



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO  
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

<b>DOMANDA NUMERO</b>	<b>101981900000120</b>
<b>Data Deposito</b>	<b>21/01/1981</b>
<b>Data Pubblicazione</b>	<b>21/07/1982</b>

<b>Priorità</b>	114.809
<b>Nazione Priorità</b>	US
<b>Data Deposito Priorità</b>	24-JAN-80
<b>Priorità</b>	194.350
<b>Nazione Priorità</b>	US
<b>Data Deposito Priorità</b>	17-OCT-80

**Titolo**

PERFEZIONAMENTO NELLE COMPOSIZIONI ANTITUMORALI E RELATIVO PROCEDIMENTO  
DI PRODUZIONE .

Sy-16428

47604A/81

DESCRIZIONE

a corredo di una domanda di brevetto per invenzione

dal titolo:

"Perfezionamento nelle composizioni antitumorali e  
relativo procedimento di produzione"

a nome della: BRISTOL-MYERS COMPANY



RIASSUNTO

L'invenzione riguarda un sale monogluconato cristallino dell'agente antitumorale 4'-(9-acridinilamino)-metansolfon-m-anisidide e composizioni comprendenti miscugli di detto sale con un acido organico scelto tra acido gluconico, gluconolattone o loro miscugli. Il sale nuovo e le composizioni nuove sono caratterizzati dal fatto di avere una solubilità in acqua inaspettatamente alta.

TESTO

Il nuovo sale di addizione acida e le nuove composizioni della presente invenzione possiedono le proprietà antitumorali vantaggiose del noto composto a base libera, e inoltre hanno una solubilità in acqua inaspettatamente alta, consentendo in tal modo la preparazione di utili forme di dosaggio per somministrazione endovenosa.

Il derivato acridinico di m-AMSA  $\angle$  4'-(9-acridinil-

ammino)-metansolfon-m-anisidide è stato indicato da Cain e altri in Europ.J. Cancer 10: 539-549 (1974) come avente significativa attività antitumorale nei sistemi di tumori di animali. Da allora questo composto è stato sottoposto a valutazione clinica con risultati iniziali molto promettenti.

Quando un agente antitumorale come il m-AMSA viene impiegato per l'uso clinico umano, si riconosce che la solubilità dell'agente è spesso il fattore determinante per stabilire la via di somministrazione e le forme di dosaggio. Per esempio, una sostanza idrosolubile può generalmente essere somministrata per via endovenosa mentre un materiale insolubile in acqua è limitato ad altre forme di somministrazione parenterale come quella intramuscolare e quella sottocutanea. Un agente terapeutico avente solubilità in acqua facilita inoltre la preparazione di forme di dosaggio orali e parenterali endovenose per la somministrazione nell'uomo. Di conseguenza è decisamente vantaggioso che un agente terapeutico sia idrosolubile, particolarmente quando si tenga conto del fatto che la via più diretta per ottenere livelli terapeutici nel sangue per un farmaco nel corpo umano è quella mediante somministrazione endovenosa.

La forma di base libera del m-AMSA ha una solubi-

lità in acqua molto limitata e di conseguenza non può essere adoperata come forma di dosaggio per somministrazione endovenosa. Sono stati fatti tentativi per preparare sali di addizione acidaa in grado di risolvere questo problema di solubilità, ma i sali monocloridrato e monometan-solfonato di cui è stata data notizia hanno dimostrato anch'essi di essere insufficientemente idrosolubili per l'uso clinico. La formulazione attualmente in uso clinico consta di due liquidi sterili combinati subito prima dell'uso. Una soluzione di m-AMSA in N,N-dimetil-acetammide anidra è contenuta in una fiala. Una fiala separata contiene una soluzione acquosa di acido lattico da adoperare come diluente. Dopo mescolazione la soluzione risultante di m-AMSA viene somministrata mediante infusione per endovena.

Mentre la presente formulazione clinica fornisce una forma di dosaggio endovenosa, presenta vari inconvenienti. Oltre alle difficoltà evidenti di preparazione e somministrazione della forma di dosaggio; contiene dimetil-acetammide come veicolo. La dimetil-acetammide sembra presentare vari sintomi tossici in animali e può di conseguenza risultare inaccettabile o indesiderabile come veicolo farmaceutico.

Di conseguenza uno scopo della presente invenzione



ne è di fornire forme idrosolubili stabili, terapeuticamente accettabili, di m-AMSA che possano essere somministrate per endovena (oltre che per altre vie) e che non contengano o richiedano dimetilacetammide come veicolo farmaceutico. Questo obiettivo nonché altre caratteristiche e vantaggi dell'invenzione saranno facilmente evidenti agli esperti nel ramo dalla descrizione che segue.

Sotto un aspetto, la presente invenzione fornisce un nuovo sale di addizione acida idrosolubile di m-AMSA che, in seguito a ricostituzione con acqua sterile o un veicolo acquoso sterile, può essere somministrato per endovena e non ha gli inconvenienti relativi alle note forme endovenose di questo agente.

Più particolarmente, viene fornito il sale monogluconato cristallino di m-AMSA.

Sotto un altro aspetto, l'invenzione fornisce una composizione idrosolubile stabile solida per ricostituzione con acqua o un veicolo acquoso come soluzione stabile di m-AMSA, detta composizione essendo costituita da un miscuglio di circa 1 mole di sale monogluconato di m-AMSA per 1-3 moli di un acido organico (o un suo precursore) scelto tra acido gluconico, glucolattone o loro miscugli.

Sono anche forniti procedimenti per preparare il

sale sopra descritto e la composizione suddetta.

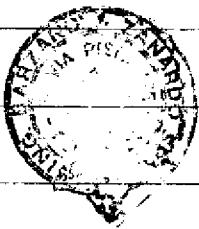
Nei disegni:

la figura 1 mostra lo spettro di assorbimento nell'infrarosso del sale gluconato cristallino quando sia convertito in pallottole in bromuro potassico;

la figura 2 mostra lo spettro di assorbimento nell'infrarosso di una composizione idrosolubile tipica quando sia convertita in pallottole in bromuro potassico.

Molti sali di addizione acida convenzionali, farmaceuticamente accettabili, di m-AMSA sono solo poco solubili in acqua e di conseguenza inadatti alla somministrazione endovenosa in pazienti umani. Questo risulta evidentemente da riferimenti della letteratura ai sali cloridrato e metansolfonato oltreché da prove di solubilità eseguite dai presenti inventori su sali come il levulinato, il citrato e il lattobionato.

Nell'esaminare le proprietà di solubilità dei sali di addizione acida di m-AMSA, è stato trovato inaspettatamente che un particolare sale cristallino di m-AMSA possiede una solubilità in acqua significativamente elevate a temperatura ambiente per fornire una forma di dosaggio endovenosa accettabile. Di conseguenza il nuovo sale monogluconato di m-AMSA fornito dalla pre-



sente invenzione ha una solubilità in acqua a temperatura ambiente di circa 25 mg/ml. Questo sale gluconato risulta avere inoltre una stabilità accettabile, sia come solido cristallino che come soluzione acquosa dopo ricostituzione.

La preparazione del sale gluconato cristallino di m-AMSA viene effettuata dalle seguenti fasi:

(1) formazione di una soluzione di m-AMSA e di un acido organico (o un suo precursore) scelto dal gruppo consistente in acido gluconico (acido D-gluconico), gluconolattone ( $\delta$ -lattone di acido D-gluconico) e loro miscugli in un solvente organico polare acquoso inerte, il rapporto molare tra acido organico e m-AMSA essendo compreso tra circa 1:1 e circa 2:1; e

(2) cristallizzazione del sale gluconato desiderato dalla soluzione così ottenuta.

Il particolare solvente organico polare inerte adoperato per solubilizzare la base di m-AMSA non è critico, ed esempi di solventi adatti saranno facilmente evidenti agli esperti nel ramo. Solventi preferiti sono alcoli e chetoni polari come metanolo, etanolo, n-propanolo, isopropanolo, acetone, n-butanolo, 2-butanone, n-pantanolo, n-esanolo, glicol dietilenico, metil-isobutil-chetone, 3-pantanone, ecc.

Un solvente particolarmente comodo è l'etanolo. Il

sistema solvente deve contenere una piccola percentuale d'acqua (per esempio circa 0,5%) che può essere aggiunta al solvente organico o di preferenza fornita sotto forma di acido gluconico acquoso o di una soluzione di gluconolattone.

Il termine "acido organico" come qui adoperato e nelle rivendicazioni si riferisce all'acido gluconico come tale o ad un suo precursore che si idrolizza in soluzione acquosa per formare acido gluconico, per esempio gluconolattone. L'acido gluconico è difficile da produrre in una forma cristallina ben definita, per cui viene fornito acido gluconico commerciale come soluzione acquosa al 50%. Il gluconolattone, d'altra parte, è un materiale cristallino ben definito che può essere facilmente idrolizzato in soluzione acquosa per dare acido gluconico. Data la disponibilità del gluconolattone cristallino, è preferibile adoperare gluconolattone come sorgente di acido gluconico nella preparazione del sale gluconato. Il gluconolattone può essere aggiunto ad una soluzione acquosa del solvente organico polare per generare l'acido gluconico, oppure può essere aggiunto al solvente organico sotto forma di una soluzione aquosa.

La temperatura alla quale si effettua la dissoluzione non è critica e può andare dal punto di conge-

lamento al punto di ebollizione del sistema solvente.

Più vantaggiosamente si adoperano temperature intorno a quella ambiente o al disopra. E' stato trovato che la solubilità è massimizzata se il miscuglio viene portato alla temperatura di riflusso.

L'acido gluconico o il gluconolattone può essere impiegato in rapporti molari di circa 1 a 2 moli per mole di base di m-AMSA. Un prodotto della miglior qualità è risultato tuttavia dall'impiego di quantità equimolari del m-AMSA e dell'acido organico.

Dopo aver formato una soluzione di m-AMSA e di acido, è preferibile effettuare una fase di filtrazione prima di lasciare che la cristallizzazione proceda. Si possono adoperare allora tecniche normalizzate di cristallizzazione per ottenere il desiderato sale gluconato. Cristalli germe del sale gluconato possono essere aggiunti al miscuglio di reazione per suscitare e/o potenziare la cristallizzazione. Dopo recupero il sale cristallino viene lavato (per esempio con etanolo) ed essiccato mediante procedure convenzionali. La ricristallizzazione (per esempio da etanolo) può essere utilizzata per ottenere il prodotto in una forma altamente purificata.

Sotto un altro aspetto la presente invenzione fornisce una composizione idrosolubile solida stabi-

le, adatta in seguito a ricostituzione con acqua o altro veicolo acquoso come soluzione stabile di m-AMSA, detta composizione essendo costituita da un miscuglio di circa 1 mole di sale monogluconato di m-AMSA per 1-3 moli di un acido organico (o un suo precursore) scelto dal gruppo consistente in acido gluconico, glucolattone e i loro miscugli.

La composizione sopra descritta può essere impiegata sotto forma di un prodotto di riempimento a secco o liofilizzato, ma è preferibilmente un miscuglio liofilizzato. La composizione può essere comodamente e rapidamente ricostituita con acqua sterile o un veicolo acquoso sterile per fornire almeno una soluzione vera di 5 mg/ml di m-AMSA avente eccellente stabilità.

La preparazione della composizione idrosolubile può essere comodamente effettuata mediante una procedura tradizionale di liofilizzazione. Vale a dire che una soluzione acquosa di m-AMSA e un eccesso di acido gluconico o di una sorgente di acido gluconico (ossia un acido organico che si idrolizza in acqua per formare acido gluconico) viene formata, e la soluzione viene poi sottoposta ad un processo normalizzato di liofilizzazione per ottenere la composizione solida desiderata.

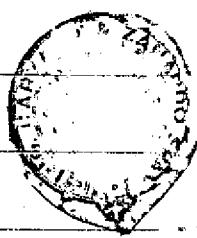
L'acido gluconico (o il suo equivalente) viene adoperato in un rapporto molare di circa 2-4 moli (più preferibilmente circa 2,5 moli) per mole di base m-AMSA. Poichè, come notato sopra, l'acido gluconico commerciale non è disponibile in una forma cristallina ben definita, si preferisce adoperare gluconolattone cristallino come acido organico. Il gluconolattone si idrolizza rapidamente in acqua per formare acido gluconico. Durante la liofilizzazione l'acido gluconico è almeno parzialmente convertito in gluconolattone. Il prodotto liofilizzato è quindi costituito da un miscuglio del sale monogluconato di m-AMSA con circa 1-3 moli di eccesso di acido gluconico, l'acido essendo parzialmente sotto la forma di acido gluconico e parzialmente sotto la forma di gluconolattone.

Dopo aver formato la soluzione acquosa di m-AMSA e acido, il miscuglio di reazione viene preferibilmente filtrato prima della liofilizzazione. La liofilizzazione può essere effettuata in liofilizzatori convenzionali da laboratorio o industriali. I parametri di liofilizzazione preferiti sono i seguenti:

precongelamento a  $-55^{\circ}\text{C}$ ;

congelamento a  $-50^{\circ}\text{C}$  per 2 ore;

sublimazione a  $-40^{\circ}\text{C}$  per circa 6-8 ore ad una pressione di  $4 \times 10^{-2}$  Torr;



essiccameto: a +30°C per circa 48 ore.

Il sale gluconato cristallino e la composizione idrosolubile forniti dalla presente invenzione manifestano sostanzialmente le stesse proprietà antitumorali delle forme di m-AMSA della tecnica antecedente. Grazie alla loro elevata idrosolubilità, tuttavia, possono essere utilizzati per preparare forme per dosaggio destinate alla somministrazione endovenosa che non contengono un veicolo farmaceutico indesiderabile come ad esempio dimetilacetammide. Il sale e la composizione possono tuttavia essere adoperati per preparare un prodotto di riempimento a secco a fiala singola o un prodotto liofilizzato per ricostituzione con acqua sterile o un veicolo acquoso-sterile. Un veicolo preferito per la ricostituzione del sale gluconato è acido gluconico acquoso.

Il sale di m-AMSA e la composizione della presente invenzione possono essere adoperati per preparare forme di dosaggio parenterale per via orale o per via non endovenosa, oltre al prodotto preferito iniettabile per endovena. Il sale e la composizione hanno stabilità accettabile, sia in forma solida che in soluzione acquosa, e hanno sufficiente solubilità in acqua per consentire la somministrazione di una dose efficace di m-AMSA in un volume relativamente piccolo di

di soluzione parenterale (permettendo così le iniezioni per endovena del bolo).

Nel trattamento di tumori della mammella, il sale e la composizione della presente invenzione possono essere somministrati sia per via orale sia per via parenterale, ma preferibilmente per via parenterale, in dosaggi (aggiustati per la quantità di base di m-AMSA) e secondo regimi precedentemente descritti nella letteratura.

I seguenti esempi sono forniti come illustrazione della presente invenzione, senza tuttavia limitarla.

Esempio 1

Preparazione del sale monogluconato di m-AMSA

Si scioglie delta-gluconolattone (0,89 g., 0,005 moli) in 0,5 ml d'acqua. Si aggiungono base di m-AMSA (1,95 g., 0,005 moli) e 100 ml di etanolo, e poi si distilla a ricadere il miscuglio per un breve periodo di tempo, ossia circa 5-10 minuti. La soluzione risultante viene lasciata a riposo per una nottata, in seguito a che si separa materiale cristallino nella soluzione. Il prodotto viene ricristallizzato da 100 ml di etanolo per dare 1,10 g. di sale monogluconato di m-AMSA cristallino.

Proprietà del sale gluconato:

Contenuto di m-AMSA mediante l'ultravioletto = 62,6%

(contenuto teorico 66,6%);

contenuto di acido gluconico all'ultravioletto =

36,9%;

contenuto di gluconolattone all'ultravioletto = 1,1%.

Solubilità in acqua: 30 mg/ml a 50-60°C; 25 mg/ml a temperatura ambiente.

Quando si scioglie in acqua ad una concentrazione di 7,1 microgrammi/ml, il sale gluconato manifesta picchi di assorbimento dell'ultravioletto a 208 nm (O.D. = 0,527), 247,5 nm (O.D. = 0,567), 263 nm (O.D. = 0,425) e 412 nm (O.D. = 0,121).

La fig. 1 mostra lo spettro di assorbimento nell'infrarosso del sale gluconato quando sia convertito in palline in bromuro potassico.

#### Esempio 2

##### Preparazione di una composizione idrosolubile di m-AMSA

(per la preparazione di fiale da 75 mg ad attività di m-AMSA)

<u>Formula</u>	<u>Per fiala</u>	<u>Per partita di 1 litro</u>
----------------	------------------	-------------------------------

Base di m-AMSA	75 mg	5 g
----------------	-------	-----

Gluconolattone (delta-lattone di acido gluconico)	93,46 mg	6,23 g
---	----------	--------

Acqua per iniezione	quanto basta per portare a 15 ml	quanto basta per portare ad 1 litro
---------------------	----------------------------------	-------------------------------------

Istruzioni per la preparazione (per partita da 1 litro)

(1) Preparazione di una soluzione al 10% di glucono-

lattone:

- pesare 10 g di gluconolattone,
- agitando aggiungere il lattone ad un contenitore di vetro contenente 80 ml d'acqua per iniezione.

Mantenere l'agitazione fino ad ottenere la completa dissoluzione.

- Quanto basta fino a 100 ml con acqua per iniezione.

- Agitare per 5 minuti.

Questa soluzione dev'essere utilizzata dopo 24 ore di riposo a temperatura ambiente.

2) Pesare 5 g di base di m-AMSA

3) In un recipiente di vetro appropriato contenente 600 ml d'acqua per iniezione, aggiungere agitando 25 ml della soluzione di gluconolattone al 10%.

4) Agitando energicamente introdurre lentamente i 5 g di base di m-AMSA nel recipiente di vetro. Mantenere l'agitazione per 30 minuti.

5) Agitando introdurre 20 ml della soluzione di gluconolattone al 10% al miscuglio di reazione. Agitare per 30 minuti.

6) Aggiungere lentamente il resto della soluzione di gluconolattone al 10% (17,3 ml) al miscuglio di rea-

zione. Mantenere l'agitazione fino a ottenere la completa dissoluzione.

7) Quanto basta per portare ad 1 litro con acqua per iniezione.

8) Adoperando pressione d'azoto, far passare la soluzione attraverso un filtro da 0,22  $\mu$ .

9) Introdurre la soluzione in fiale di vetro flint da 30-38 ml (15 ml di soluzione per fiala). Inserire parzialmente tappi rossi di liofilizzazione di gomma butilica.

10) Sottoporre le fiale ad essiccamento per congelamento secondo i seguenti parametri:

precongelamento a  $-55^{\circ}\text{C}$ ,

congelamento a  $-50^{\circ}\text{C}$  per 2 ore,

sublimazione a  $-40^{\circ}\text{C}$  per circa 6-8 ore ad una pressione di circa  $4 \times 10^{-2}$  Torr.

essiccamento a  $+30^{\circ}\text{C}$  per circa 48 ore.

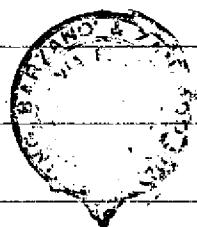
11) Turare le fiale sotto vuoto o sotto atmosfera di azoto e sigillare.

12) Per ricostituire, adoperare 20 ml d'acqua per iniezione per ciascuna fiala.

Proprietà della composizione liofilizzata:

Tempo di ricostituzione con 10 ml d'acqua = 4-5 minuti.

pH della soluzione: 3,65



Analisi del prodotto liofilizzato:

di 0,172 g di composizione totale, circa 72 mg di m-AMSA, circa 93 mg di acido gluconico totale (potenziometria) di cui circa 40 mg sono  $\beta$ -gluconolattone (gas-cromatografia). Le impurezze sono al disotto dei limiti di rilevamento. Percentuale di  $H_2O$  (K.F.) = 0,8.

La stabilità acquosa del prodotto ricostituito è soddisfacente dopo 24 ore. La perdita di potenza è appena percepibile e non si osserva alcuna impurezza.

Quando si sciolga in acqua ad una concentrazione di 12,17  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , la composizione liofilizzata manifesta picchi di assorbimento nell'ultravioletto a 209 nm (O.D. = 0,607), 247,5 nm (O.D. = 0,607), 266 nm (O.D. = 0,534), 413 nm (O.D. = 0,145) e 435 nm (O.D. = 0,143).

La Fig. 2 mostra lo spettro di assorbimento nell'infrarosso della composizione liofilizzata quando sia convertita in palline in bromuro potassico.

RIVENDICAZIONI

1. Sale gluconato cristallino di m-AMSA.
2. Composizione idrosolubile solida stabile da ricostituire con acqua o un veicolo acquoso come soluzione stabile di m-AMSA, detta composizione essendo costituita da un miscuglio di circa 1 mole di sale gluconato di m-AMSA per 1-3 moli di un acido organico.

scelto dal gruppo consistente in acido gluconico, gluconolattone e loro miscugli.

3. Composizione secondo la rivendicazione 1, avendo circa 1 mole di sale gluconato di m-AMSA per 1,5 moli di acido organico.

4. Composizione idrosolubile solida stabile da ricostituire con acqua o un veicolo acquoso come soluzione stabile di m-AMSA, detta composizione essendo ottenuta mediante le fasi di:

(1) formazione di una soluzione acquosa di m-AMSA e di un acido organico scelto dal gruppo consistente in acido gluconico, gluconolattone e loro miscugli, il rapporto molare tra l'acido organico e il m-AMSA andando da circa 2:1 a circa 4:1, e

(2) liofilizzazione della soluzione acquosa così prodotta.

5. Composizione secondo la rivendicazione 4, in cui si adoperano circa 2,5 moli di acido organico per mole di m-AMSA.

6. Composizione secondo le rivendicazioni 4 o 5, in cui l'acido organico adoperato è gluconolattone.

7. Composizione secondo la rivendicazione 4, in cui la soluzione acquosa della fase (1) viene formata facendo reagire circa 5 g di m-AMSA e 6,23 g di gluco-



nolattone per litro di soluzione.

8. Procedimento per la produzione del sale gluconato cristallino di m-AMSA, che comprende le fasi di:

(1) formazione di una soluzione di m-AMSA e di un acido organico scelto dal gruppo consistente in acido gluconico, gluconolattone e loro miscugli in un solvente organico polare acquoso inerte, il rapporto molare tra acido organico e m-AMSA andando da circa 1:1 a circa 2:1, e

(2) cristallizzazione del sale gluconato desiderato dalla soluzione così ottenuta.

9. Procedimento secondo la rivendicazione 8, in cui l'acido organico adoperato è gluconolattone.

10. Procedimento secondo la rivendicazione 8, in cui l'acido organico adoperato è acido gluconico.

11. Procedimento secondo la rivendicazione 8, in cui si adopera circa 1 mole di acido organico per mole di m-AMSA.

12. Procedimento secondo la rivendicazione 8, in cui il solvente organico è etanolo.

13. Procedimento secondo la rivendicazione 8, in cui la fase (1) viene effettuata alla temperatura di riflusso.

14. Procedimento secondo la rivendicazione 8, in cui la soluzione formata nella fase (1) viene filtrata prima della cristallizzazione.

15. Procedimento per la produzione di una composizione idrosolubile solida stabile da ricostituire con acqua o un veicolo acquoso come soluzione stabile di m-AMSA, che comprende le fasi di:

(1) formazione di una soluzione acquosa di m-AMSA e di un acido organico scelto dal gruppo consistente in acido gluconico, gluconolattone e loro miscugli, il rapporto molare tra l'acido organico e il m-AMSA andando da circa 2:1 a circa 4:1, e

(2) liofilizzazione della soluzione acquosa così prodotta.

16. Procedimento secondo la rivendicazione 15, in cui l'acido organico è gluconolattone.

17. Procedimento secondo la rivendicazione 15, in cui il rapporto molare tra acido organico e m-AMSA è circa 2,5:1.

18. Procedimento secondo la rivendicazione 15, in cui la soluzione acquosa della fase (1) viene filtrata prima della liofilizzazione.

Roma, 21 GEN. 1981

p.: BRISTOL-MYERS COMPANY

p.: ING. BARZANO' & ZANARDO S.p.A.

*Ufficio*

TG  
6726

No. di serie: 194350

Data di deposito: 17 OTTOBRE 1980

Classe: 260

Sottoclasse: -

No. di gruppo: 121

Richiedenti: DANIEL BOUZARD, FRANCONVILLE, FRANCE;

CLAUDE PEROL, PARIS, FRANCE; JACQUES STEMER, PARIS,

FRANCE; ABRAHAM WEBER, PARIS, FRANCE; EDMUND S.

GRANATEK, SYRACUSE, NY

DATI DI CONTINUAZIONE.....

VERIFICATO (questa domanda è una continuazione della  
06/114.809 01/24/80

DOMANDE DEL PCT/ESTERE.....

VERIFICATO

Come depositata: Stato o paese FRX; Tavole di dise-  
gni 2; Riv. totali 18; Riv. indipendenti 5; Tassa di  
deposito ricevuta \$ 123; No. di pratica del rappre-  
sentante -

Indirizzare la corrispondenza a:

DAVID M. MORSE

BRISTOL LABS.

DIVISION OF BRISTOL-MYERS CO.

P.O. BOX 657

SYRACUSE, NY 13201

Titolo dell'invenzione: "Composizioni anti-tumorali"

Si certifica con la presente che l'alle-  
gato costituisce copia fedele ed esatta tratta dai  
Registri dell'Ufficio Brevetti degli Stati Uniti del-  
la domanda originariamente depositata come sopra i-  
dentificata.

Per autorizzazione del  
COMMISSARIO DEI BREVETTI  
F.to: Illeggibile  
Ufficiale Certificante  
data 22 GENNAIO 1981

(SIGILLO)

Nell'Ufficio Brevetti e Marchi Statunitense  
17 Ottobre 1980

194350

Classificazione anticipata della  
presente domanda classe:

Domanda precedente:

Esaminatore Alan L. Rotman

Unità tecnica 121

Onorevole COMMISSARIO BREVETTI E MARCHI  
Washington, D.C. 20231

Signore:

La presente è una richiesta di deposito  
di una domanda di continuazione sotto il codice 37 CFR 1.60,  
della domanda No. 114.809 in corso precedente deposi-  
tata in data 24 Gennaio 1980 di Daniel Bouzard per  
"Composizioni anti-tumorali"

1. Inclusa è una copia della domanda precedente con inclusione del giuramento o dichiarazione come originariamente depositati.

2. Preparare una copia della domanda precedente.

3. La tassa di deposito è calcolata più sotto:

Le rivendicazioni come depositate nella domanda precedente, meno alcune rivendicazioni cancellate secondo gli emendamenti più sotto stabiliti.

Per le rivendicazioni totali:

No. depositato 18-10 = No. di riv. in più: 8; Tariffa \$2= 16;  
tariffa di base è \$65

Riv. indipendenti 5-1; 4; \$10 = 40

Tassa di deposito totali: \$121

Il Commissario è pertanto autorizzato ad addebitare ogni tassa che possa essere richiesta, o un qualunque pagamento superiore in credito sul conto No. 02-3825. Viene allegata una copia duplicata di questo foglio.

5. E' allegato un assegno per l'ammontare di

\$

6. Cancellare in questa domanda originale  
le rivendicazioni della domanda  
precedente del calcolo della data di deposito

7. Emendare la descrizione inserendo prima  
della prima riga la frase:

la presente è una continuazione di una doman-  
da No. di serie 114.809 depositata in data 24 Gen-  
naio 1980

8. Trasferire i disegni dalla precedente  
a  
domanda/questa domanda ed abbandonare detta domanda  
precedente secondo la data di deposito in accordo  
con la presente domanda. Un duplicato di questo fo-  
glio è allegato per il deposito nella domanda prece-  
dente di deposito.

8a; Sono acclusi nuovi disegni formali  
8b. Priorità della domanda No. di serie  
depositata in data in  
e rivendicata secondo il codice 35 U.S.C.  
119.

La copia certificata è stata depositata  
nella precedente domanda No. di serie  
depositata il .

9. La precedente domanda è registrata con  
un numero per la Bristol -Myers Company

10. La procura nella domanda precedente è  
No. di registrazione 18.177, David M. Morse No. di reg. 25.742 e  
di Herbert W. Taylor, Jr., Richard R. Lloyd, No. di reg. 22.632,  
della Bristol Laboratories, Division of Bristol-Myers  
Company, P.O. Box 657, Syracuse, NY 13201

a. La procura appare nei documenti originali e nella domanda precedente

b. purchè la procura non appare nei documenti originali, è acclusa una copia della procura nella domanda precedente.

c. indirizzare tutte le future comunicazioni agli agenti di registrazione

11. Viene racchiusa una correzione preliminare.

12. Pertanto io qui attesto che veramente i documenti allegati sono copie vere della domanda precedente No. di serie 114.809 come depositata originariamente in data 24 Gennaio 1980

13. Viene accluso un documento dal titolo "Citazione del ramo precedente da parte dei richiedenti secondo MPEP 707.05(b)" con i suoi stessi allegati.

Il sottoscritto dichiara inoltre che tutte le affermazioni qui fatte di sua propria conoscenza sono vere e che tutte le affermazioni fatte su informazione e credito sono ritenute essere vere; ed inoltre che queste osservazioni sono state fatte con la conoscenza che attestazioni volutamente false e simili sono punibili con ammenda o prigione od entrambi secondo la sezione 1001 del capoverso 18 del Codice

Statunitense e che tali attestazioni volutamente false  
possono danneggiare la validità della domanda o di un  
qualunque brevetto derivante dalla stessa.

10 Ottobre 1980

Firmato: David M. Morse

Registrazione No. 25.742

17 OTTOBRE 1980

194350

RIASSUNTO: L'invenzione riguarda un sale monogluconato  
cristallino dell'agente antitumorale 4'-(9-acridinilam-  
mino)-metansolfon-m-anisidide e composizioni compren-  
denti miscugli di detto sale con un acido organico  
scelto tra acido gluconico, gluconolattone e loro mi-  
scugli. Il sale nuovo e le composizioni nuove sono  
caratterizzati dal fatto di avere una solubilità in  
acqua inaspettatamente alta.

Il nuovo sale di addizione acida e le nuove com-  
posizioni della presente invenzione possiedono le pro-  
prietà antitumorali vantaggiose del noto composto a  
base libera, e inoltre hanno una solubilità in acqua  
inaspettatamente alta, consentendo in tal modo la pre-  
parazione di utili forme cliniche di dosaggio per som-  
ministrazione endovenosa.

Il derivato acridinico di m-AMSA / 4'-(9-acridinil-

ammino)-metansolfon-m-anisidide è stato indicato da Cain e altri in Europ.J. Cancer 10: 539-549 (1974) come avente significativa attività antitumorale nei sistemi di tumori di animali. Da allora questo composto è stato sottoposto a valutazione clinica con risultati iniziali molto promettenti.

Quando un agente antitumorale come il m-AMSA viene impiegato per l'uso clinico umano, si riconosce che la solubilità dell'agente è spesso il fattore determinante per stabilire la via di somministrazione e le forme di dosaggio. Per esempio, una sostanza idrosolubile può generalmente essere somministrata per via endovenosa mentre un materiale insolubile in acqua è limitato ad altre forme di somministrazione parenterale come quella intramuscolare e quella sottocutanea. Un agente terapeutico avente solubilità in acqua facilita inoltre la preparazione di forme di dosaggio orali e parenterali endovenose per la somministrazione nell'uomo. Di conseguenza è decisamente vantaggioso che un agente terapeutico sia idrosolubile, particolarmente quando si tenga conto del fatto che la via più diretta per ottenere livelli terapeutici nel sangue per un farmaco nel corpo umano è quella mediante somministrazione endovenosa.

La forma di base libera del m-AMSA ha una solubi-

lità in acqua molto limitata e di conseguenza non può essere adoperata come forma di dosaggio per somministrazione endovenosa. Sono stati fatti tentativi per preparare sali di addizione acidaa in grado di risolvere questo problema di solubilità, ma i sali monocloridrato e monometan-solfonato di cui è stata data notizia hanno dimostrato anch'essi di essere insufficientemente idrosolubili per l'uso clinico. La formulazione attualmente in uso clinico consiste di due liquidi sterili combinati subito prima dell'uso. Una soluzione di m-AMSA in N,N-dimetil-acetammide anidra è contenuta in una fiala. Una fiala separata contiene una soluzione acquosa di acido lattico da adoperare come diluente. Dopo mescolazione la soluzione risultante di m-AMSA viene somministrata mediante infusione per endovena.

Mentre la presente formulazione clinica fornisce una forma di dosaggio endovenosa, presenta vari inconvenienti. Oltre alle difficoltà evidenti di preparazione e somministrazione della forma di dosaggio, contiene dimetil-acetammide come veicolo. La dimetil-acetammide sembra presentare vari sintomi tossici in animali e può di conseguenza risultare inaccettabile o indesiderabile come veicolo farmaceutico.

Di conseguenza uno scopo della presente invenzione

ne è di fornire forme idrosolubili stabili, terapeuticamente accettabili, di m-AMSA che possano essere somministrate per endovenosa (oltre che per altre vie) e che non contengano o richiedano dimetilacetammide come veicolo farmaceutico. Questo obiettivo nonché altre caratteristiche e vantaggi dell'invenzione saranno facilmente evidenti agli esperti nel ramo dalla descrizione che segue.

Sotto un aspetto, la presente invenzione fornisce un nuovo sale di addizione acida idrosolubile di m-AMSA che, in seguito a ricostituzione con acqua sterile o un veicolo acquoso sterile, può essere somministrato per endovenosa e non ha gli inconvenienti relativi alle note forme endovenose di questo agente.

Più particolarmente, viene fornito il sale monogluconato cristallino di m-AMSA.

Sotto un altro aspetto, l'invenzione fornisce una composizione idrosolubile stabile solida per ricostituzione con acqua o un veicolo acquoso come soluzione stabile di m-AMSA, detta composizione essendo costituita da un miscuglio di circa 1 mole di sale monogluconato di m-AMSA per 1-3 moli di un acido organico (o un suo precursore) scelto tra acido gluconico, glucolattone o loro miscugli.

Sono anche forniti procedimenti per preparare il

sale sopra descritto e la composizione suddetta.

Nei disegni:

la figura 1 mostra lo spettro di assorbimento nell'infrarosso del sale gluconato cristallino quando sia convertito in pallottole in bromuro potassico;

la figura 2 mostra lo spettro di assorbimento nell'infrarosso di una composizione idrosolubile tipica quando sia convertita in pallottole in bromuro potassico.

Molti sali di addizione acida convenzionali, farmaceuticamente accettabili, di m-AMSA sono solo poco solubili in acqua e di conseguenza inadatti alla somministrazione endovenosa in pazienti umani. Questo risulta evidentemente da riferimenti della letteratura ai sali cloridrato e metansolfonato oltreché da prove di solubilità eseguite dai presenti inventori su sali come il levulinato, il citrato e il lattobionato.

Nell'esaminare le proprietà di solubilità dei sali di addizione acida di m-AMSA, è stato trovato inaspettatamente che un particolare sale cristallino di m-AMSA possiede una solubilità in acqua significativamente elevate a temperatura ambiente per fornire una forma di dosaggio endovenosa accettabile. Di conseguenza il nuovo sale monogluconato di m-AMSA fornito dalla pre-

sente invenzione ha una solubilità in acqua a temperatura ambiente di circa 25 mg/ml. Questo sale gluconato risulta avere inoltre una stabilità accettabile, sia come solido cristallino che come soluzione acquosa dopo ricostituzione.

La preparazione del sale gluconato cristallino di m-AMSA viene effettuata dalle seguenti fasi:

(1) formazione di una soluzione di m-AMSA e di un acido organico (o un suo precursore) scelto dal gruppo consistente in acido gluconico (acido D-gluconico), gluconolattone ( $\beta$ -lattone di acido D-gluconico) e loro miscugli in un solvente organico polare acquoso inerte, il rapporto molare tra acido organico e m-AMSA essendo compreso tra circa 1:1 e circa 2:1; e

(2) cristallizzazione del sale gluconato desiderato dalla soluzione così ottenuta.

Il particolare solvente organico polare inerte adoperato per solubilizzare la base di m-AMSA non è critico, ed esempi di solventi adatti saranno facilmente evidenti agli esperti nel ramo. Solventi preferiti sono alcoli e chetoni polari come metanolo, etanolo, n-propanolo, isopropanolo, acetone, n-butanolo, 2-butanone, n-pantanolo, n-esanolo, glicol dietilenico, metil-isobutil-chetone, 3-pantanone, ecc.

Un solvente particolarmente comodo è l'etanolo. Il

sistema solvente deve contenere una piccola percentuale d'acqua (per esempio circa 0,5%) che può essere aggiunta al solvente organico o di preferenza fornita sotto forma di acido gluconico acquoso o di una soluzione di gluconolattone.

Il termine "acido organico" come qui adoperato e nelle rivendicazioni si riferisce all'acido gluconico come tale o ad un suo precursore che si idrolizza in soluzione acquosa per formare acido gluconico, per esempio gluconolattone. L'acido gluconico è difficile da produrre in una forma cristallina ben definita, per cui viene fornito acido gluconico commerciale come soluzione acquosa al 50%. Il gluconolattone, d'altra parte, è un materiale cristallino ben definito che può essere facilmente idrolizzato in soluzione acquosa per dare acido gluconico. Data la disponibilità del gluconolattone cristallino, è preferibile adoperare gluconolattone come sorgente di acido gluconico nella preparazione del sale gluconato. Il gluconolattone può essere aggiunto ad una soluzione acquosa del solvente organico polare per generare l'acido gluconico, oppure può essere aggiunto al solvente organico sotto forma di una soluzione acquosa.

La temperatura alla quale si effettua la dissoluzione non è critica e può andare dal punto di conge-

lamento al punto di ebollizione del sistema solvente.

Più vantaggiosamente si adoperano temperature intorno a quella ambiente o al disopra. E' stato trovato che la solubilità è massimizzata se il miscuglio viene portato alla temperatura di riflusso.

L'acido gluconico o il gluconolattone può essere impiegato in rapporti molari di circa 1 a 2 moli per mole di base di m-AMSA. Un prodotto della miglior qualità è risultato tuttavia dall'impiego di quantità equimolari del m-AMSA e dell'acido organico.

Dopo aver formato una soluzione di m-AMSA e di acido, è preferibile effettuare una fase di filtrazione prima di lasciare che la cristallizzazione proceda. Si possono adoperare allora tecniche normalizzate di cristallizzazione per ottenere il desiderato sale gluconato. Cristalli germe del sale gluconato possono essere aggiunti al miscuglio di reazione per suscitare e/o potenziare la cristallizzazione. Dopo recupero il sale cristallino viene lavato (per esempio con etanolo) ed essiccato mediante procedure convenzionali. La ricristallizzazione (per esempio da etanolo) può essere utilizzata per ottenere il prodotto in una forma altamente purificata.

Sotto un altro aspetto la presente invenzione fornisce una composizione idrosolubile solida stabi-

le, adatta in seguito a ricostituzione con acqua o altro veicolo acquoso come soluzione stabile di m-AMSA, detta composizione essendo costituita da un miscuglio di circa 1 mole di sale monogluconato di m-AMSA per 1-3 moli di un acido organico (o un suo precursore) scelto dal gruppo consistente in acido gluconico, glucolattone e i loro miscugli.

La composizione sopra descritta può essere impiegata sotto forma di un prodotto di riempimento a secco o liofilizzato, ma è preferibilmente un miscuglio liofilizzato. La composizione può essere comodamente e rapidamente ricostituita con acqua sterile o un veicolo acquoso sterile per fornire almeno una soluzione vera di 5 mg/ml di m-AMSA avente eccellente stabilità.

La preparazione della composizione idrosolubile può essere comodamente effettuata mediante una procedura tradizionale di liofilizzazione. Vale a dire che una soluzione aquosa di m-AMSA e un eccesso di acido gluconico o di una sorgente di acido gluconico (ossia un acido organico che si idrolizza in acqua per formare acido gluconico) viene formata, e la soluzione viene poi sottoposta ad un processo normalizzato di liofilizzazione per ottenere la composizione solida desiderata.

L'acido gluconico (o il suo equivalente) viene adoperato in un rapporto molare di circa 2-4 moli (più preferibilmente circa 2,5 moli) per mole di base m-AMSA. Poichè, come notato sopra, l'acido gluconico commerciale non è disponibile in una forma cristallina ben definita, si preferisce adoperare gluconolattone cristallino come acido organico. Il gluconolattone si idrolizza rapidamente in acqua per formare acido gluconico. Durante la liofilizzazione l'acido gluconico è almeno parzialmente convertito in gluconolattone. Il prodotto liofilizzato è quindi costituito da un miscuglio del sale monogluconato di m-AMSA con circa 1-3 moli di eccesso di acido gluconico, l'acido essendo parzialmente sotto la forma di acido gluconico e parzialmente sotto la forma di gluconolattone.

Dopo aver formato la soluzione acquosa di m-AMSA e acido, il miscuglio di reazione viene preferibilmente filtrato prima della liofilizzazione. La liofilizzazione può essere effettuata in liofilizzatori convenzionali da laboratorio o industriali. I parametri di liofilizzazione preferiti sono i seguenti:

precongelamento a  $-55^{\circ}\text{C}$ ;

congelamento a  $-50^{\circ}\text{C}$  per 2 ore;

sublimazione a  $-40^{\circ}\text{C}$  per circa 6-8 ore ad una

pressione di  $4 \times 10^{-2}$  Torr;

essiccamento: a +30°C per circa 48 ore.

Il sale gluconato cristallino e la composizione idrosolubile forniti dalla presente invenzione manifestano sostanzialmente le stesse proprietà antitumorali delle forme di m-AMSA della tecnica antecedente. Grazie alla loro elevata idrosolubilità, tuttavia, possono essere utilizzati per preparare forme/cliniche per dosaggio destinate alla somministrazione endovenosa che non contengono un veicolo farmaceutico indesiderabile come ad esempio dimetilacetammide. Il sale e la composizione possono tuttavia essere adoperati per preparare un prodotto di riempimento a secco a fiala singola o un prodotto liofilizzato per ricostituzione con acqua sterile o un veicolo acquoso sterile. Un veicolo preferito per la ricostituzione del sale gluconato è acido gluconico acquoso.

Il sale di m-AMSA e la composizione della presente invenzione possono essere adoperati per preparare forme di dosaggio parenterale per via orale o per via non endovenosa, oltre al prodotto preferito iniettabile per endovena. Il sale e la composizione hanno stabilità accettabile, sia in forma solida che in soluzione acquosa, e hanno sufficiente solubilità in acqua per consentire la somministrazione di una dose efficace di m-AMSA in un volume relativamente piccolo

di soluzione parenterale (permettendo così le iniezioni per endovenosa del bolo).

Nel trattamento di tumori della mammella, il sale e la composizione della presente invenzione possono essere somministrati sia per via orale sia per via parenterale, ma preferibilmente per via parenterale, in dosaggi (aggiustati per la quantità di base di m-AMSA) e secondo regimi precedentemente descritti nella letteratura.

I seguenti esempi sono forniti come illustrazione della presente invenzione, senza tuttavia limitarla.

#### Esempio 1

##### Preparazione del sale monogluconato di m-AMSA

Si scioglie delta-gluconolattone (0,89 g, 0,005 moli) in 0,5 ml d'acqua. Si aggiungono base di m-AMSA (1,95 g, 0,005 moli) e 100 ml di etanolo, e poi si disvola a ricadere il miscuglio per un breve periodo di tempo, ossia circa 5-10 minuti. La soluzione risultante viene lasciata a riposo per una nottata, in seguito a che si separa materiale cristallino nella soluzione. Il prodotto viene ricristallizzato da 100 ml di etanolo per dare 1,10 g di sale monogluconato di m-AMSA cristallino.

##### Proprietà del sale gluconato:

Contenuto di m-AMSA mediante l'ultravioletto = 62,6%

(contenuto teorico 66,6%);

contenuto di acido gluconico all'ultravioletto =

36,9%;

contenuto di gluconolattone all'ultravioletto = 1,1%.

Solubilità in acqua: 30 mg/ml a 50-60°C; 25 mg/ml a

temperatura ambiente.

Quando si scioglie in acqua ad una concentrazione di 7,1 microgrammi/ml, il sale gluconato manifesta picchi di assorbimento dell'ultravioletto a 208 nm (O.D. = 0,527), 247,5 nm (O.D. = 0,567), 263 nm (O.D.= 0,425) e 412 nm (O.D. = 0,121).

La fig. 1 mostra lo spettro di assorbimento nell'infrarosso del sale gluconato quando sia convertito in palline in bromuro potassico.

#### Esempio 2

##### Preparazione di una composizione idrosolubile di m-AMSA

(per la preparazione di fiale da 75 mg ad attività di

m-AMSA)

<u>Formula</u>	<u>Per fiala</u>	<u>Per partita di 1 litro</u>
Base di m-AMSA	75 mg	5 g
Gluconolattone (delta-lattone di acido gluconico)	93,46 mg	6,23 g
Acqua per iniezione	quanto basta per portare a 15 ml	quanto basta per portare ad 1 litro

Istruzioni per la preparazione (per partita da 1 litro)

(1) Preparazione di una soluzione al 10% di gluconolattone:

- pesare 10 g di gluconolattone,
- agitando aggiungere il lattone ad un contenitore di vetro contenente 80 ml d'acqua per iniezione.
- Mantenere l'agitazione fino ad ottenere la completa dissoluzione.
- Quanto basta fino a 100 ml con acqua per iniezione.
- Agitare per 5 minuti.

Questa soluzione dev'essere utilizzata dopo 24 ore di riposo a temperatura ambiente.

2) Pesare 5 g di base di m-AMSA

3). In un recipiente di vetro appropriato contenente 600 ml d'acqua per iniezione, aggiungere agitando 25 ml della soluzione di gluconolattone al 10%.

4). Agitando energicamente introdurre lentamente i 5 g di base di m-AMSA nel recipiente di vetro. Mantenere l'agitazione per 30 minuti.

5) Agitando introdurre 20 ml della soluzione di gluconolattone al 10% al miscuglio di reazione. Agitare per 30 minuti.

6) Aggiungere lentamente il resto della soluzione di gluconolattone al 10% (17,3 ml) al miscuglio di rea-

zione. Mantenere l'agitazione fino a ottenere la completa dissoluzione.

7) Quanto basta per portare ad 1 litro con acqua per iniezione.

8) Adoperando pressione d'azoto, far passare la soluzione attraverso un filtro da 0,22  $\mu$ .

9) Introdurre la soluzione in fiale di vetro flint da 30-38 ml (15 ml di soluzione per fiala). Inserire parzialmente tappi rossi di liofilizzazione di gomma butilica.

10) Sottoporre le fiale ad essiccamento per congelamento secondo i seguenti parametri:

precongelamento a  $-55^{\circ}\text{C}$ ,

congelamento a  $-50^{\circ}\text{C}$  per 2 ore,

sublimazione a  $-40^{\circ}\text{C}$  per circa 6-8 ore ad una pressione di circa  $4 \times 10^{-2}$  Torr.

essiccamento a  $+30^{\circ}\text{C}$  per circa 48 ore.

11) Turare le fiale sotto vuoto o sotto atmosfera di azoto e sigillare.

12) Per ricostituire, adoperare 20 ml d'acqua per iniezione per ciascuna fiala.

Proprietà della composizione liofilizzata:

Tempo di ricostituzione con 10 ml d'acqua = 4-5 minuti.

pH della soluzione: 3,65

Analisi del prodotto liofilizzato:  
di 0,172 g di composizione totale, circa 72 mg di m-AMSA, circa 93 mg di acido gluconico totale (potenziometria) di cui circa 40 mg sono  $\beta$ -gluconolattone (gas-cromatografia). Le impurezze sono al disotto dei limiti di rilevamento. Percentuale di  $H_2O$  (K.F.) = 0,8.

La stabilità acQUosa del prodotto ricostituito è soddisfacente dopo 24 ore. La perdita di potenza è appena percepibile e non si osserva alcuna impurezza.

Quando si sciolga in acqua ad una concentrazione di 12,17  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , la composizione liofilizzata manifesta picchi di assorbimento nell'ultravioletto a 209 nm (O.D. = 0,607), 247,5 nm (O.D. = 0,607), 266 nm (O.D. = 0,534), 413 nm (O.D. = 0,145) e 435 nm (O.D. = 0,143).

La fig. 2 mostra lo spettro di assorbimento nell'infrarosso della composizione liofilizzata quando sia convertita in palline in bromuro potassico.

#### RIVENDICAZIONI

1. Sale gluconato cristallino di m-AMSA.

2. Composizione idrosolubile solida stabile da

ricostituire con acqua o un veicolo acquoso come so-

luzione stabile di m-AMSA, detta composizione essen-

do costituita da un miscuglio di circa 1 mole di sale

gluconato di m-AMSA per 1-3 moli di un acido organico

scelto dal gruppo consistente in acido gluconico, gluconolattone e loro miscugli.

3. Composizione secondo la rivendicazione 1, avente circa 1 mole di sale gluconato di m-AMSA per 1,5 moli di acido organico.

4. Composizione idrosolubile solida stabile da ricostituire con acqua o un veicolo acquoso come soluzione stabile di m-AMSA, detta composizione essendo ottenuta mediante le fasi di:

(1) formazione di una soluzione acquosa di m-AMSA e di un acido organico scelto dal gruppo consistente in acido gluconico, gluconolattone e loro miscugli, il rapporto molare tra l'acido organico e il m-AMSA andando da circa 2:1 a circa 4:1, e

(2) liofilizzazione della soluzione acquosa così prodotta.

5. Composizione secondo la rivendicazione 4, in cui si adoperano circa 2,5 moli di acido organico per mole di m-AMSA.

6. Composizione secondo le rivendicazioni 4 o 5, in cui l'acido organico adoperato è gluconolattone.

7. Composizione secondo la rivendicazione 4, in cui la soluzione acquosa della fase (1) viene formata facendo reagire circa 5 g di m-AMSA e 6,23 g di gluco-

nolattone per litro di soluzione.

8. Procedimento per la produzione del sale gluconato cristallino di m-AMSA, che comprende le fasi di:

(1) formazione di una soluzione di m-AMSA e di un acido organico scelto dal gruppo consistente in acido gluconico, gluconolattone e loro miscugli in un solvente organico polare acquoso inerte, il rapporto molare tra acido organico e m-AMSA andando da circa 1:1 a circa 2:1, e

(2) cristallizzazione del sale gluconato desiderato dalla soluzione così ottenuta.

9. Procedimento secondo la rivendicazione 8, in cui l'acido organico adoperato è gluconolattone.

10. Procedimento secondo la rivendicazione 8, in cui l'acido organico adoperato è acido gluconico.

11. Procedimento secondo la rivendicazione 8, in cui si adopera circa 1 mole di acido organico per mole di m-AMSA.

12. Procedimento secondo la rivendicazione 8, in cui il solvente organico è etanolo.

13. Procedimento secondo la rivendicazione 8, in cui la fase (1) viene effettuata alla temperatura di riflusso.

14. Procedimento secondo la rivendicazione 8, in cui la soluzione formata nella fase (1) viene filtrata prima della cristallizzazione.

15. Procedimento per la produzione di una composizione idrosolubile solida stabile da ricostituire con acqua o un veicolo acquoso come soluzione stabile di m-AMSA, che comprende le fasi di:

(1) formazione di una soluzione acquosa di m-AMSA e di un acido organico scelto dal gruppo consistente in acido gluconico, gluconolattone e loro miscugli, il rapporto molare tra l'acido organico e il m-AMSA andando da circa 2:1 a circa 4:1, e

(2) liofilizzazione della soluzione acquosa così prodotta.

16. Procedimento secondo la rivendicazione 15, in cui l'acido organico è gluconolattone.

17. Procedimento secondo la rivendicazione 15, in cui il rapporto molare tra acido organico e m-AMSA è circa 2,5:1.

18. Procedimento secondo la rivendicazione 15, in cui la soluzione acquosa della fase (1) viene filtrata prima della liofilizzazione.

47-34A/81

No. di serie: 114809

Data di deposito: 24/1/80

Classe: 424

Sottoclasse: -

No. di gruppo: 125

Richiedenti: DANIEL BOUZARD, FRANCONVILLE, FRANCE;  
CLAUDE PEROL, PARIS, FRANCE; JACQUES STEMER, PARIS,  
FRANCE; ABRAHAM WEBER, PARIS, FRANCE; EDMUND S.  
GRANATEK, SYRACUSE, NY

DATI DI CONTINUAZIONE.....

VERIFICATO

DOMANDE DEL PCT/ESTERE. ....

VERIFICATO

Come depositata: Stato o paese FRX; Tavole di disegni 2;  
Riv. totali 18; Riv. indipendenti 5; Tassa di deposito ricevuta \$ 123; No. di pratica del rappresentante RD-1642

Indirizzare la corrispondenza a:

HERBERT W. TAYLOR, JR.

BRISTOL LABS.

DIV. OF BRISTOL-MYERS CO.

P.O. BOX 657, SYRACUSE, NY 13201

Titolo dell'invenzione: "COMPOSIZIONI ANTI-TUMORALI"

Si certifica con la presente che l'aggiunto costituisce copia fedele ed esatta tratta dai Registri dell'Ufficio Brevetti degli Stati Uniti della domanda originariamente depositata come sopra

identificata.

Per autorizzazione del  
COMMISSARIO DEI BREVETTI  
F.to: Illeggibile  
Ufficiale Certificante  
data 22 GENNAIO 1981

(SIGILLO)

24 GENNAIO 1980

114809

"COMPOSIZIONI ANTI-TUMORALI"

RIASSUNTO: L'invenzione riguarda un sale monogluconato cristallino dell'agente antitumorale 4'-(9-acridinilamino)-metansolfon-m-anisidide e composizioni comprendenti miscugli di detto sale con un acido organico scelto tra acido gluconico, gluconolattone o loro miscugli. Il sale nuovo e le composizioni nuove sono caratterizzati dal fatto di avere una solubilità in acqua inaspettatamente alta.

Il nuovo sale di addizione acida e le nuove composizioni della presente invenzione possiedono le proprietà antitumorali vantaggiose del noto composto a base libera, e inoltre hanno una solubilità in acqua inaspettatamente alta, consentendo in tal modo la preparazione di utili forme cliniche di dosaggio per somministrazione endovenosa.

Il derivato acridinico di m-AMSA / 4'-(9-acridinil-

ammino)-metansolfon-m-anisidide è stato indicato da Cain e altri in Europ. J. Cancer 10: 539-549 (1974) come avente significativa attività antitumorale nei sistemi di tumori di animali. Da allora questo composto è stato sottoposto a valutazione clinica con risultati iniziali molto promettenti.

Quando un agente antitumorale come il m-AMSA viene impiegato per l'uso clinico umano, si riconosce che la solubilità dell'agente è spesso il fattore determinante per stabilire la via di somministrazione e le forme di dosaggio. Per esempio, una sostanza idrosolubile può generalmente essere somministrata per via endovenosa mentre un materiale insolubile in acqua è limitato ad altre forme di somministrazione parenterale come quella intramuscolare e quella sottocutanea.

Un agente terapeutico avente solubilità in acqua facilita inoltre la preparazione di forme di dosaggio orali e parenterali endovenose per la somministrazione nell'uomo. Di conseguenza è decisamente vantaggioso che un agente terapeutico sia idrosolubile, particolarmente quando si tenga conto del fatto che la via più diretta per ottenere livelli terapeutici nel sangue per un farmaco nel corpo umano è quella mediante somministrazione endovenosa.

La forma di base libera del m-AMSA ha una solubi-

lità in acqua molto limitata e di conseguenza non può essere adoperata come forma di dosaggio per somministrazione endovenosa. Sono stati fatti tentativi per preparare sali di addizione acidae in grado di risolvere questo problema di solubilità, ma i sali monocloridrato e monometan-solfonato di cui è stata data notizia hanno dimostrato anch'essi di essere insufficientemente idrosolubili per l'uso clinico. La formulazione attualmente in uso clinico consta di due liquidi sterili combinati subito prima dell'uso. Una soluzione di m-AMSA in N,N-dimetil-acetammide anidra è contenuta in una fiala. Una fiala separata contiene una soluzione acquosa di acido lattico da adoperare come diluente. Dopo mescolazione la soluzione risultante di m-AMSA viene somministrata mediante infusione per endovena.

Mentre la presente formulazione clinica fornisce una forma di dosaggio endovenosa, presenta vari inconvenienti. Oltre alle difficoltà evidenti di preparazione e somministrazione della forma di dosaggio, contiene dimetil-acetammide come veicolo. La dimetil-acetammide sembra presentare vari sintomi tossici in animali e può di conseguenza risultare inaccettabile o indesiderabile come veicolo farmaceutico.

Di conseguenza uno scopo della presente invenzione

ne è di fornire forme idrosolubili stabili, terapeuticamente accettabili, di m-AMSA che possano essere somministrate per endovena (oltre che per altre vie) e che non contengano o richiedano dimetilacetammide come veicolo farmaceutico. Questo obiettivo nonché altre caratteristiche e vantaggi dell'invenzione saranno facilmente evidenti agli esperti nel ramo dalla descrizione che segue.

Sotto un aspetto, la presente invenzione fornisce un nuovo sale di addizione acida idrosolubile di m-AMSA che, in seguito a ricostituzione con acqua sterile o un veicolo acquoso sterile, può essere somministrato per endovena e non ha gli inconvenienti relativi alle note forme endovenose di questo agente.

Più particolarmente, viene fornito il sale monogluconato cristallino di m-AMSA.

Sotto un altro aspetto, l'invenzione fornisce una composizione idrosolubile stabile solida per ricostituzione con acqua o un veicolo acquoso come soluzione stabile di m-AMSA, detta composizione essendo costituita da un miscuglio di circa 1 mole di sale monogluconato di m-AMSA per 1-3 moli di un acido organico (o un suo precursore) scelto tra acido gluconico, gluconolattone o loro miscugli.

Sono anche forniti procedimenti per preparare il

sale sopra descritto e la composizione suddetta.

Nei disegni:

la figura 1 mostra lo spettro di assorbimento nel  
l'infrarosso del sale gluconato cristallino quando  
sia convertito in pallottole in bromuro potassico;

la figura 2 mostra lo spettro di assorbimento nel  
l'infrarosso di una composizione idrosolubile tipica  
quando sia convertita in pallottole in bromuro pa-  
tassico.

Molti sali di addizione acida convenzionali, far-  
maceuticamente accettabili, di m-AMSA sono solo poco  
solubili in acqua e di conseguenza inadatti alla som-  
ministrazione endovenosa in pazienti umani. Questo  
risulta evidentemente da riferimenti della letteratu-  
ra ai sali cloridrato e metansolfonato oltreché da  
prove di solubilità eseguite dai presenti inventori  
su sali come il levulinato, il citrato e il lattobio-  
nato.

Nell'esaminare le proprietà di solubilità dei sa-  
li di addizione acida di m-AMSA, è stato trovato inaspet-  
tatamente che un particolare sale cristallino di m-AMSA  
possiede una solubilità in acqua significativamente e-  
levate a temperatura ambiente per fornire una forma di  
dosaggio endovenosa accettabile. Di conseguenza il  
nuovo sale monogluconato di m-AMSA fornito dalla pre-

sente invenzione ha una solubilità in acqua a temperatura ambiente di circa 25 mg/ml. Questo sale gluconato risulta avere inoltre una stabilità accettabile, sia come solido cristallino che come soluzione acquosa dopo ricostituzione.

La preparazione del sale gluconato cristallino di m-AMSA viene effettuata dalle seguenti fasi:

(1) formazione di una soluzione di m-AMSA e di un acido organico (o un suo precursore) scelto dal gruppo consistente in acido gluconico (acido D-gluconico), gluconolattone ( $\delta$ -lattone di acido D-gluconico) e loro miscugli in un solvente organico polare acquoso inerte, il rapporto molare tra acido organico e m-AMSA essendo compreso tra circa 1:1 e circa 2:1; e

(2) cristallizzazione del sale gluconato desiderato dalla soluzione così ottenuta.

Il particolare solvente organico polare inerte adoperato per solubilizzare la base di m-AMSA non è critico, ed esempi di solventi adatti saranno facilmente evidenti agli esperti nel ramo. Solventi preferiti sono alcoli e chetoni polari come metanolo, etanolo, n-propanolo, isopropanolo, acetone, n-butanolo, 2-butanone, n-pantanolo, n-esanolo, glicol dietilenico, metil-isobutil-chetone, 3-pantanone, ecc.

Un solvente particolarmente comodo è l'etanolo. Il

sistema solvente deve contenere una piccola percentuale d'acqua (per esempio circa 0,5%) che può essere aggiunta al solvente organico o di preferenza fornita sotto forma di acido gluconico acquoso o di una soluzione di gluconolattone.

Il termine "acido organico" come qui adoperato e nelle rivendicazioni si riferisce all'acido gluconico come tale o ad un suo precursore che si idrolizza in soluzione acquosa per formare acido gluconico, per esempio gluconolattone. L'acido gluconico è difficile da produrre in una forma cristallina ben definita, per cui viene fornito acido gluconico commerciale come soluzione acquosa al 50%. Il gluconolattone, d'altra parte, è un materiale cristallino ben definito che può essere facilmente idrolizzato in soluzione acquosa per dare acido gluconico. Data la disponibilità del gluconolattone cristallino, è preferibile adoperare gluconolattone come sorgente di acido gluconico nella preparazione del sale gluconato. Il gluconolattone può essere aggiunto ad una soluzione acquosa del solvente organico polare per generare l'acido gluconico, oppure può essere aggiunto al solvente organico sotto forma di una soluzione aquosa.

La temperatura alla quale si effettua la dissoluzione non è critica e può andare dal punto di conge-

lamento al punto di ebollizione del sistema solvente.

Più vantaggiosamente si adoperano temperature intorno a quella ambiente o al disopra. E' stato trovato che la solubilità è massimizzata se il miscuglio viene portato alla temperatura di riflusso.

L'acido gluconico o il gluconolattone può essere impiegato in rapporti molari di circa 1 a 2 moli per mole di base di m-AMSA. Un prodotto della miglior qualità è risultato tuttavia dall'impiego di quantità equimolari del m-AMSA e dell'acido organico.

Dopo aver formato una soluzione di m-AMSA e di acido, è preferibile effettuare una fase di filtrazione prima di lasciare che la cristallizzazione proceda. Si possono adoperare allora tecniche normalizzate di cristallizzazione per ottenere il desiderato sale gluconato. Cristalli germe del sale gluconato possono essere aggiunti al miscuglio di reazione per suscitare e/o potenziare la cristallizzazione. Dopo recupero il sale cristallino viene lavato (per esempio con etanolo) ed essiccato mediante procedure convenzionali. La ricristallizzazione (per esempio da etanolo) può essere utilizzata per ottenere il prodotto in una forma altamente purificata.

Sotto un altro aspetto la presente invenzione fornisce una composizione idrosolubile solida stabi-

le, adatta in seguito a ricostituzione con acqua o altro veicolo acquoso come soluzione stabile di m-AMSA, detta composizione essendo costituita da un miscuglio di circa 1 mole di sale monogluconato di m-AMSA per 1-3 moli di un acido organico (o un suo precursore) scelto dal gruppo consistente in acido gluconico, glucolattone e i loro miscugli.

La composizione sopra descritta può essere impiegata sotto forma di un prodotto di riempimento a secco o liofilizzato, ma è preferibilmente un miscuglio liofilizzato. La composizione può essere comodamente e rapidamente ricostituita con acqua sterile o un veicolo acquoso sterile per fornire almeno una soluzione vera di 5 mg/ml di m-AMSA avente eccellente stabilità.

La preparazione della composizione idrosolubile può essere comodamente effettuata mediante una procedura tradizionale di liofilizzazione. Vale a dire che una soluzione acquosa di m-AMSA e un eccesso di acido gluconico o di una sorgente di acido gluconico (ossia un acido organico che si idrolizza in acqua per formare acido gluconico) viene formata, e la soluzione viene poi sottoposta ad un processo normalizzato di liofilizzazione per ottenere la composizione solida desiderata.

L'acido gluconico (o il suo equivalente) viene adoperato in un rapporto molare di circa 2-4 moli (più preferibilmente circa 2,5 moli) per mole di base m-AMSA. Poichè, come notato sopra, l'acido gluconico commerciale non è disponibile in una forma cristallina ben definita, si preferisce adoperare gluconolattone cristallino come acido organico. Il gluconolattone si idrolizza rapidamente in acqua per formare acido gluconico. Durante la liofilizzazione l'acido gluconico è almeno parzialmente convertito in gluconolattone. Il prodotto liofilizzato è quindi costituito da un miscuglio del sale monogluconato di m-AMSA con circa 1-3 moli di eccesso di acido gluconico, l'acido essendo parzialmente sotto la forma di acido gluconico e parzialmente sotto la forma di gluconolattone.

Dopo aver formato la soluzione acquosa di m-AMSA e acido, il miscuglio di reazione viene preferibilmente filtrato prima della liofilizzazione. La liofilizzazione può essere effettuata in liofilizzatori convenzionali da laboratorio o industriali. I parametri di liofilizzazione preferiti sono i seguenti:

precongelamento a  $-55^{\circ}\text{C}$ ;

congelamento a  $-50^{\circ}\text{C}$  per 2 ore;

sublimazione a  $-40^{\circ}\text{C}$  per circa 6-8 ore ad una pressione di  $4 \times 10^{-2}$  Torr;

essiccamento: a +30°C per circa 48 ore.

Il sale gluconato cristallino e la composizione idrosolubile forniti dalla presente invenzione manifestano sostanzialmente le stesse proprietà antitumorali delle forme di m-AMSA della tecnica antecedente. Grazie alla loro elevata idrosolubilità, tuttavia, possono essere utilizzati per preparare forme cliniche per dosaggio destinate alla somministrazione endovenosa che non contengono un veicolo farmaceutico indesiderabile come ad esempio dimetilacetammide. Il sale e la composizione possono tuttavia essere adoperati per preparare un prodotto di riempimento a secco a fiala singola o un prodotto liofilizzato per ricostituzione con acqua sterile o un veicolo acquoso sterile. Un veicolo preferito per la ricostituzione del sale gluconato è acido gluconico acquoso.

Il sale di m-AMSA e la composizione della presente invenzione possono essere adoperati per preparare forme di dosaggio parenterale per via orale o per via non endovenosa, oltre al prodotto preferito iniettabile per endovena. Il sale e la composizione hanno stabilità accettabile, sia in forma solida che in soluzione acquosa, e hanno sufficiente solubilità in acqua per consentire la somministrazione di una dose efficace di m-AMSA in un volume relativamente piccolo

di soluzione parenterale (permettendo così le iniezioni per endovena del bolo).

Nel trattamento di tumori della mammella, il sale e la composizione della presente invenzione possono essere somministrati sia per via orale sia per via parenterale, ma preferibilmente per via parenterale, in dosaggi (aggiustati per la quantità di base di m-AMSA) e secondo regimi precedentemente descritti nella letteratura.

I seguenti esempi sono forniti come illustrazione della presente invenzione, senza tuttavia limitarla.

Esempio 1

Preparazione del sale monogluconato di m-AMSA

Si scioglie delta-gluconolattone (0,89 g, 0,005 moli) in 0,5 ml d'acqua. Si aggiungono base di m-AMSA (1,95 g, 0,005 mol) e 100 ml di etanolo, e poi si disvilla a ricadere il miscuglio per un breve periodo di tempo, ossia circa 5-10 minuti. La soluzione risultante viene lasciata a riposo per una nottata, in seguito a che si separa materiale cristallino nella soluzione. Il prodotto viene ricristallizzato da 100 ml di etanolo per dare 1,10 g di sale monogluconato di m-AMSA cristallino.

Proprietà del sale gluconato:

Contenuto di m-AMSA mediante l'ultravioletto = 62,6%

(contenuto teorico 66,6%);

contenuto di acido gluconico all'ultravioletto =

36,9%;

contenuto di gluconolattone all'ultravioletto = 1,1%.

Solubilità in acqua: 30 mg/ml a 50-60°C; 25 mg/ml a temperatura ambiente.

Quando si scioglie in acqua ad una concentrazione di 7,1 microgrammi/ml, il sale gluconato manifesta picchi di assorbimento dell'ultravioletto a 208 nm (O.D. = 0,527), 247,5 nm (O.D. = 0,567), 263 nm (O.D. = 0,425) e 412 nm (O.D. = 0,121).

La fig. 1 mostra lo spettro di assorbimento nell'infrarosso del sale gluconato quando sia convertito in palline in bromuro potassico.

#### Esempio 2

##### Preparazione di una composizione idrosolubile di m-AMSA

(per la preparazione di fiale da 75 mg ad attività di m-AMSA)

<u>Formula</u>	<u>Per fiala</u>	<u>Per partita di 1 litro</u>
Base di m-AMSA	75 mg	5 g
Gluconolattone (delta-lattone di acido gluconico)	93,46 mg	6,23 g
Acqua per iniezione	quanto basta per portare a 15 ml	quanto basta per portare ad 1 litro

Istruzioni per la preparazione (per partita da 1 litro)

(1). Preparazione di una soluzione al 10% di gluconolattone:

- pesare 10 g di gluconolattone,
- agitando aggiungere il lattone ad un contenitore di vetro contenente 80 ml d'acqua per iniezione.
- Mantenere l'agitazione fino ad ottenere la completa dissoluzione.
- Quanto basta fino a 100 ml con acqua per iniezione.
- Agitare per 5 minuti.

Questa soluzione dev'essere utilizzata dopo 24 ore di riposo a temperatura ambiente.

2) Pesare 5 g di base di m-AMSA

3) In un recipiente di vetro appropriato contenente 600 ml d'acqua per iniezione, aggiungere agitando 25 ml della soluzione di gluconolattone al 10%.

4) Agitando energicamente introdurre lentamente i 5 g di base di m-AMSA nel recipiente di vetro. Mantenere l'agitazione per 30 minuti.

5) Agitando introdurre 20 ml della soluzione di gluconolattone al 10% al miscuglio di reazione. Agitare per 30 minuti.

6) Aggiungere lentamente il resto della soluzione di gluconolattone al 10% (17,3 ml) al miscuglio di rea-

zione. Mantenere l'agitazione fino a ottenere la completa dissoluzione.

7) Quanto basta per portare ad 1 litro con acqua per iniezione.

8) Adoperando pressione d'azoto, far passare la soluzione attraverso un filtro da  $0,22 \mu$ .

9) Introdurre la soluzione in fiale di vetro flint da 30-38 ml. (15 ml di soluzione per fiala). Inserire parzialmente tappi rossi di liofilizzazione di gomma butilica.

10) Sottoporre le fiale ad essiccamento per congelamento secondo i seguenti parametri:

precongelamento a  $-55^{\circ}\text{C}$ ,

congelamento a  $-50^{\circ}\text{C}$  per 2 ore,

sublimazione a  $-40^{\circ}\text{C}$  per circa 6-8 ore ad una pressione di circa  $4 \times 10^{-2}$  Torr.

essiccamento a  $+30^{\circ}\text{C}$  per circa 48 ore.

11) Turare le fiale sotto vuoto o sotto atmosfera di azoto e sigillare.

12) Per ricostituire, adoperare 20 ml d'acqua per iniezione per ciascuna fiala.

Proprietà della composizione liofilizzata:

Tempo di ricostituzione con 10 ml d'acqua = 4-5 minuti.

pH della soluzione: 3,65

Analisi del prodotto liofilizzato:

di 0,172 g di composizione totale, circa 72 mg di m-AMSA, circa 93 mg di acido gluconico totale (potenziometria) di cui circa 40 mg sono  $\beta$ -gluconolattone (gas-cromatografia). Le impurezze sono al disotto dei limiti di rilevamento. Percentuale di  $H_2O$  (K.F.) = 0,8.

La stabilità aquosa del prodotto ricostituito è soddisfacente dopo 24 ore. La perdita di potenza è appena percepibile e non si osserva alcuna impurezza.

Quando si sciolga in acqua ad una concentrazione di 12,17  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , la composizione liofilizzata manifesta picchi di assorbimento nell'ultravioletto a 209 nm (O.D. = 0,607), 247,5 nm (O.D. = 0,607), 266 nm (O.D. = 0,534), 413 nm (O.D. = 0,145) e 435 nm (O.D. = 0,143).

La fig. 2 mostra lo spettro di assorbimento nell'infrarosso della composizione liofilizzata quando sia convertita in palline in bromuro potassico.

RIVENDICAZIONI

1. Sale gluconato cristallino di m-AMSA.

2. Composizione idrosolubile solida stabile da ricostituire con acqua o un veicolo acquoso come soluzione stabile di m-AMSA, detta composizione essendo costituita da un miscuglio di circa 1 mole di sale gluconato di m-AMSA per 1-3 moli di un acido organico

scelto dal gruppo consistente in acido gluconico, gluconolattone e loro miscugli.

3. Composizione secondo la rivendicazione 1, avendo circa 1 mole di sale gluconato di m-AMSA per 1,5 moli di acido organico.

4. Composizione idrosolubile solida stabile da ricostituire con acqua o un veicolo acquoso come soluzione stabile di m-AMSA, detta composizione essendo ottenuta mediante le fasi di:

(1) formazione di una soluzione acquosa di m-AMSA e di un acido organico scelto dal gruppo consistente in acido gluconico, gluconolattone e loro miscugli, il rapporto molare tra l'acido organico e il m-AMSA andando da circa 2:1 a circa 4:1, e

(2) liofilizzazione della soluzione acquosa così prodotta.

5. Composizione secondo la rivendicazione 4, in cui si adoperano circa 2,5 moli di acido organico per mole di m-AMSA.

6. Composizione secondo le rivendicazioni 4 o 5, in cui l'acido organico adoperato è gluconolattone.

7. Composizione secondo la rivendicazione 4, in cui la soluzione acquosa della fase (1) viene formata facendo reagire circa 5 g di m-AMSA e 6,23 g di gluco-

nolattone per litro di soluzione.

8.. Procedimento per la produzione del sale gluconato cristallino di m-AMSA, che comprende le fasi di:

(1) formazione di una soluzione di m-AMSA e di un acido organico scelto dal gruppo consistente in acido gluconico, gluconolattone e loro miscugli in un solvente organico polare acquoso inerte, il rapporto molare tra acido organico e m-AMSA andando da circa 1:1 a circa 2:1, e

(2) cristallizzazione del sale gluconato desiderato dalla soluzione così ottenuta.

9.. Procedimento secondo la rivendicazione 8, in cui l'acido organico adoperato è gluconolattone.

10.. Procedimento secondo la rivendicazione 8, in cui l'acido organico adoperato è acido gluconico.

11.. Procedimento secondo la rivendicazione 8, in cui si adopera circa 1 mole di acido organico per mole di m-AMSA.

12.. Procedimento secondo la rivendicazione 8, in cui il solvente organico è etanolo.

13.. Procedimento secondo la rivendicazione 8, in cui la fase (1) viene effettuata alla temperatura di riflusso.

14. Procedimento secondo la rivendicazione 8, in cui la soluzione formata nella fase (1) viene filtrata prima della cristallizzazione.

15. Procedimento per la produzione di una composizione idrosolubile solida stabile da ricostituire con acqua o un veicolo acquoso come soluzione stabile di m-AMSA, che comprende le fasi di:

(1) formazione di una soluzione acquosa di m-AMSA e di un acido organico scelto dal gruppo consistente in acido gluconico, gluconolattone e loro miscugli, il rapporto molare tra l'acido organico e il m-AMSA andando da circa 2:1 a circa 4:1, e

(2) liofilizzazione della soluzione aquosa così prodotta.

16. Procedimento secondo la rivendicazione 15, in cui l'acido organico è gluconolattone.

17. Procedimento secondo la rivendicazione 15, in cui il rapporto molare tra acido organico e m-AMSA è circa 2,5:1.

18. Procedimento secondo la rivendicazione 15, in cui la soluzione aquosa della fase (1) viene filtrata prima della liofilizzazione.

# **DOCUMENTAZIONE RILEGATA**

SPETTRO NELL' INFRAROSSO DELLA COMPOSIZIONE IDROSOLUBILE DELL' ES. 2 (KBr)

FIG. 2

INFRARED SPECTRUM OF WATER-SOLUBLE COMPOSITION  
OF EXAMPLE 2 (KBr)

476044/81

PERCENT TRANSMISSION

WAVELENGTH IN MICRONS

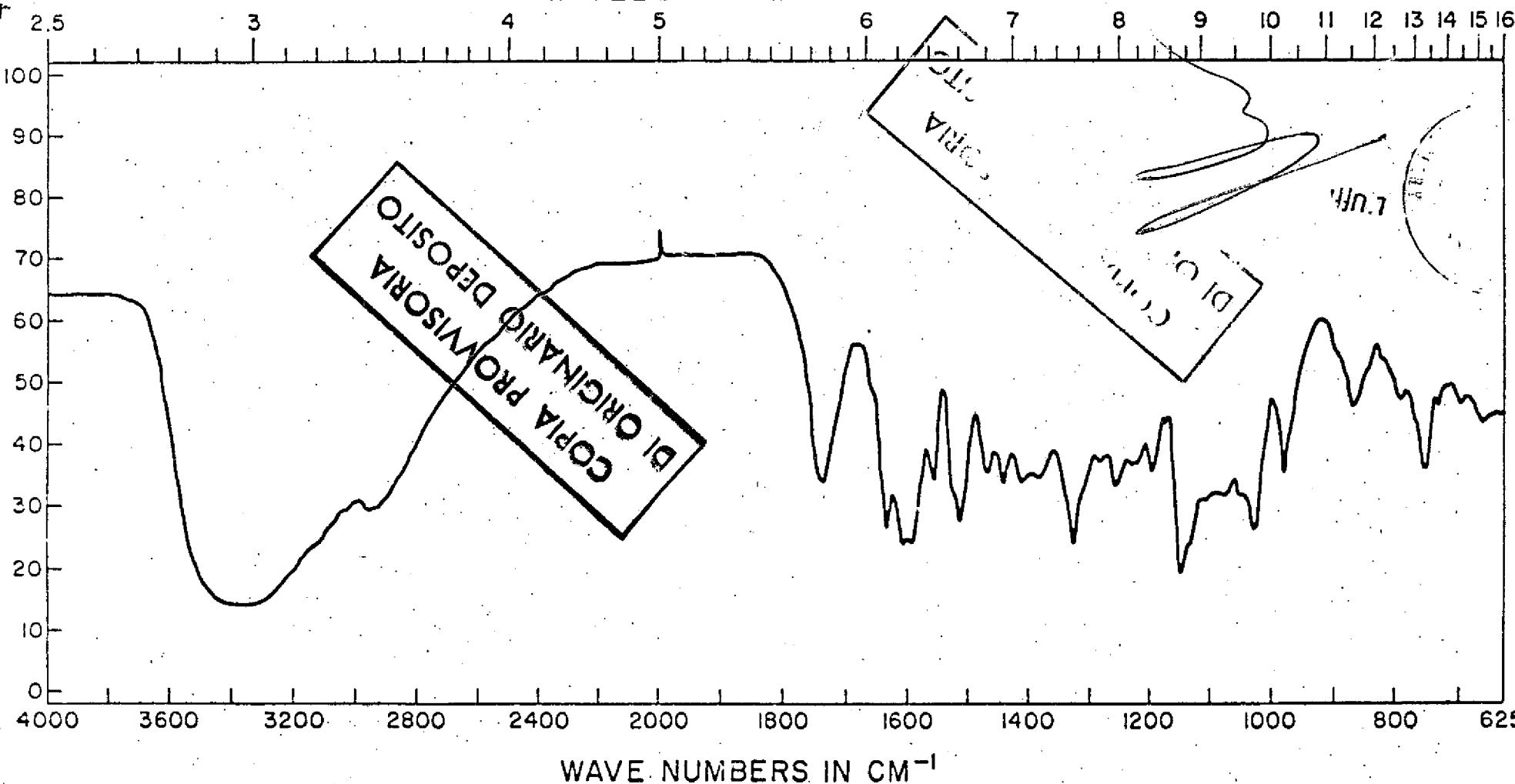


FIG. I

INFRARED SPECTRUM OF m-AMSA, GLUCONATE SALT (KBr)

SPETTRO NELL' INFRAROSSO DEL SALE GLUCONATO DI m-ANISA

WAVELENGTH IN MICRONS LUNGHEZZA D'ONDA IN MICRON

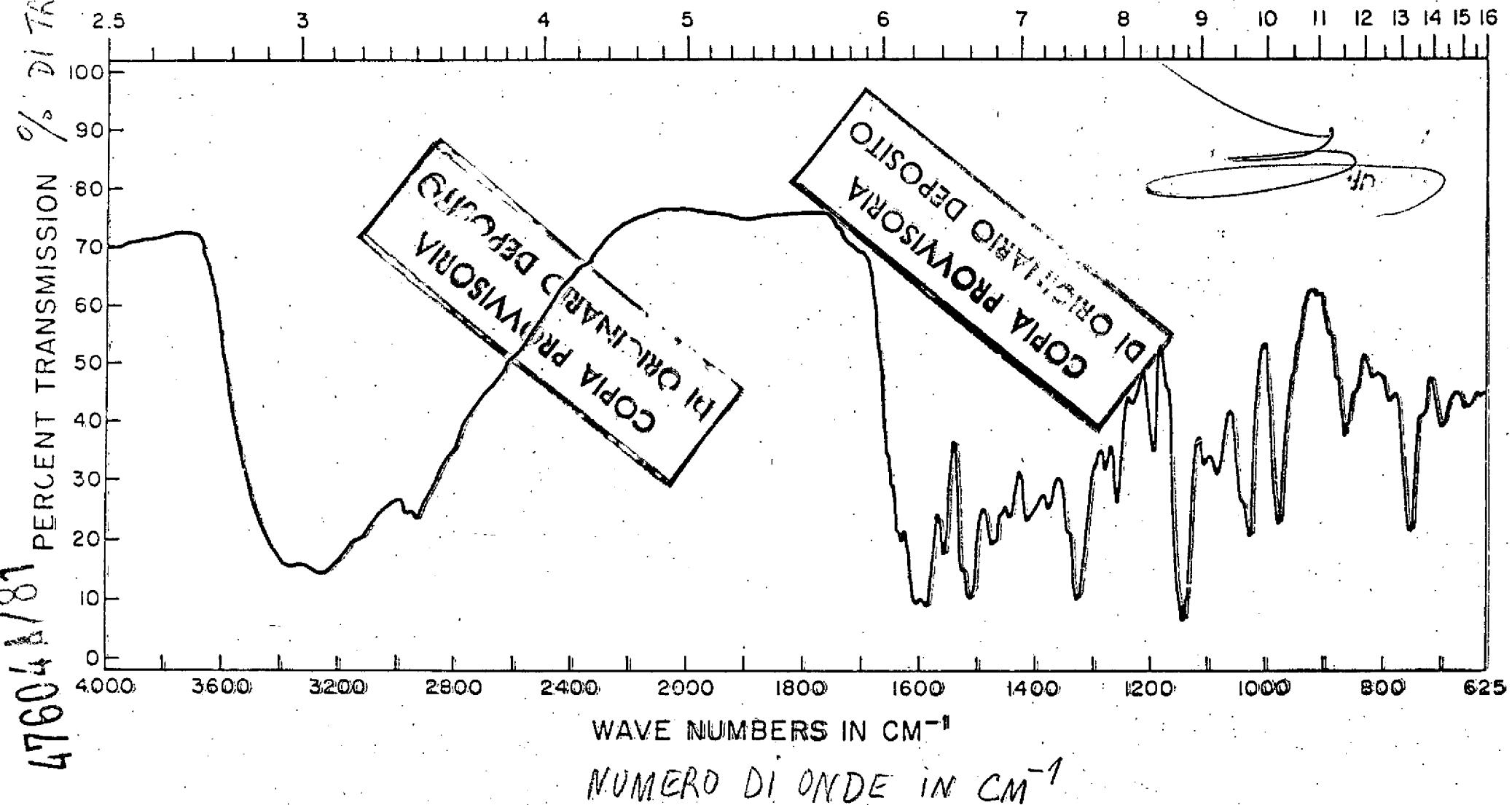
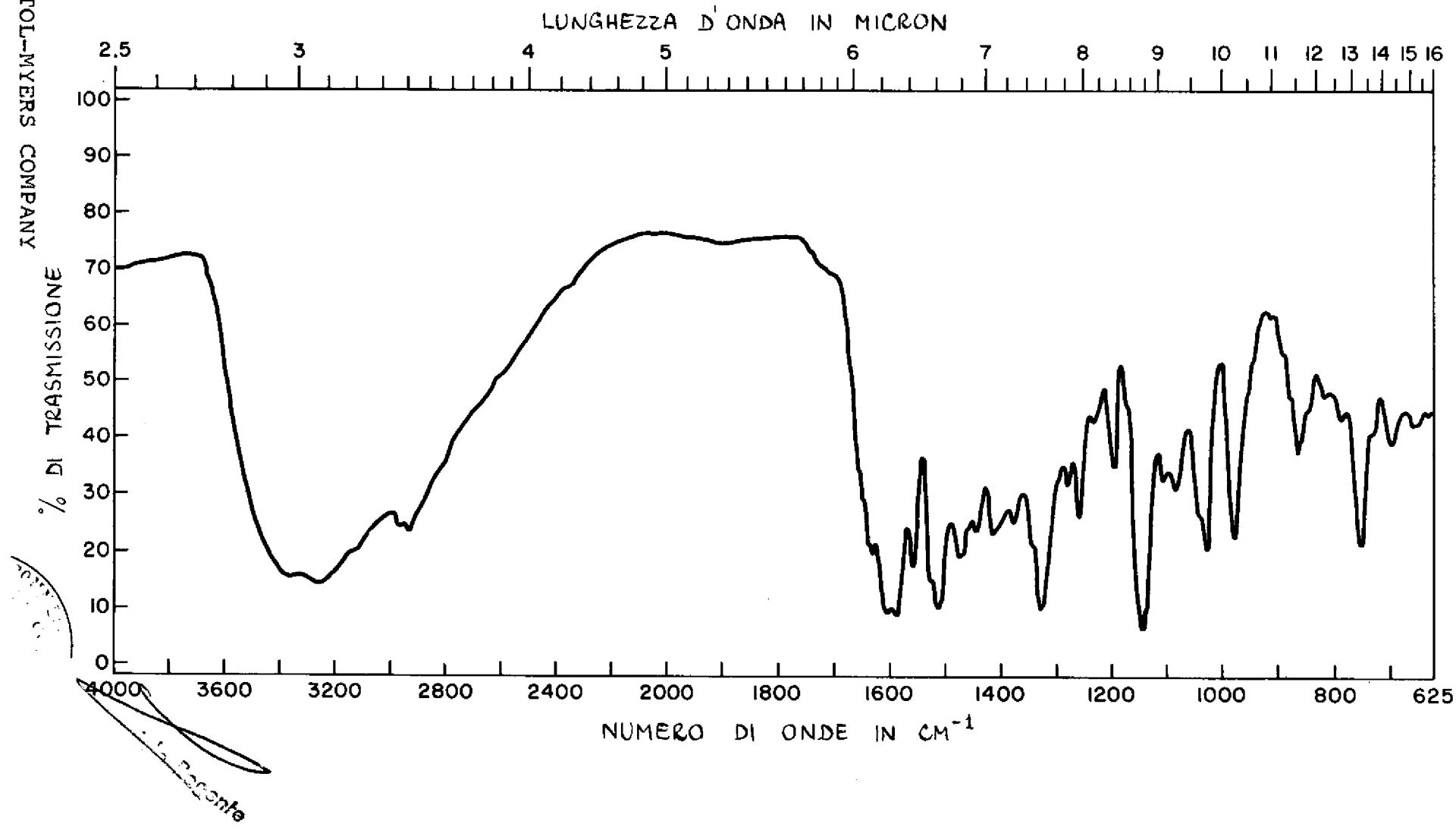


FIG. I

COPIA DEFINITIVA

## SPECTRUM IN THE INFRARED REGION OF THE SALT GLUCONATE OF m-AMSA (KBr)



COPIA DEFINITIVA

FIG. 2

SPETTRO NELL' INFRAROSSO DELLA COMPOSIZIONE IDROSOLUBILE DELL' ES. 2 (KBz)

P.-P. BRISTOL-MYERS COMPANY  
P. ING. BARZANO & ZANARDI S.p.A.

