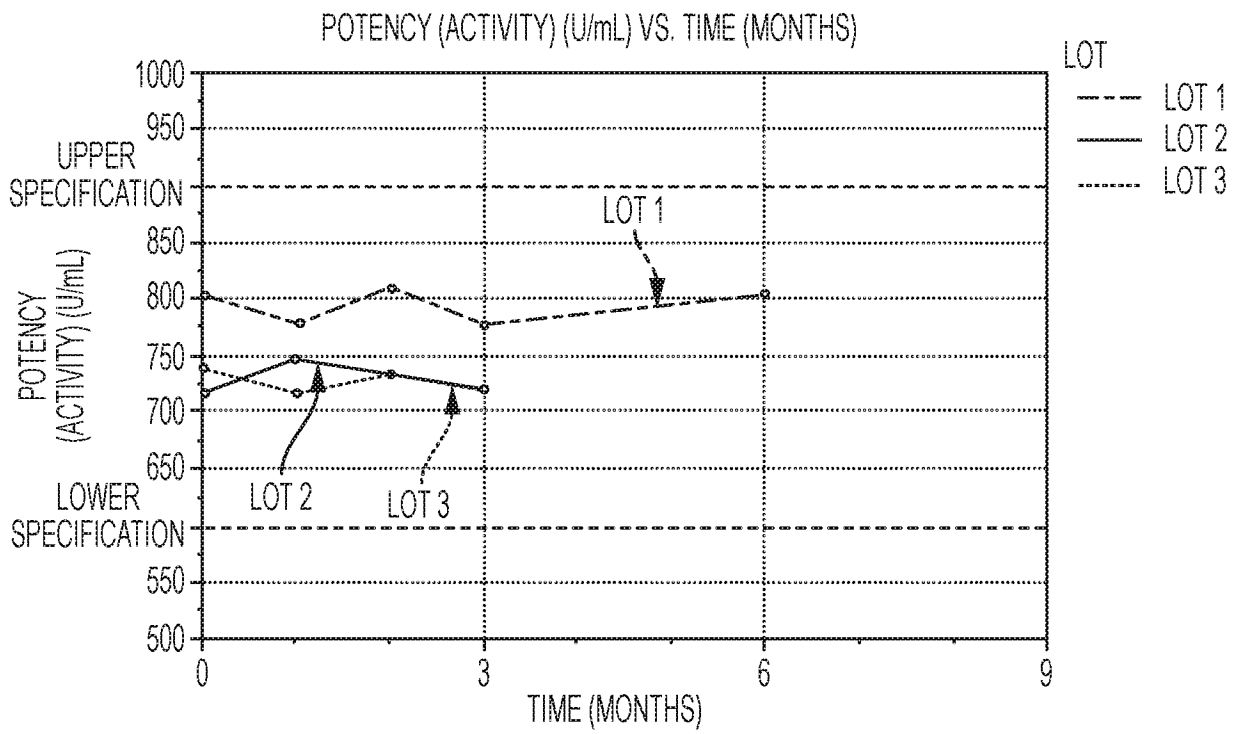


FIG. 12

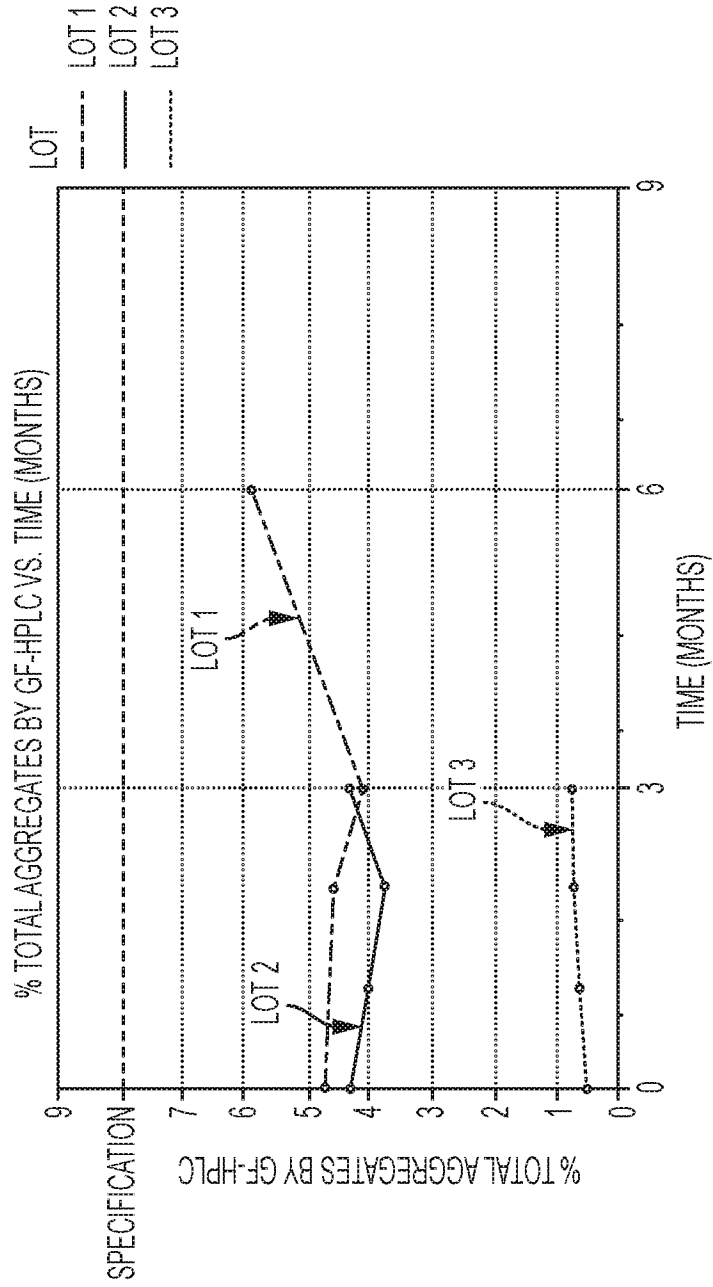


FIG. 13

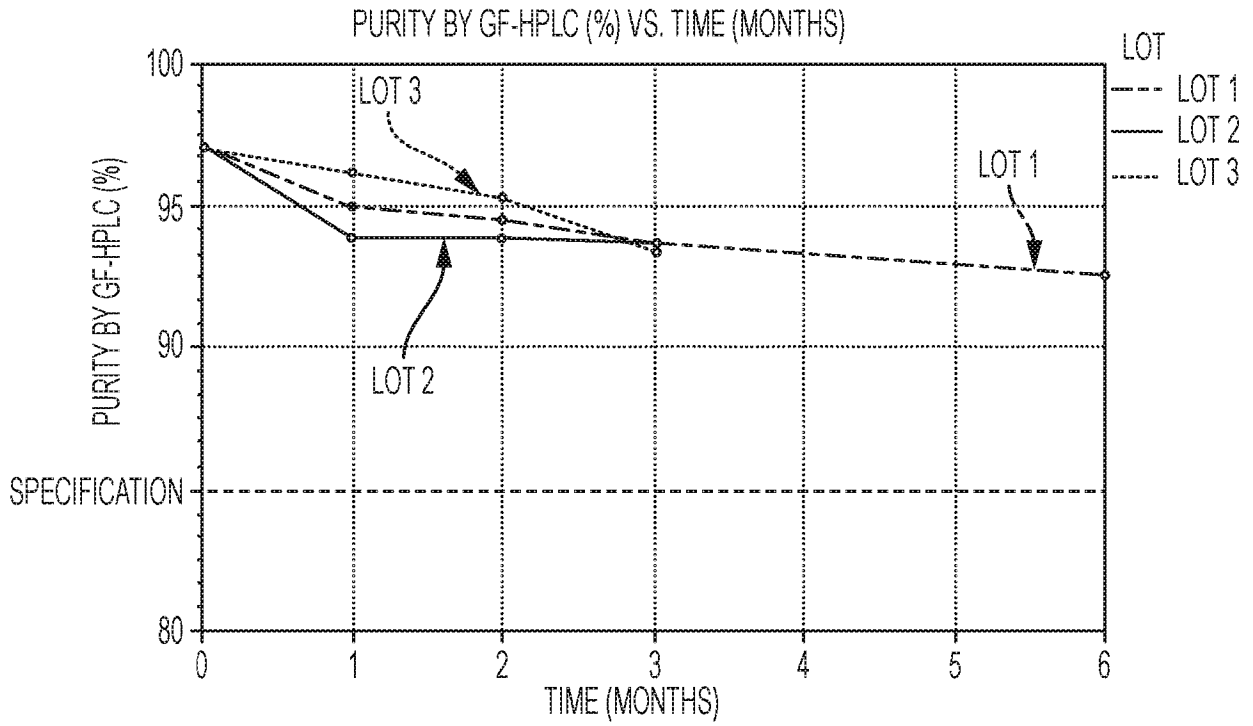


FIG. 14

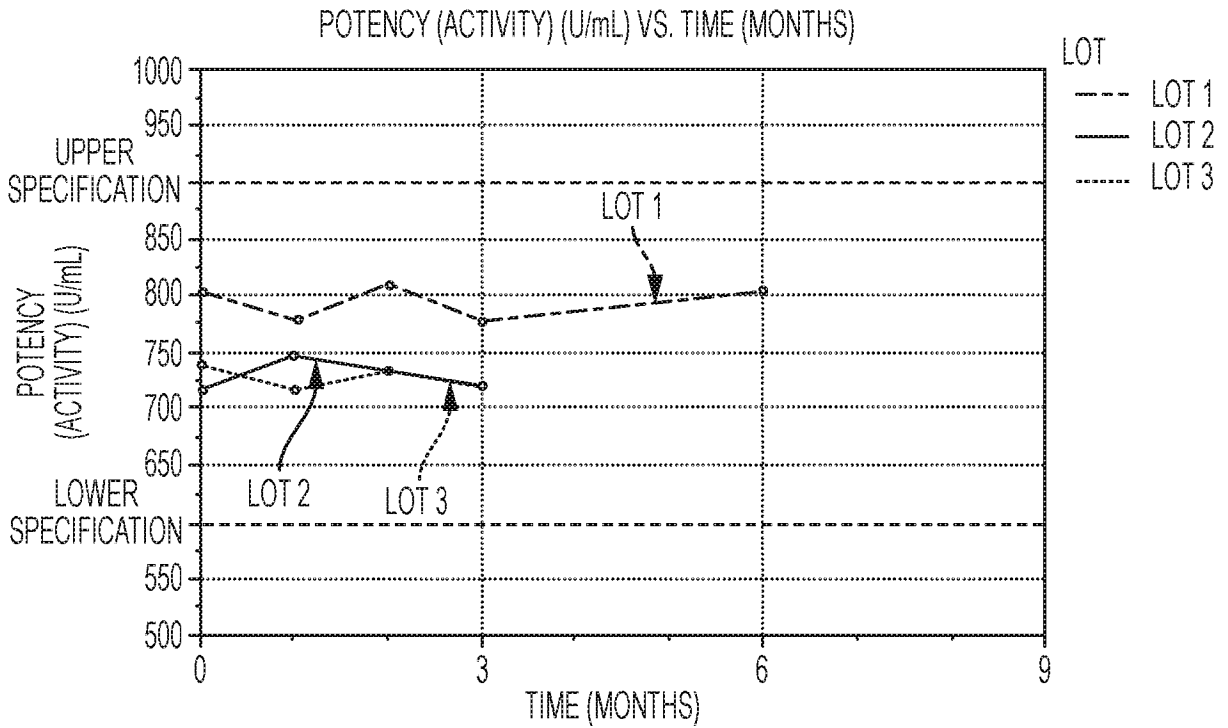


FIG. 15

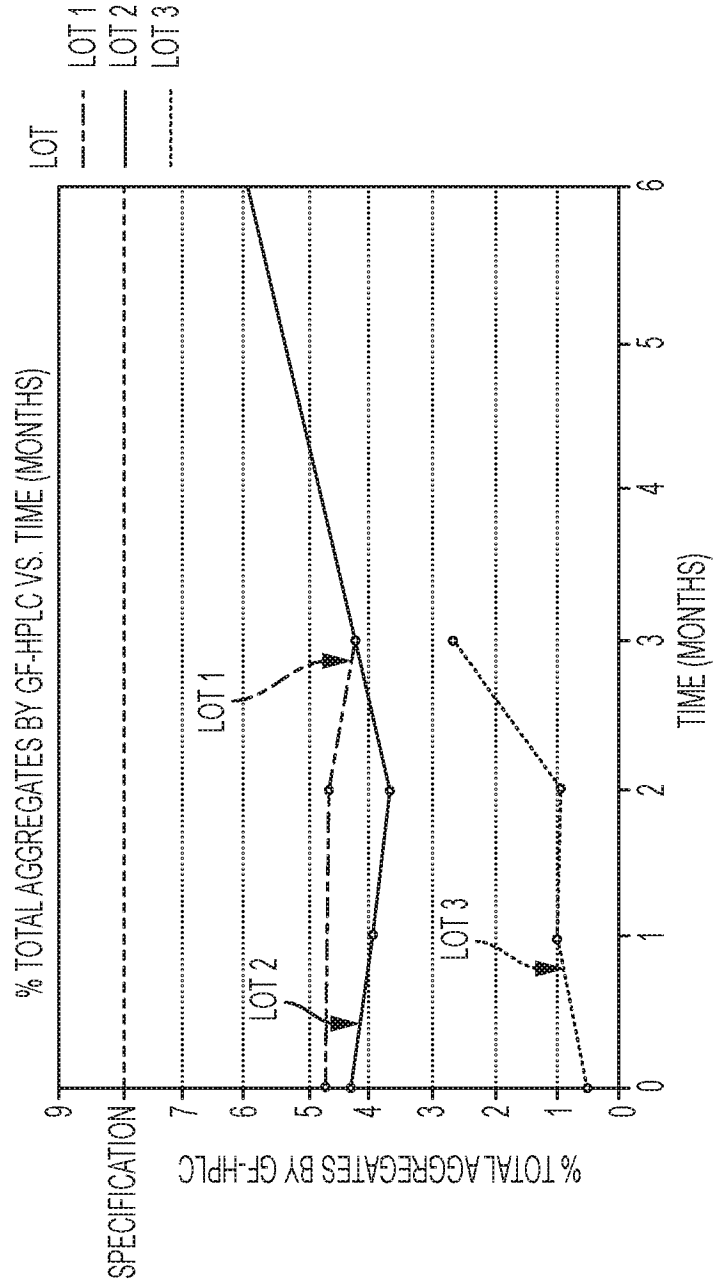


FIG. 16