



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **328035**

(13) **B1**

**NORGE**

(51) Int Cl.

**A61K 31/4995 (2006.01)**

**A61K 47/26 (2006.01)**

**A61P 35/00 (2006.01)**

### Patentstyret

---

|      |            |  |      |                           |                               |
|------|------------|--|------|---------------------------|-------------------------------|
| (21) | Søknadsnr  | 20072713   | (86) | Int.inng.dag og søknadsnr | 2005.10.12<br>PCT/GB05/050184 |
| (22) | Inng.dag   | 2007.05.29   | (85) | Videreføringsdag          | 2007.05.29                    |
| (24) | Løpedag    | 2005.10.12   | (30) | Prioritet                 | 2004.10.29, US, 60/623,813    |
| (41) | Alm.tilgj  | 2007.07.19   |      |                           |                               |
| (45) | Meddelt    | 2009.11.16   |      |                           |                               |
| (73) | Innehaver  | Pharma Mar SA Sociedad Unipersonal, Polígono Industrial la Mina, Avda de los Reyes, 1, Colmenar Viejo, 28770 MADRID, ES  |      |                           |                               |
| (72) | Oppfinner  | Pilar Calvo Salve, c/o Pharma Mar SA, Calle de la Calera 3, Polígono Industrial de Tres Cantos, Tres Cantos, 28760 MADRID, ES<br>Bastiaan Nuijen, c/o Slotervaart Hospital, Louwesweg 6, 1066EC AMSTERDAM, NL<br>Jacob Hendrik Beijnen, c/o Slotervaart Hospital, Louwesweg 6, 1066EC AMSTERDAM, NL<br>María Tobío Barreira, c/o Pharma Mar SA, Polígono Industrial la Mina, Avenida de los Reyes, 1, Colmenar Viejo, 28770 MADRID, ES |      |                           |                               |
| (74) | Fullmektig | Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO   |      |                           |                               |

---

|      |                       |  |  |  |  |
|------|-----------------------|--|--|--|--|
| (54) | Benevnelse            | <b>Sammensetninger som innbefatter et ecteinascidin og et disakkarid, en fremgangsmåte for fremstilling derav, av et beger inneholdende en slik og av en løsning for intravenøs infusjon, en fremgangsmåte for å redusere dannelsen av et ET-701 i en formulering av ET-743, samt anvendelse av løsningen.</b> |  |  |  |
| (56) | Anførte publikasjoner | WO 02/064843 A, WO 00/69441 A, WO 03/039571 A  |  |  |  |
| (57) | Sammendrag            |  |  |  |  |

Ecteinascidinformuleringer, fremgangsmåter for fremstilling av samme, fremstilte artikler og kit med slike formuleringer, og fremgangsmåter for behandling av sykdommer med samme formuleringer er tilveiebrakt.

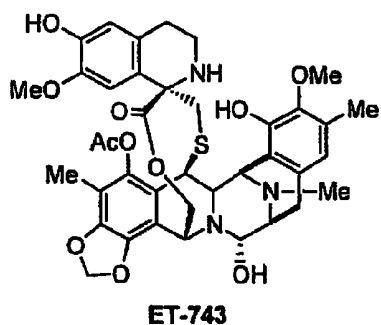
Foreliggende oppfinnelse angår sammensetninger som innbefatter et ecteinascidin og et disakkarid, en fremgangsmåte for fremstilling derav, en fremgangsmåte for fremstilling av et beger inneholdende en slik, en fremgangsmåte for fremstilling av en løsning for intravenøs infusjon, en fremgangsmåte for å redusere dannelsen av ET-701 i en  
5 formulering av ET-743, samt anvendelse av løsningen. Mer spesielt angår den sammensetninger og formuleringer av ecteinascidiner, slik som ecteinascidin 743.

Ecteinascidin har blitt identifisert, strukturelt karakterisert og syntesefremgangsmåte fra fremstilling av dem har blitt beskrevet. Se f.eks. R. Sakai et al., 1992, *Proco. Natl. Acad. Sci. USA* 89, side 11456-11460. "Additional antitumor ecteinascidines from Carribean tunicate: Crystal structures and activities in vivo"; R. Mernchaca, et al., 2003, *J. Org. Chem.* 68(23), side 8859-8866, "Synthesis of natural ecteinascidins (ET-729, ET-745, Et-759B, ET-736, ET-637, ET-594) from cyanosafracin B"; and I. Manzanares, et al., 2001, *Curr. Med. Chem. – Anti-Cancer Agents*, 1, side 257-276, "Advances in  
15 Chemistry and Pharmacology of Ecteinascidins, A Promising New Class of Anticancer Agents"; og referanser deri. Disse referansene beskriver ecteinascidiner. Eksempler på ecteinascidiner er tilveiebrakt ved ET-734, ET-729, ET-745, ET-759A, ET-759B, ET-759C, ET-770, ET-815, ET-731, ET-745B, ET-722, ET-736, ET-738, ET-808, ET-752, ET-594, ET-552, ET-637, ET-652, ET-583, ET-597, ET-596, ET-639, ET-641 og  
20 derivater derav, slike som acetylerte former, formylerte former, metylerte former og oksidformer, slike som N-oksidformer.

De strukturelle karakteriseringene av slike ecteinascidiner blir ikke gjengitt eksplisitt heri på grunn av den detaljerte beskrivelse tilveiebrakt i slike referanser og siteringer  
25 deri; og fagmannen innen denne teknologien vil således være i stand til å oppnå slik informasjon direkte fra kildene sitert her og relaterte kilder.

Minst en av ecteinascidinforbindelse, ET-743, har inngående blitt studert, og den vil bli referert til spesifikt heri for å illustrere trekk ved foreliggende oppfinnelse.

30 Ecteinascidin 743 (ET-743) er et tetrahydroisokinolid alkaloid isolert fra det marine tunicate *Ecteinascidia turbinata* og har følgende struktur:



En farmasøytisk sammensetning som innbefatter ET-743 i kombinasjon med en farmasøytisk akseptabel bærer, fortynningsmiddel eller eksipient er angitt i US 5,256,663.

En nylig gjennomgang av ET-743, dens kjemi, virkningsmekanisme og prekliniske og kliniske utvikling kan finnes i van Kesteren, Ch. Et.al., 2003, *Anti-Cancer Drugs*, 14 (7), side 487-502: "Yondelis (trabectedin, ET-743): in development of an anticancer agent of marine origin" og referanser deri.

ET-743 fremviser potent antineoplastisk aktivitet overfor et antall humane tumor xenografts dyrkes i atymiske mus, som inkluderer melanom og eggstokk og brystkarcinom.

I klinisk fase I studier av ET-743 ble lovende responser observert hos pasienter med sarkom og bryst og eggstokkcarcinom. Derfor er dette nye legemidlet i dag under intens undersøkelse i flere fase II kliniske forsøk hos pasienter med et antall neoplastiske sykdommer.

WO02/06843 antyder at ecteinascidin kan produseres fra bakterier men angir ikke at dette er gjort eller hvordan bakteriene kan isoleres.

Slik det er forklart i WO 0069441 blir ET-743 levert og lagret som et sterilt lyofilisert produkt, som har ET-743, mannitol og en fosfatbuffer. En foretrukket formulering er en som oppnås fra 0,9% natriumklorid eller annen egnet infusjonsvehikkel, 250 µg ET-743 og 250 mg mannitol, 34 mg monofosfonium sulfat og fosforsyre for å justere pH. Denne formuleringen blir deretter rekonstitusjonert og fortynnet for intravenøs injeksjon.

WO 03/039571 beskriver en lignende løsning inneholdene ET-743 og mannitol.

ET-743 er en kompleks kjemisk bestanddel, som avdekkes ved dens strukturelle trekk. I tillegg fremviser ET-743 begrenset vandig løselighet og dens stabilitet, særlig i biokompatible former og formuleringer, er vanskelig å predikere og oppnå. Disse karakteristikkene utfordrer fagmannen og vanlige metodologier innenfor denne teknologien, særlig når det gjelder fremstilling av ET-743 formuleringer som er klare for anvendelse for medisinske formål. Slike anvendelser bygger foretrukket på formuleringer hvis karakteristikk inkluderer en eller flere av følgende: biokompatibilitet, stabilitet under omgivelsesbetingelser eller under betingelser som er så nær omgivelsesbetingelser som mulig, med en lagringstid som er så lang som mulig, og enkel rekonstitusjon for å danne rekonstitusjonerte løsninger som er stabile under omgivelses eller nær omgivelsesbetingelser, i så lang tid som mulig.

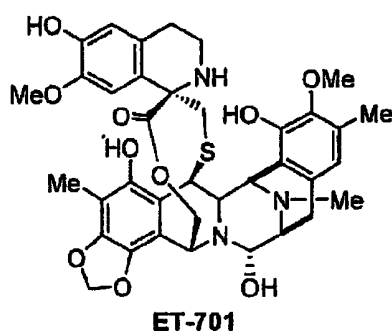
Imidlertid tilveiebringer vanlige formuleringer og metodologier for fremstilling av slike formuleringer ikke ønskede trekk og karakteristikk slik som de som er beskrevet ovenfor. For eksempel rapporterer den siterte gjennomgangen fra 2003 av van Kersteren Ch. et al. At ET-743 har begrenset vandig løselighet. Imidlertid, ved justering av pH til 4, kan adekvate konsentrasjoner av ET-743 oppnås. Instabilitet av ET-743 i vandig løsning nødvendiggjør lyofilisasjon for å øke lagringstabiliteten til det farmasøytiske produkt. ET-743 blir i dag formulert som et sterilt lyofilisert produkt som inneholder 250 µg aktiv substans per doseringsenhet, 250 mg mannitol som et bulkmiddel og 0,05 M fosfatbuffer ved pH 4 for å solubilisere ET-743. Denne formuleringen er ustabil ved langtidslagring i kjøleskap og romtemperatur, og bør derfor lagres mellom -15 og -25°C, beskyttet fra lys. Rekonstitusjon utføres ved tilsetning av 5 ml vann for injeksjon, med etterfølgende fortykning i normalt saltvann før i.v. infusjon. Den rekonstitunerte løsningen er stabil ved omgivelsestemperatur i opptil 24 timer.

I praksis blir dette produktet som inneholder 250 µg ET-743 fremstilt ved frysetørking av 5 ml løsning som inneholder ET-743, mannitol, fosfat buffer og vann i en formet medisinflaske. Formede medisinflasker som inneholder 1 mg ET-743 blir også fremstilt ved frystørking av 20 ml av løsningen.

Frysetørking involverer typisk frysing av løsninger, som reduserer trykket i en periode ved primær tørking for å fjerne vanddamp fra det frosne materialet ved sublimasjon og gir en delvis tørket masse, og å øke temperaturen i en periode i den andre tørkingen for å fjerne restvann fra den delvis tørkede massen. Medisinflaskene blir deretter forseglet.

Den ovenfor beskrevne vanlige ET-743 formuleringen har flere ulemper. En av disse er at den lyofiliserte ET-743 formuleringen må lagres ved ca.  $-20^{\circ}\text{C}$  for å hindre nedbryting av ET-743 for å oppnå en lagringstid på minst 18 måneder.

- 5 I tillegg har ET-743 formuleringene problemer med at det dannes relativt store mengde ET-701 som urenheter. ET-701 er hovedurenheten som oppstår i lyofiliseringsprosessen og ved lagring av ET-743 formuleringen. Den kommer fra hydrolyse av ET-743 og har følgende struktur:



- 10 Dannelse av urenheter reduserer eller til og med foregriper imidlertid muligheten for standardiserte formuleringer. Det er som en konsekvens av dette derfor ønskelig å tilveiebringe formuleringer og fremgangsmåter for fremstilling av samme som tilveiebringer utførelsesformer hvis sammensetning ikke lett og uforutsigbart blir forandret av ukontrollert dannelse av urenheter.

15

- Videre er en annen ulempe når det gjelder den ovenfor beskrevne vanlige ET-743 formuleringemetodologien at, for å oppnå det lyofiliserte formuleringen, er det nødvendig å frysetørke en relativt stor mengde av løsning med fyllevolumer i størrelsesorden 5 til 20 ml. Til forskjell fra dette vil det være ønskelig å utvikle en fremstillingsmetodologi for formuleringer med forbindelser så komplekse som ET-743 som muliggjør fremstilling av formuleringer med høyere aktive substanskonsentrasjoner, slik at volumene som håndteres som en konsekvens av dette blir redusert. Tid og energi er nødvendig i vanlige fremgangsmåter for frysetørkettrinnet i lys av de relativt høye fyllevolumene på 5 eller 20 ml. Sammen med tid og energi er det også en risiko for nedbryting av ET-743, særlig i den andre tørkingen.
- 25

- I lys av potensialet til ET-743 formuleringene som antitumore midler er det et behov for å tilveiebringe en formulering som kan løse problemene som vanlige formuleringer og fremstillingsmetodologier ikke adresserer eller ikke fullstendig løser. Disse problemene inkluderer problemet med stabilitet av ET-743. Utførelsesformer av ET-743
- 30

formuleringer bør foretrukket fremvise fordelaktige frysetørkeegenskaper, hvor slike omfatter lett rekonstitusjonering og de bør foretrukket fremvise fortynningsegenskaper slik som etter fortynning med infusjonsfluid, mens det oppnås mange av de ønskede karakteristikkene ved formuleringene for medisinsk mulig, slik det er referert heri som 5 mulig. Slik det er indikert ovenfor bør utførelsesformer av ET-743 formuleringer være stabil ved langtidslagring. I tillegg bør formuleringen og dens fremstillingsmetodologi tilfredsstillende biokompatibilitetsstandarder og bør således muliggjøre effektiv anvendelse av en formuleringssubstans som er ikke-toksisk, i det minste ved konsentrasjonene anvendt for infusjon.

10

En generell gjennomgang av eksipient-legemiddelinteraksjoner i parenterale formuleringer er tilveiebrakt Akers, MJ, in Journal of Pharmaceutical Sciences, 91, 2002, 2283-2300. Denne referansen tilveiebringer blant annet et avsnitt som gjelder bulkmidler og lyoprotektanter, som inkluderer disse forbindelsene i sammenheng med 15 lyofilisasjon.

Det er å forstå at metodologiene og formuleringene utviklet i sammenheng med foreliggende oppfinnelse er anvendbare for andre ecteinascidiner, i tillegg til ET-743.

20 Det er et formål med foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe stabile formuleringer av ecteinascidiner, og fremgangsmåter for fremstilling av slike formuleringer.

Det er et spesifikt formål med foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe en stabil formulering av ET-743. Spesielt er en formulering nødvendig som har bedre 25 lagringsstabilitet. Det er særlig et behov for å unngå dannelse av urenheter. Spesielt er det ønskelig å tilveiebringe utførelsesformer av formuleringer som i det vesentlige er uten ET-701.

Videre angår andre formål med foreliggende oppfinnelse å utvikle 30 fremstillingsmetodologier som muliggjør fremstilling av ET-743 formuleringer med ET-743 konsentrasjoner som er høyere enn de som oppnås ved vanlige metoder. Ytterligere formål angår utvikling av prosesser for å forbedre løseligheten av kjemiske bestanddeler som så komplekse som Et-743, som til slutt øker ET-743 konsentrasjonen i løsningen for lyofilisering og således reduserer fyllevolumet i medisinflasken før 35 lyofilisering av formuleringen.

Ifølge foreliggende oppfinnelse er det tilveiebrakt sammensetninger som omfatter et ecteinascidin og et disakkarid. Fortrinnsvis innbefatter sammensetningen ET-743 og et disakkarid. Foretrukne utførelsesformer av slike sammensetninger er farmasøytisk rene.

- 5 Noen utførelsesformer av slike sammensetninger blir tilveiebrakt ved lyofiliserte formuleringer som innbefatter et ecteinascidin slik som ET-743 og disakkarid.

Videre angir forliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for fremstilling av et beger som inneholder en lyofilisert formulering av et ecteinascidin kjennetegnet ved at den  
10 omfatter frysetørking av en bulkløsning som omfatter ecteinascidinet og et disakkarid.

Oppfinnelsen tilveiebringer en fremgangsmåte for å redusere dannelsen av ET-701 i en formulering av ET-743 kjennetegnet ved at den omfatter frysetørking av en bulkløsning som omfatter ET-743 og et disakkarid.

15

Oppfinnelsen tilveiebringer også en fremgangsmåte for fremstilling av en lyofilisert formulering ifølge oppfinnelsen, kjennetegnet ved at den omfatter oppløsning av et ecteinascidin i et surt medium, sammenblende det forhåndsoppløste ecteinascidinet med andre komponenter i bulkløsningen og eventuelt justere pH i den endelige løsningen.

20

Oppfinnelsen kan anvendes for mer effektivt å håndtere formuleringer av et ecteinascidin slik som ET-743, som inkluderer anvendelse i fremgangsmåter for fremstilling av høyere konsentrasjonsformuleringer og fremgangsmåter for å redusere fyllevolumet av et beger ved fremstilling av en lyofilisert formulering.

25

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også en fremgangsmåte for fremstilling av en løsning for intravenøs infusjon, kjennetegnet ved at den omfatter: å tilveiebringe en medisinflasje som omfatter lyofilisert ecteinascidin og et disakkarid, tilsette vann for å danne en rekonstituert løsning og fortynne nevnte rekonstituerte løsning med et vandig  
30 system.

Fremgangsmåten kan anvendes for å solubilisere komplekse kjemiske bestanddeler, slik som ecteinascidiner, som inkluderer, men er ikke begrenset til m ET-743. Slike fremgangsmåter muliggjør fremstilling av en mer konsentrert løsning av ET-743 i  
35 bulkløsning for lyofilisering, som fører til reduserte fyllevolumer. Det har blitt funnet i sammenheng med foreliggende oppfinnelse at disakkarider stabiliserer ecteinascidiner, som inkluderer ET-743, er komplekse kjemiske bestanddeler hvis oppførsel i

formuleringer ikke er predikerbar når det gjelder oppførsel til andre ikke-relaterte kjemiske substanser. Slik oppførsel er enda mer vanskelig å predikere når minst et ecteinascidin er inkludert som den aktive substansen i en formulering som skal tilfredsstillende biokompatibilitetsstandarder, som inkluderer medisinske standarder. Vi har videre funnet i denne sammenheng at anvendelse av disakkarider som bulkmidler kan dramatisk redusere dannelse av urenheter i løpet av lyofiliserings- og lagringsprosessen for ET-743 sammensetninger.

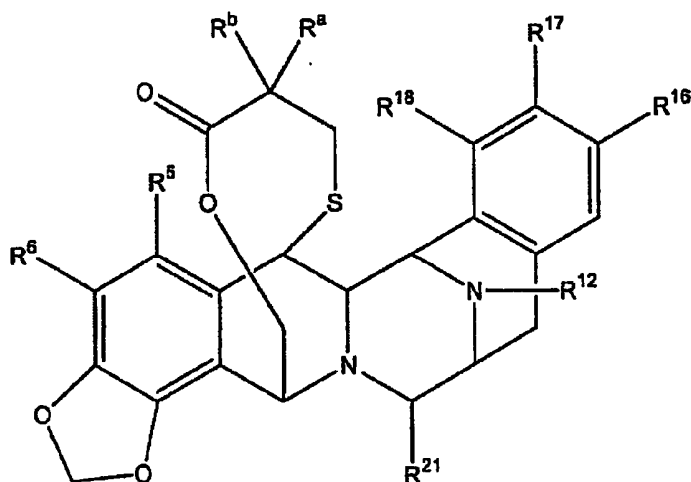
Ytterligere angår foreliggende oppfinnelsen anvendelse av en løsning fremstilt ifølge fremgangsmåten, for fremstilling av et medikament for behandling av kreft, hvori løsningen blir administrert ved intravenøs infusjon.

Når utførelsesformer ifølge oppfinnelsen er å tilveiebringe ET-743 formuleringer som idet vesentlige er uten andre ecteinascidiner slik som ET-701, eller i det minste med et innhold av ET-701 så lavt som mulig, da anses ET-701 som en urenheter hvis tilstedeværelse i formuleringen i det minste skal reduseres.

I tillegg forbedrer også anvendelse av disakkarider lagringsbetingelsene som muliggjør langtidslagring av den lyofiliserte formuleringen innenfor et bredt temperaturområde, som inkluderer kjøleskapbetingelser og romtemperatur. Begrepet "stabil", slik det anvendes heri, for eksempel uttrykket "en stabil Et-743 formulering", refererer til en formulering som tilfredsstillende stabilitetskarakteristikkene slik det er rapportert heri og ekvivalenter derav, det vil si, som ikke blir fremvist ved vanlige formuleringer og som ikke oppnås når formuleringen fremstilles ved vanlige fremstillingsmetodologier.

Eksempler på utførelsesformer ifølge oppfinnelsen er tilveiebrakt ved nye farmasøytisk akseptable sammensetninger som innbefatter et ecteinascidin slik som ET-743 og et disakkarid.

Slik det er angitt i innledningen har ecteinascidiner blitt inngående beskrevet. De kan ha følgende generelle formel (I):



hvor:

- R<sup>5</sup> er OH, alkoksy eller alkanoyloksy;
- R<sup>6</sup> er hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl eller aryl;
- 5 R<sup>12</sup> er hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl eller aryl;
- R<sup>16</sup> er hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl eller aryl;
- R<sup>17</sup> er OH, alkoksy eller alkanoyloksy;
- R<sup>18</sup> er OH, alkoksy eller alkanoyloksy;
- R<sup>21</sup> er OH, CN eller en annen nukleofilgruppe; og
- 10 R<sup>a</sup> er hydrogen og R<sup>b</sup> er eventuelt substituerte amino, eller  
R<sup>a</sup> med R<sup>b</sup> danner en karbonylfunksjo = O, eller  
R<sup>a</sup>, R<sup>b</sup> og karbonet til hvilket de er bundet danner en tetrahydroisokinolingruppe.

I disse forbindelsene kan substituentene velges i henhold til følgende retningslinjer:

15

- Alkyl og alkoksygrupper har foretrukket fra 1 til 12 karbonatomer. En mer foretrukket klasse alkyl og alkoksygruppe har fra 1 til ca. 6 karbonatomer, mest foretrukket 1, 2, 3, eller 4 karbonatomer. Metyl, etyl og propyl som inkluderer isopropyl er særlig foretrukne alkylgrupper i forbindelser ifølge oppfinnelsen. Metoksy, etoksy og
- 20 propoksy som inkluderer isopropoksy er særlig foretrukne alkylgrupper i forbindelsene ifølge oppfinnelsen. En annen mer foretrukket klasse av alkyl og alkoksygrupper har fra 4 til ca. 12 karbonatomer, ytterligere mer foretrukket fra 5 til ca. 8 karbonatomer og mest foretrukket 5, 6, 7 eller 8 karbonatomer. Slik det anvendes heri refererer begrepet alkyl, med mindre modifisert på annen måte, til både sykliske og ikke-sykliske grupper,
- 25 selv om sykliske grupper vil innbefatte minst 3 karbonringmedlemmer.

Foretrukne alkenyl og alkynylgrupper i forbindelsene ifølge oppfinnelsen har en eller flere umettede bindinger og fra 2 til ca. 12 karbonatomer. En mer foretrukket klasse alkenyl eller alkynylgruppe har fra 2 til ca. 6 karbonatomer og mest foretrukket 2, 3 eller 4 karbonatomer. En annen mer foretrukket klasse av alkenyl og alkynylgrupper har fra 4 til ca. 12 karbonatomer, ytterligere mer foretrukket fra 5 til ca. 8 karbonatomer, mest foretrukket 5, 6, 7 eller 8 karbonatomer. Begrepene alkenyl og alkynyl, slik det anvendes her, refererer til både sykliske og ikke-sykliske grupper.

Egnede arylgrupper i forbindelsen ifølge oppfinnelsen inkluderer enkle multiple ringforbindelser, inkluderer multiple ringforbindelser som inneholder separate og/eller sammensmeltede arylgrupper. Typiske arylgrupper inneholder fra 1 til 3 separate sammensmeltede ringer og fra 6 til ca. 18 karbonringatomer. Særlig foretrukne arylgrupper inkluderer substituert eller usubstituert fenyl, naftyl, bifenyl, fenantryl og antracyl.

Egnede alkanoyloksy og alkanoylgrupper har fra 2 til ca. 20 karbonatomer, mer foretrukket fra 2 til ca. 8 karbonatomer, ytterligere mer foretrukket fra 2 til ca. 6 karbonatomer, ennå mer foretrukket 2 karbonatomer. En annen foretrukket klasse alkanoyloksygrupper har fra 12 til ca. 20 karboner, ytterligere mer foretrukket fra 14 til ca. 18 karbonatomer og mest foretrukket 15, 16, 17 eller 18 karbonatomer.

Gruppene nevnt ovenfor kan være substituert i en eller flere tilgjengelige posisjoner med en eller flere egnede grupper slike som OR', =O, SR', SOR', SO<sub>2</sub>R', NO<sub>2</sub>, NHR', N(R')<sub>2</sub>, =N-R', NHCOR', B(COR)<sub>2</sub>, NHSO<sub>2</sub>R', CN, halogen, C(=O)R', CO<sub>2</sub>R', OC(=O)R', hvori hver R' gruppene er uavhengig valgt fra gruppen som består av H, OOH, NO<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>, SH, CN, halogen, =O, C(=O)H, C(=O)CH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub>H, substituerte eller usubstituert C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alkyl, substituert eller usubstituert C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alkenyl, substituert eller usubstituert C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> alkynyl og substituert eller usubstituert aryl. Egnede halogensubstituent forbindelser ifølge oppfinnelsen inkluderer F, Cl, Br og I.

Foretrukket er forbindelsene ifølge oppfinnelse de med generell formel (I) hvori en eller flere av følgende definisjoner vil gjelde:

- R<sup>5</sup> er et alkanyloksy;
- R<sup>6</sup> er metyl;
- R<sup>12</sup> er metyl;
- R<sup>16</sup> er metyl;
- R<sup>17</sup> er metoksy;

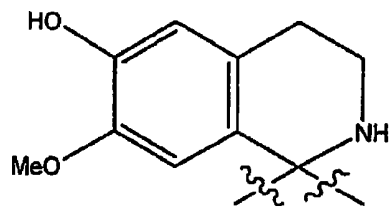
$R^{18}$  er OH;

$R^{21}$  er H, OH eller CN; og

$R^a$  er hydrogen og  $R^b$  er en amodogruppe, eller

$R^a$  med  $R^b$  danner =O, eller

- 5  $R^a$ ,  $R^b$  og karbonet til hvilket de er bundet danner en gruppe med formel (II):

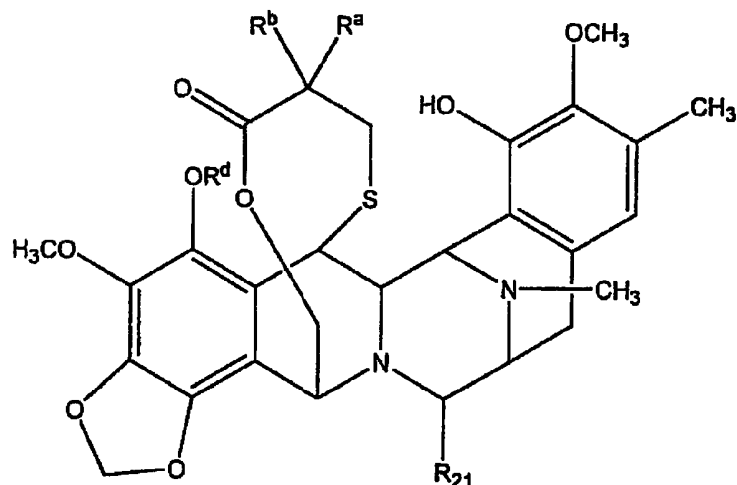


Eksempler på forbindelser ifølge oppfinnelsen inkluderer naturlige ecteinascidiner, slik som ecteinascidin 743 og andre 1,4 brodannede sammensmeltede

- 10 ecteinascidinforbindelser for eksempel beskrevet i US 5,089,273, US 5,478,932, US 5,654,426, US 5,721,362, US 6,124,293, US 5,149,804, US 09/546,877, US 5,985,876 og WO 01/77115.

Forbindelser med følgende formel (III) er særlig foretrukket:

15



hvor  $R^a$  og  $R^b$  er amido med formel  $-NHR^f$ , hvor  $R^f$  er alkanoyl, eller  $R^a$  og  $R^b$  danner =O, eller

$R^a$ ,  $R^b$  og karbonet til hvilket de er bundet danner en gruppe med formelen (II):

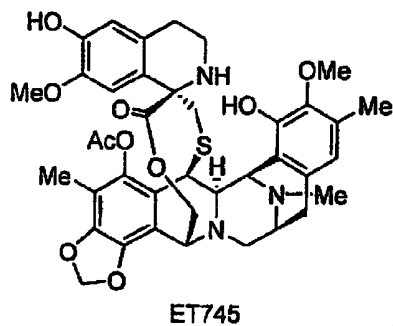
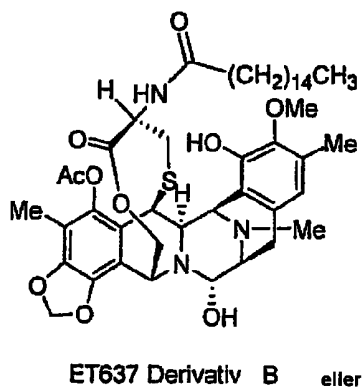
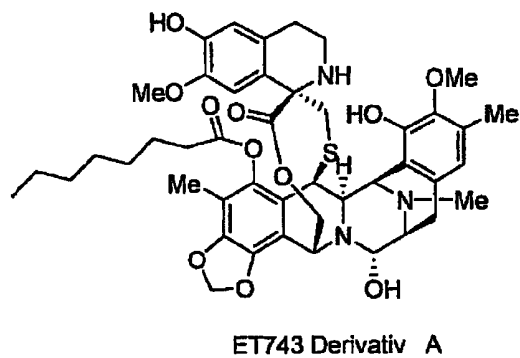
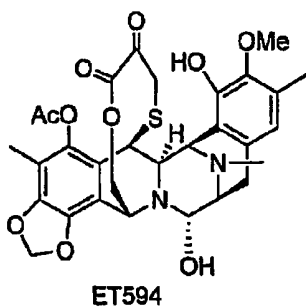
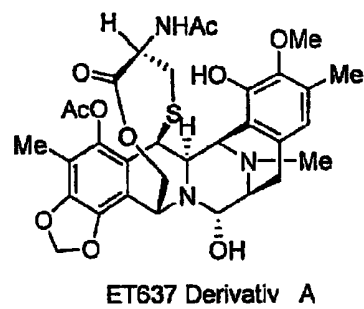
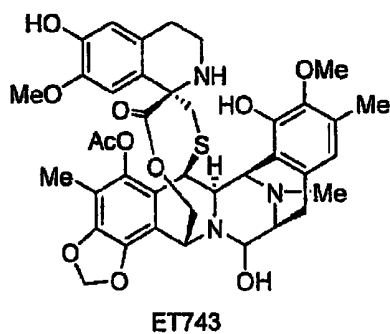
20

$R^d$  er alkanoyl; og

$R^{21}$  er H, OH eller CN.

Alkanoylgruppene kan være acetyl eller høyere, for eksempel opptil  $C_{20}$ .

5 Således inkluderer foretrukne forbindelser ifølge oppfinnelsen:



10 og relaterte forbindelser med forskjellige acylgrupper.

Ecteinascidin 743, også kjent som ET-743 eller ectenascidin 743 er særlig foretrukket.

Eksempler på egnede disakkarider for sammensetningene ifølge oppfinnelsen inkluderer laktose, trehalose, sukrose og kombinasjoner derav. Ytterligere eksempler på  
 5 disakkarider som kan anvendes i noen utførelsesformer ifølge oppfinnelsen inkluderer minst en av maltose, isomaltose, cellobiose, isosaccharose, isotrehalose, sorbose, turanose, melibiose, gentiobiose og blandinger derav. Sukrose er særlig foretrukket.

I en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen innbefatter sammensetningen et  
 10 ecteinascidin slik som ET-743 og et laktosefritt disakkarid. I andre utførelsesformer ifølge oppfinnelsen innbefatter sammensetningen et ecteinascidin slik som ET-743 og et trahalosefritt disakkarid. I en andre utførelsesformer ifølge oppfinnelsen innbefatter sammensetningene et ecteinascidin slik som ET-743 og et sukrosefritt disakkarid. I andre  
 15 utførelsesformer ifølge oppfinnelsen innbefatter sammensetningen et ecteinascidin slik som ET-743 og et maltosefritt disakkarid. I andre utførelsesformer ifølge oppfinnelsen innbefatter sammensetningen et ecteinascidin slik som ET-743 og et isomaltosefritt disakkarid. I andre utførelsesformer ifølge oppfinnelsen innbefatter sammensetningen et ecteinascidin slik som ET-743 og et cellobiosefritt disacchard. I andre utførelsesformer ifølge oppfinnelsen innbefatter sammensetningen et ecteinascidin slik som ET-743 og et  
 20 isosaccharosefritt disakkarid. I andre utførelsesformer ifølge oppfinnelsen innbefatter sammensetning et ecteinascidin slik som ET-743 og et isotrehalosefritt disakkarid. I andre utførelsesformer ifølge oppfinnelsen innbefatter sammensetningen et ecteinascidin slik som ET-743 og et sorbosefritt disakkarid. I andre utførelsesformer ifølge oppfinnelsen innbefatter sammensetningen et ecteinascidin slik som ET-743 og et  
 25 turanosefritt disakkarid. I andre utførelsesformer ifølge oppfinnelsen innbefatter sammensetningen et ecteinascidin slik som ET-743 og et melibiosefritt disacchard. I andre utførelsesformer ifølge oppfinnelsen innbefatter sammensetningen et ecteinascidin slik som ET-743 og et gentiobiosefritt disakkarid.

30 Således, i noen utførelsesformer, inneholder sammensetningen ifølge oppfinnelsen mindre enn 2% eller mindre enn 1% eller mindre enn 0,5% eller mindre 0,2% eller mindre enn 0,1% i forhold til vekt av minst en av, foretrukket hver av, laktose, trehalose, sukrose, maltose, isomaltose, cellobiose, isosaccharose, isotrehalose, sorbose, turanose, melibiose og gentiobiose.

35

Begrepene "blandinger derav" og "kombinasjoner derav" slik det anvendes heri refererer til minst to bestanddeler som tilveiebringer den forutsettende basisen for

begrepene "blandinger derav" eller "kombinasjoner derav". Som illustrasjon, men ikke som noen begrensning, refererer begrepene "produkt som innbefatter minst en av A, B, C og blandinger derav" til utførelsesformer av produktet hvorved en hvilken som helst av følgende er tilfredsstilt: A er i produktet; B er i produktet; C er i produktet; A og B er i produktet; C er i produktet; B og C er i produktet; og A, B og C er i produktet.

Videre er det å forstå at begrep slike som "omsetning", "dannelse av" relaterte begreper gjelder for en kjemisk bestanddel heri refererer til en hvilken som helst av: (a) den kjemiske bestanddelen som sådan og (b) den kjemiske bestanddelen i en form hvori slik bestanddel er til stede i reaksjonsmediet. Analogt, for å navne en kjemisk bestanddel eller for å oppgi dens formel i sammenheng med en operasjon eller reaksjonstrinn, eller for å navngi den eller for å gi dens formel som værende i et medium, om det er fast eller flytende, som inkluderer produkter, formuleringer og kombinasjoner, refererer heri til en hvilken som helst av (a) bestanddelen som sådan og (b) bestanddelen i formen hvori slik bestanddel er til stede i mediet. For eksempel refererer navngivelse av en sur kjemisk bestanddel heri til en hvilken som helst form eller former som slike bestanddeler til stede i, i sammenheng hvori den er navngitt. Som illustrasjon, men ikke som noen begrensning, refererer navngivningen av den kjemiske bestanddelen "natriumklorid" eller angivelse av den kjemiske formel heri til bestanddelen NaCl som et slikt diatommolekyl, hvis slik er formen hvori natriumklorid er til stede i det relevante mediumet; den refererer også til samling av ikke-disosierte og/eller disosierte kjemiske bestanddeler hvis natriumklorid i relevant medium er helt eller delvis dissosiert, som inkluderer bestanddeler i slikt medium som er solvatisert, del av skjelett, assosiert med andre bestanddeler, etc.

En hvilken som helst forbindelse referert til heri er tiltenkt å representere en slik forbindelse så vel som visse variasjoner eller former. Spesielt kan forbindelser referert til heri ha asymmetriske sentre og derfor eksistere i forskjellige enantiomerte former. Alle optiske isomerer og stereoisomerer av forbindelsene referert til heri, og blandinger herav, anses å være innenfor omfanget av formuleringene og metodologiene ifølge oppfinnelsen. Således er en hvilken som helst gitt forbindelse referert til heri tiltenkt å representere et hvilket som helst av et racemat, en eller flere enantiomere former, en eller flere diastereometriske former, en eller flere atropisomere former og blandinger derav.

Videre kan forbindelser referert til heri eksistere som geometriske isomerer (dvs. cis og transisomerer) som tautomerer eller som atropisomerer. I tillegg er en hvilken som helst

forbindelse referert til heri tiltenkt å representerer hydrater, solvater og polymorfer, og blandinger derav, når slike former eksisterer i mediet. I tillegg kan forbindelser referert til heri eksistere i isotopmerkede former. Alle geometriske isomerer, tautomerer, atropisomerer, hydrater, solvater, polymorfer og isotopmerkede former av forbindelsene referert til heri, og blandinger derav, anses å være innenfor omfanget av formuleringene og metodologiene ifølge oppfinnelsen.

For å tilveiebringe en mer preisis beskrivelse er noen av de kvantitative uttrykkene gitt heri kvalifisert med begrepet "cirka". Det er å forstå at, om begrepet "cirka" anvendes eksplisitt eller ikke, er hver mengde gitt heri ment å referere til den verdien som virkelig er gitt og den er også ment å referere til tilnærminger av den gitte verdien som vil rimeligvis kunne avledes basert på fagmannens kunnskap, som inkluderer ekvivalenter og tilnærminger på grunn av eksperimentelle og/eller målebetingelser for en slik gitt verdi.

Den aktive substansen eller substansene i sammenheng med foreliggende oppfinnelse kan være av naturlige, delvis syntetisk eller syntetisk opprinnelse, som inkluderer kombinasjoner av opprinnelser. I utførelsesformer hvor den aktive substansen er et ecteinascidin slik som ET-743, kan ET-743 være av naturlig opprinnelse, isolert fra et tunikat fra slekten genus Ecteinascidia, foretrukket arten Ecteinascidia turbinata. ET-743 kan være av syntetisk eller delvis syntetisk opprinnelse. Foretrukket er for eksempel WO 069862 og WO 0187895, hvor begge disse er innbefattet med referanse i sin helhet.

Forholdet mellom den aktive substansen og bulkmidlet i utførelsesformene ifølge oppfinnelsen bestemmes i henhold til løseligheten til bulkmidlet, og, når formuleringen er frysetørket, også i henhold til frysetørkbarheten av bulkmidlet. Det er å forstå at dette forholdet (vekt/vekt) kan være ca. 1:1 i noen utførelsesformer, ca. 1:5 i andre utførelsesformer, ca. 1:10 i ytterligere andre utførelsesformer, mens andre utførelsesformer illustrerer forhold i området fra ca. 1:10 til ca. 1:1. Det er å forstå at andre utførelsesformer har slike forholdet i området fra ca. 1:10 til ca. 1:100, og ytterligere andre utførelsesformer har slike forhold som i området fra ca. 1:100 til ca. 1:1500. Når den aktive forbindelsen er ET-743 er forholdet (vekt/vekt) av ET-743 i forhold til bulkmiddel typisk fra ca. 1:100 til ca. 1:1500, foretrukket fra 1:200 til ca. 1:800, mer foretrukket fra ca. 1:250 til ca. 1:600 og enda mer fortrukket ca 1:400.

Det lyofiliserte materialet er vanligvis presentert i en medisinflaske som inneholder en spesifisert mengde av ecteinascidin eller aktiv forbindelse. Når den aktive forbindelsen er ET-743 er de aktive mengdene illustrert ved 250 µg og 1 mg.

- 5 Foreliggende oppfinnelse er ikke begrenset av de spesifikke beholderformene eller designet, så lenge beholderen er akseptabel for tiltenkt anvendelse og standarder for dette. Utførelsesformer ifølge oppfinnelsen er tilveiebrakt med en formulering innbefattet i en medisinflaske, foretrukket en rørmedisinflaske.
- 10 De lyofiliserte formuleringene ifølge oppfinnelsen kan rekonstitusjoneres og fortynnes for å gi en sammensetning ifølge oppfinnelsen i form av en løsning klar for intravenøs injeksjon. De virkelige mengdene av fluid for rekonstitusjon er ikke begrensende trekk ved utførelsesformer ifølge oppfinnelsen. Som illustrasjon, men som ikke begrensnings, blir utførelsesform av lyofiliserte formuleringer ifølge oppfinnelsen rekonstitusjonert
- 15 med et vannvolum. De fleste slike volumene overskrider ikke 20 ml, mer foretrukne volumer værende i området fra ca. 1 ml til ca. 15 ml, mer foretrukket i området fra ca. 1 ml til ca. 10 ml, enda mer foretrukket i området fra ca. 1 ml til ca. 4 ml. Når den aktive substansen omfatter ET-743, inneholder den rekonstitusjonerte løsningen i slike utførelsesformer en konsentrasjon av ET-743 opptil 500 µg/ml, med konsentrasjoner på
- 20 ca. 50 µg/ml, ca. 100 µg/ml og ca. 250 µg/ml som foretrukket.

Rekonstitusjonerte utførelsesformer ifølge oppfinnelsen kan ytterligere fortynnes, hvis ønskelig, hvor denne ytterligere fortynningen ikke er begrensende for oppfinnelsen. Denne ytterligere fortynningen blir foretrukket utført med et vandig system som

25 vanligvis er 0,9% natriumklorid eller 5% glukose. Rekonstitusjonsløsningen vil fortynnes avhengig av konsentrasjonen i den rekonstitusjonerte løsningen og den ønskede konsentrasjonen i den fortynnete løsningen.

Utførelsesformer av ET-743 formuleringer ifølge oppfinnelsen kan anvendes ved

30 behandling av et antall kreftformer, som inkluderer behandling av en hvilken som helst av sarkom, leiomyosarkom, liposarkom, osteosarkom, eggstokkreft, brystkreft, melanom, kolorektal kreft, mesoteliom, renalkreft, endometrial kreft og lungekreft, g tilstander med et antall slike kreftformer. Det er å forstå at "behandling" i denne sammenheng refererer til virkningen som fører til en lindring av krefttilstandene.

35 Utførelsesformer av ET-743 formuleringer ifølge oppfinnelsen kan også anvendes ved behandling av gjenstridige krefttilstander som ikke har respondert fordelaktig på andre behandlinger. Videre kan utførelsesformer av formuleringene ifølge oppfinnelsen

anvendes i forsøk med laboratorieev, som inkluderer, men er ikke begrenset til, kliniske forsøk, analytiske forsøk og modelleringsundersøkelser.

Utførelsesformer ifølge oppfinnelsen som innbefatter et ecteinascidin slik som ET-743  
5 blir foretrukket administrert ved infusjon. Infusjonstrinnet blir typisk gjentatt på syklisk basis, som kan gjentas hvis hensiktsmessig over f.eks. i 1 til 20 sykler. Syklen inkluderer en fase med infusjon av ET-743 formuleringene og vanligvis også en fase uten infusjon av ET-743. Typisk utføres denne syklen i løpet av uker, og således  
10 innbefatter syklen normalt en eller flere uker med en ET-743 infusjonsfase og en eller flere uker for fullstendig sykkel. En sykkel på 3 uker er foretrukket, men alternativt kan den være fra 1 til 6 uker. Infusjonsfasen kan i seg selv være en enkel administrasjon i hver sykkel på 1 til 72 timer, mer vanlig ca. 1, 3 eller 24 timer; eller en infusjon på daglig basis i infusjonsfasen i syklen i foretrukket 1 til 5 timer, særlig 1 til 3 timer; eller en infusjon på ukebasis i infusjonsfasen av syklen i foretrukket 1 til 3 timer. Særlig 2 eller  
15 3 timer. En enkel administrasjon ved starten av hver sykkel er foretrukket. Foretrukket er infusjonstiden ca. 1, 3 eller 24 timer.

De rekonstitusjonerte eller fortynnede løsningene eksemplifiserer utførelsesformer av oppfinnelsen. En formulering som rekonstitusjoneres og fortynnes kan administreres  
20 intravenøst ved anvendelse av tilgjengelige protokoller. Dosen vil velges i henhold til doseringsprotkollen, men hensyn til eksisterende data når det gjelder dosebegrensede toksisitet, som for eksempel fremgår av WO 0069441, WO 0236135 og WO 0339571, og van Kesteren, Ch. et al., 2003, Anti-Cancer Drugs, 14 (7) 487-502. Disse tre WO patentbeskrivelsene og denne van Kesteren artikkelen er innfattet heri med referanse.

25

Foretrukne doseringsprotokoller inkluderer:

- a) ca. 1,5 mg/m<sup>2</sup> kroppsoverflateareal, administrert som en intravenøs infusjon i løpet av 24 timer med et tre ukers intervall mellom syklene;
- b) ca. 1,3 mg/m<sup>2</sup> kroppsoverflateareal, administrert som en intravenøs infusjon i  
30 løpet av 3 timer med et tre ukers intervall mellom syklene;
- c) ca. 0,580 mg/m<sup>2</sup> kroppsoverflateareal, administrert ukentlig som en intravenøs infusjon over 3 timer i løpet av tre uker og en uke hvile.

Et ecteinascidin slik som ET-743 kan anvendes i kombinasjon med andre legemidler.  
35 For eksempel kan den administreres med et antitumorlegemiddel. Leseren refereres i den sammenheng til listen i WO 0069441 og WO 0236135, hvor begge disse er innbefattet heri med referanse. Eksempler på slike andre legemidler inkluderer

dokorubicin, cisplatin, paclitaxel, karboplatin, pegylert liposomal doxorubicin, docetaxel, capecitabin og gemcitabin. Legemidler med annen virkningsmåte kan anvendes, som inkluderer deksametason. Administrasjon av annet legemiddel kan skje før, i løpet av eller etter administrasjon av ectenascidin slik som ET-743.

5

Utførelsesformer av formuleringer ifølge oppfinnelsen som inneholder et ectenascidin slik som ET-743 kan fremstilles ved frysetørring av en sammensetning ifølge oppfinnelsen i form av en bufferløsning som inkluderer ectenascidinet og disakkaridet. Vanligvis vil bulkløsningen bufres, for eksempel til en pH på ca. 4. Egnede

10 buffermidler inkluderer fosfatbuffer og citratbuffer. Andre mulige buffere kan anvendes, slik som fosfat/citratbuffer (en blanding av fosfatbuffer og citratbuffer), laktatbuffer, askorbatbuffer, vinsyre/sitronsyrebuffer, bikarbonat/saltsyrebuffer, acetatbuffer, suksinatbuffer og glysin/saltsyrebuffer. Blandinger av buffere kan anvendes. Biokompatible buffere som muliggjør kontroll av pH til en ønsket verdi gir  
15 ytterligere utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse.

Andre komponenter kan inkluderes i bufferløsningen, for eksempel overflateaktive midler slik som polyoksyetylen 20 sorbitan monooleat eller polyoksy 40 stearat. Andre mulige overflateaktive midler inkluderer fosfolipider, slik som lecitin; polyoksyetylen-  
20 polyoksypropylen kopolymerer, slik som pluron surfaktant; polyoksyetylen estere av 12 hydroksystearinsyre, slik som et solutol surfaktant; etoksylater av kolesterol, slik som diacyl glyserol, dialkyl glyserol; gallsalter, slik som natriumkolas, natrium deoksykolas, sukrose estere, slik som sukrose monolaurat, sukrose monooleat; polyvinyl pyrrolidon (PVP); eller polyvinyl alkohol (PVA).

25

Formuleringen blir vanligvis levert som en medisinflaske som inneholder lyofiliserte produkter. Denne leveringsformer er imidlertid ingen begrensning på foreliggende oppfinnelse. For å tilveiebringe en medisinflaske som inneholder et lyofilisert produkt blir bulkløsningen tilsatt til begeret og frysetørket. Slik det nevnes heri er et annet  
30 formål med foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe en fremgangsmåte for å forbedre løseligheten av et ectenascidin slik som ET-743 for å øke ectenascidinkonsentrasjonen i løsningen og redusere fyllevolumet i medisinflaskene før man fortsetter med lyofiliseringsprosessen. Denne metodologien utviklet i sammenheng med foreliggende oppfinnelse muliggjør fremstilling av utførelsesformer av bulkløsning med aktiv  
35 substanskonsentrasjon som er høyere enn den som oppnås i henhold til vanlige metodologier. Reduserte fyllevolumer sammenliknet med vanlig formulering med mannitol blir derfor oppnådd i henhold til foreliggende metodologi. Denne reduksjon av

fyllevolumer muliggjør besparelser i tid og energi i løpet av frysetørkettrinnet. I tillegg er det også en reduksjon i risiko for nedbryting av ET-743, særlig i den andre tørkingen.

Slik det er angitt ovenfor har ET-743 begrenset vandig løselighet, se for eksempel van  
5 Kesteren, Ch., et al., *Anti-Cancer Drugs*, 14 (7), side 487-502. Vanlige metodotolger  
gir justering av medium pH til 4 med buffer, for å solubilisere ET-734. Denne pH  
kontrollen blir hensiktsmessig oppnådd med en 0,05 M fosfatbuffer til pH 4. Det ble  
funnet sammenheng med foreliggende oppfinnelse at ET-743 løseligheten forbedres i  
bulkløsning ved dannelse av en forhåndsløsning av ET-743 i en syre. Med denne  
10 forhåndsopløsningen kan ET-743 konsentrasjonen i bulkløsning og medisinflasker  
økes og fyllevolumet i medisinflaskene kan reduseres. I disse utførelsesformene ifølge  
oppfinnelsen blir fyllevolumet vanligvis redusert med ca. 80% med hensyn til vanlige  
fyllevolum. Som illustrasjon, men ikke som noen begrensning, gir utførelsesformer  
ifølge oppfinnelsen et fyllevolum på 1 ml for medisinflasken som inneholder 0,25 mg  
15 ET-743 og 4 ml for en medisinflasker som inneholder 1 mg ET-743. Fyllevolumet kan  
eventuelt reduseres ytterligere i andre utførelsesformer ifølge oppfinnelsen ved å øke  
ET-743 konsentrasjonen.

Vanlig metodologi bestående av oppløsning av ET-743, mannitol og 0,05 M  
20 fosfatbuffer til pH 4 sammen med vann for injeksjon gjør at løseligheten av  
bulkløsningen begrenses på grunn av den lave løseligheten av ET-743 i dette mediet.  
Det ble funnet i sammenheng med foreliggende oppfinnelse at forhåndsbehandling av  
ET-743 i en syreløsning forbedrer ET-743 løseligheten og muliggjør bulkløsninger med  
høyere konsentrasjoner av ET-743. Således tilveiebringer foreliggende oppfinnelse  
25 fremgangsmåte anvendelig for å forbedre løseligheten av ET-743 i bulkløsning som  
innbefatter oppløsning av ET-743 i et surt medium, sammenblanding av mediet med  
ET-743 med andre komponenter i bulkløsningen og eventuelt justere pH. I noen  
illustrative, men ikke begrensede utførelsesformer av oppfinnelsen blir pH justering  
oppnådd med en fosfatbuffer. Det sure mediet inneholder egnet ingen eller vesentlig  
30 ingen bufferkomponenter, og består vanligvis av vandig syre.

Illustrative utførelsesformer av bulkløsningen for frysetørking ifølge oppfinnelsen blir  
tilveiebrakt ved en løsning av ET-743 bufret til pH 4 med kalium dihydrogenfosfat og  
fosforsyre med sukrose som bulkmiddel.

35

En illustrativ utførelsesform av metodologien ifølge oppfinnelsen tilveiebringer  
følgende: ET-743 løst i 0,1 N fosforsyre. Deretter blir vann for injeksjon ("WFI"),

kalium dihydrogenfosfat, sukrose og ET-743 (forhåndsoppløst i 0,1 N fosforsyre) blandet sammen. Oppløsningen blir visuelt sjekket før fortsetting og oppløsning anses fullstendig ved visuell kontroll. pH til løsningen sjekkes og justeres til en verdi i området fra ca. 1 til ca. 5, mer foretrukket i området fra ca. 2 til 4,5, enda mer foretrukket i området fra ca. 3 til ca. 4,5, mest foretrukket en pH på ca. 4,0, ved sakte tilsetning av en passende syre. En foretrukket utførelsesform av denne syren er fosforsyre, i hvilket tilfelle en foretrukket konsentrasjon er ca. 0,1 N. En passende base blir eventuelt tilsatt for pH kontroll. En foretrukket utførelsesform av en slik base er kaliumhydroksid, foretrukket i løsning, i hvilket tilfelle en foretrukket konsentrasjon er ca. 0,1 N. Volumet blir endelig justert ved tilsetning av et passende bikompatibelt fluid, fortrukket WFI. Bulkløsningen blir deretter fylt i medisinflasker i henhold til den ønskede dosen.

Frysetørkingen utføres i noen utførelsesformer ifølge oppfinnelsen ved anvendelse av reduserte sekundære tørketider. En foretrukket protokoll involverer avkjøling til en temperatur på ca.  $-40^{\circ}\text{C}$ , primærtørking ved 40 til 80  $\mu\text{bar}$  i 10 til 50 timer og sekundærtørking ved et lavere trykk og ved over  $0^{\circ}\text{C}$  i 10 til 50 timer. I andre protokoller i sammenheng med foreliggende oppfinnelse er kjøling til temperaturer under  $-40^{\circ}\text{C}$  foretrukket.

Utførelsesformer ifølge oppfinnelsen innbefatter lyofilisasjon ved avkjøling av produktet til under  $-40^{\circ}\text{C}$ . Den primære tørkingen utføres ved en temperatur på fra ca.  $-20^{\circ}\text{C}$  til ca.  $26^{\circ}\text{C}$  og ved et trykk på ca. 60  $\mu\text{bar}$  i ca. 15 til 40 timer. Den sekundære tørkingen utføres ved en temperatur på fra ca.  $20^{\circ}\text{C}$  til ca.  $30^{\circ}\text{C}$  og ved trykk på ca. 100  $\mu\text{bar}$  i ca. 20 til 40 timer.

Utførelsesformer av lyofiliserte formuleringer ifølge oppfinnelsen er egnet for lagring ved temperaturer signifikant høyere enn vanlige formuleringslagringstemperaturer. Eksempler på lagringstemperaturer for formuleringer ifølge oppfinnelsen er rundt  $+5^{\circ}\text{C}$ . Disse temperaturene blir lett oppnådd ved vanlige kjøleskap.

Figur 1. Sammenliknende stabilitetsstudie. ET-743 renhetsevaluering etter 6 måneders lagring ved  $5^{\circ}\text{C}$ .

Figur 2. Sammenliknende stabilitetsstudie. ET-743 renhetsevaluering etter 12 måneder ved  $5^{\circ}\text{C}$ .

Figur 3. ET-701 renhetsproduksjon i forskjellige formuleringer lagret i 9 måneder ved 5°C.

Figur 4. Sammenliknende ET-743 % renhetsutvikling av de nye formuleringene og 3  
5 batcher av referanseformulering, lagret i 3 måneder ved 5°C.

Figur 5. ET-701 urenhetsproduksjon i forskjellige formuleringer lagret i 3 måneder ved 5°C.

10 Figur 6. Sammenliknende ET-743 % renhetsutvikling for de nye formuleringene og 3 batcher referanseformulering, lagret i 3 måneder ved 25°C/65% RH.

Figur 7. ET-701 urenhetsproduksjon i forskjellige formuleringer, lagret i 3 måneder ved 25°C/65% RH.

15 Figur 8. Sammenliknende ET-743 % renhetsutvikling av de nye formuleringene lagret ved 40°C/70% RH i 3 måneder.

Figur 9. Sammenliknende ET-743 % renhetsutvikling av de nye formuleringene lagret  
20 ved 40°C/70% RH i 3 måneder.

## EKSEMPLER

### Eksempel 1

25 Dette eksemplet beskriver en sammenliknende stabilitetsstudie av 8 nye formuleringer med den vanlige ET-743 formuleringen (med mannitol). Laktose og sukrose ble anvendt for å illustrere foreliggende oppfinnelse. En referanseformulering ble utført ved anvendelse av mannitol. Andre kjente bulkmidler slike som dekstran (dekstran 40) og providon (kollidon 12, PVP) ble prøvd for sammenlikning. Overflateaktive midler  
30 polyoksyyl 40 stearat (Myrj 45) eller polyoksyetylen 20 sorbitan monooleate (polysorbat 80) ble anvendt i noen formuleringer, og buffer ble utelatt i noen formuleringer.

Bulkløsninger ble fremstilt ved frysetørking ved en standardisert fremgangsmåte. Et volum på 150 ml av hver formulering ble fremstilt.

35 Mengden kaliumfosfat i den endelige løsningen (1,02 g) ble innveid og løst i 90% sluttvolum (135 ml) vann. Deretter ble pH justert til pH 4,0 med 0,1 N fosforsyre.

7,85 mg ET-743 ble tilsatt til et sammenblandingsglasskar og løst opp ved magnetisk røring i 2/3 volum (90 ml) av kaliumfosfatløsningen i ca. 1 time (oppløsning ble sjekket visuelt).

- 5 Mengden bulkmiddel og surfaktant ble tilsatt og løst opp i 1/3 volum av kaliumfosfatløsningen. Dette ble løsning tilsatt til ET-743 løsningen og røring opprettholdt i en ytterligere time.

- 10 Løsningen ble brakt til en sluttvekt med vann (en tetthet på  $1,019 \text{ g/cm}^3$  ble tilpasset for alle formuleringer). Løsningen ble filtrert gjennom et  $0,22 \text{ }\mu\text{m}$  cellulosefilter. Løsningen ble fylt i 25 ml glassmedisinflasker ved 5 ml/medisinflaske og holdt ved  $-20^\circ\text{C}$  til lyofiliseringsprosessen. Lyofilisering ble utført i henhold til følgende tabell I:

Tabell 1

|                                    |          |
|------------------------------------|----------|
| Frysetid til $-48^\circ\text{C}$ : | 4 timer  |
| Primær tørking:                    | 48 timer |
| Sekundær tørking:                  | 44 timer |

15

Etter frysetørking ble begrene forsegle. Begrene ble overført til et fryseområde ( $-20^\circ\text{C}$ ).

Sammensetningen for hvert beger var som følger (tabell 2), bemerk at vann fordamper i løpet av frysetørkingsprosedyren.

Tabell II

|                          | Referanse   | Sukrose     | Dekstran    | PVP         | Laktose     |
|--------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| ET-743                   | 0,250 mg    | 0,250 mg    | 0,250 mg    | 0,250 mg    | 0,250 mg    |
| Mannitol                 | 250 mg      |             |             |             |             |
| Sukrose                  |             | 500 mg      |             |             |             |
| Dekstran 40              |             |             | 500 mg      |             |             |
| Kollidon 12              |             |             |             | 375 mg      |             |
| Laktose                  |             |             |             |             | 500 mg      |
| Kalium dihydrogen Fosfat | 34 mg       | 34 mg       | 34 mg       | 34 mg       | 34 mg       |
| Fosforsyre               | q.s. pH 4,0 | q.s. pH 4,0 | q.s. pH 4,0 | q.s. pH 4,0 | q.s. pH 4,0 |
| Vann for injeksjon       | q.s. 5 ml   | q.s. 5 ml   | q.s. 5 ml   | q.s. 5 ml   | q.s. 5 ml   |

## 5 Tabell II (fortsetter)

|                         | ET-poly80  | ET-myrij   | ET-poly80sacc | ET-p8-saccunbuffer |
|-------------------------|------------|------------|---------------|--------------------|
| ET-743                  | 0,250 mg   | 0,250 mg   | 0,250 mg      | 0,250 mg           |
| Mannitol                | 250 mg     |            |               |                    |
| Sukrose                 |            |            | 500 mg        | 500 mg             |
| Polysorbat 80           | 50 mg      |            | 50 mg         | 50 mg              |
| Myrij 45                |            | 50 mg      |               |                    |
| Kalium dihydrogenfosfat | 34 mg      | 34 mg      | 34 mg         |                    |
| Fosforsyre              | q.s. pH 40 | q.s. pH 40 | q.s. pH 40    |                    |
| Vann for injeksjon      | q.s. 5 ml  | q.s. 5 ml  | q.s. 5 ml     | q.s. 5 ml          |

Stabilitetstesting ble utført ved en temperatur på  $5 \pm 3^\circ\text{C}$ .

10

Renhetsevalueringen av ni formuleringer ved  $5^\circ\text{C}$  i løpet av 3 måneder er vist i tabell III og figur 1. I tilfelle formuleringer som viser en høyere stabilitet (referanse, sukrose, Laktose og ET-poly80sacc) ble stabilitetstesting forlenget til 9 måneder, og i tilfelle laktose og sukroseformuleringene ble stabilitetstesting forlenget til 12 måneder på grunn av deres høye stabilitet. Data i tabell II og figur viser at formuleringer som inneholder sukrose og laktose viser en forbedret stabilitet med en renhetsreduksjon på kun 2%. Denne reduksjonen er signifikant lavere enn reduksjonen som observeres i de andre undersøkte formuleringene.

15

Tabell III

ET-643 renhet (%)

|                   | Referanse | Sukrose | Laktose | ET-poly80sacc |
|-------------------|-----------|---------|---------|---------------|
| Før frysetørrking | 98,04     | 98,34   | 98,06   | 97,96         |
| t = 0             | 97,67     | 98,15   | 97,21   | 97,85         |
| 1 måned           | 96,06     | 96,89   | 96,35   | 97,72         |
| 3 måneder         | 94,37     | 96,64   | 95,33   | 97,58         |
| 6 måneder         | 92,81     | 97,01   | 94,07   | 95,98         |
| 9 måneder         | 88,17     | 95,36   | 94,83   | 96,01         |
| 12 måneder        |           | 96,31   | 95,22   |               |

5

Tabell III (fortsetter)

ET-643 renhet (%)

|                   | Dekstran | Laktose | Et-poly 80 | ET-myri | ET-80saccunbuffer |
|-------------------|----------|---------|------------|---------|-------------------|
| Før frysetørrking | 96,18    | 97,62   | 96,45      | 97,96   | 97,45             |
| t = 0             | 94,64    | 93,72   | 92,46      | 96,36   | 95,80             |
| 1 måned           | 93,42    | 91,96   | 89,38      | 94,36   | 91,84             |
| 3 måneder         | 84,90    | 90,40   | 81,18      | 85,31   | 88,46             |

10

Som vist i tabell IV og figur 3 ble hovednedbrytingsproduktet til referanseformuleringen, ET-701, dramatisk redusert når ET-743 ble formulert under nærvær av sukrose eller laktose.

Tabell IV

15

ET-701 (%)

|           | Referanse | Sukrose | Laktose | ET-poly80sacc |
|-----------|-----------|---------|---------|---------------|
| t = 0     | 0,188     | 0,066   | 0,060   | 0,050         |
| 1 måned   | 0,533     | 0,063   | 0,076   | 0,060         |
| 3 måneder | 0,890     | 0,057   | 0,054   | 0,050         |
| 6 måneder | 1,732     | 0,050   | 0,062   | 0,050         |
| 9 måneder | 3,225     | 0,050   | 0,050   | 0,050         |

Det ble funnet i sammenheng med foreliggende oppfinnelse at disakkarider forbedrer stabiliteten til ET-743 sammenliknet med mannitol. Utførelsesformer av slike disakkarider inkluderer laktosen, sukrose og blandinger derav. Stabiliteten til

20

formuleringene som innbefatter disakkarider blir også forbedret sammenliknet med andre formuleringer som inneholder andre vanlige bulkmidler slike som dekstran og povidon. Utførelsesformer av disakkaridformuleringene ifølge oppfinnelsen ble bestemt å være stabile i minst 12 måneder ved 5°C. Utførelsesformer av formuleringer ifølge oppfinnelsen hadde et urenhetsinnhold som ble signifikant redusert i forhold til vanlige formuleringer. Tilstedeværelsen av ET-701 blir i hnehold til dette redusert. Utførelsesformer ifølge oppfinnelsen innbefatter minst et overflateaktivt middel, slik som polysorbat 8. Disse utførelsesformene fremviser fordelaktige ET-743 løselighetsegenskaper og stabiliseringskarakteristikker. Tilstedeværelse av minst et overflateaktivt middel er imidlertid ikke et begrensende trekk ved foreliggende oppfinnelse, og andre utførelsesformer innbefatter ikke slike midler.

#### Eksempel 2

Formålet med denne studien var å sammenlikne stabiliteten til standardformulering av ET-743 med fire nye formuleringer. Denne studien evaluerer stabiliteten til formuleringene ved +5°C.

Sammensetningen av de testede formuleringene var følgende:

Tabell V

|                                | Referanse   | ETtreal     | ETP80treal<br>250 | ETP80treal<br>250 | ETP80tsacc<br>trealgly<br>250 | ETP80       |
|--------------------------------|-------------|-------------|-------------------|-------------------|-------------------------------|-------------|
| ET-743                         | 0,250 mg    | 0,250 mg    | 0,250 mg          | 0,250 mg          | 0,250 mg                      | 0,250 mg    |
| Mannitol                       | 250 mg      |             |                   |                   |                               |             |
| Trehalose                      |             | 500 mg      | 100 mg            | 100 mg            |                               | 200 mg      |
| Sukrose                        |             |             |                   |                   | 100 mg                        |             |
| Polysorbat 80                  |             |             | 10 mg             | 10 mg             | 10 mg                         | 150 mg      |
| Glysin                         |             |             |                   |                   |                               | 15 mg       |
| Kalium<br>dihydrogen<br>fosfat | 34 mg       | 34 mg       | 34 mg             | 6,8 mg            | 6,8 mg                        |             |
| Fosforsyre                     | q.s. pH 4,0 | q.s. pH 4,0 | q.s. pH 4,0       | q.s. pH 4,0       | q.s. pH 4,0                   |             |
| Saltsyre                       |             |             |                   |                   |                               | q.s. pH 4,0 |
| Vann for<br>injeksjon          | q.s. 5 ml   | q.s. 5 ml   | q.s. 5 ml         | q.s. 5 ml         | q.s. 50 ml                    | q.s. 50 ml  |

Bulkløsninger ble fremstilt og frysetørket ved anvendelse av følgende spesielle protokoller:

10 Formuleringer ETtreal, ETP80treal og referanse

En vekt på 100 g av hver formulering ble fremstilt som følger:

Mengden kaliumfosfat for sluttløsning ble innveid og løst i 90% sluttvolum (90 ml) vann. Deretter ble pH justert til pH 4,0 med 0,1 N fosforsyre.

- 15 Mengden ET-743 (5,0 mg) ble tilsatt til et sammenblandingsglasskar og løst opp ved magnetisk røring i 2/3 volum (60 ml) av kaliumfosfatløsningen i ca. 1 time (oppløsning ble sjekket visuelt). Mengden bulkmiddel og surfaktant ble tilsatt og løst opp ved 1/3 volum av kaliumfosfatløsningen. Deretter ble løsningen tilsatt til ET-743 løsningen og røring fortsatte i 1 ytterligere time.

20

Løsningen ble brakt til en sluttvekte vann. Løsningen ble filtrert gjennom et 0,22 µm cellulosefilter, hvor det ble tatt en alikvot før filtrering for IPC. Løsningen ble fylt i 25 ml medisinflasker ved 5 ml/medisinflaske og holdt ved -20°C til lyofiliseringsprosessen.

Formuleringer ETP80sacc250, ETP80real250, ETP80realgly250

En vekt på 30 g av hver formulering ble fremstilt som følger:

Mengden kaliumfosfateller glysin for den ferdige løsningen ble innveid og løst opp i 90% av sluttvolum (27 ml) vann. Deretter ble pH justert til 4,0 med 0,1 N fosforsyre eller 0,1 N HCl. Mengden polysorbat 80 ble innveid og tilsatt til 1/3 volum av bufferløsningen. Mengden ET-743 (7,5 mg) ble tilsatt til et sammenblandingsglasskar og løst opp ved magnetisk røring i 2/3 volum (60 ml) av kaliumfosfatløsningen i ca. 1 time (oppløsningen ble sjekket visuelt). Mengden bulkmiddel ble tilsatt og løst opp i 2/3 volum av bufferløsningen. Deretter ble løsningen tilsatt til ET-743 løsningen og røring fortsatt i 10 min. Løsningen ble brakt til den endelige vekten med vann. Løsningen ble filtrert gjennom et 0,22 µm cellulosefilter. Løsningen ble fylt i 10 ml medisinflasker ved 1 ml/medisinflaske og ved -20°C til lyofiliseringsprosessen.

Lyofiliseringsprosessen i alle seks formuleringene ble utført i henhold til følgende tabell VI:

Tabell VI

|                    |                 |
|--------------------|-----------------|
| Frysetid til -48°C | 2 timer 13 min. |
| Primær tørking     | 29 timer        |
| Sekundær tørking   | 36 timer        |

Etter frysetørring ble alle medisinflaskene forseglet. Medisinflaskene ble overført til et fryseområde (-20°C).

Stabilitetstesting ble utført med en temperatur på  $5 \pm 3^\circ\text{C}$ .

Alle formuleringene var mer stabile ved 5°C enn referanseformuleringen. Ingen større forskjeller ble notert mellom de nye formuleringene. Tabell VII beskriver ET-743 kromatografisk renhet til formuleringene under studiene:

Tabell VII

ET-743 renhet (%)

5

|                     | Referanse | ET <sub>treal</sub> | ETP80 <sub>treal</sub> | ETP80 <sub>treal</sub> | ETP80 <sub>tsacc</sub> | ETP80 <sub>trealgly</sub> |
|---------------------|-----------|---------------------|------------------------|------------------------|------------------------|---------------------------|
|                     |           |                     |                        | 250                    | 250                    | 250                       |
| Før filtrering      | 98,63     | 98,30               | 97,10                  | 97,67                  | 97,22                  | 89,3                      |
| Etter filtrering    | 98,62     | 98,46               | 97,27                  | 97,67                  | 97,06                  | 98,46                     |
| Etter frysetørrking | 97,86     | 98,18               | 97,65                  | 97,37                  | 97,79                  | 98,18                     |
| 1 måned             | 97,35     | 98,22               | 97,78                  | 96,39                  | 97,40                  | 98,22                     |
| 3 måneder           | 97,65     | 98,53               | 98,25                  | 96,61                  | 96,66                  | 98,53                     |
| 6 måneder           | 95,28     | 97,38               | 96,93                  | 97,01                  | 97,06                  | 97,38                     |

**Eksempel 3**

- 10 Seks formuleringer ET-NF A, ET-NF-B, ET-NF C, ET-NF D, ET-NF E og ET-NF F ble fremstilt og anvendt for ytterligere studie vedrørende stabilitet ved forskjellige temperaturer.

Sukrose og laktose ble valgt som bulkmiddel. To forskjellige buffere ble anvendt:  
 15 natriumsitratbuffer 0,1 N pH 4 og kaliumfosfat 0,05 M buffer pH 4. To forskjellige ET-743 konsentrasjoner i bulkløsningen ble testet: 0,25 mg/ml og 0,100 mg/ml. To forskjellige frysetørkesykler ble anvendt avhengig av fyllevolumet (4 ml vs 10 ml). En batch på minst 125 medisinflasker ble fremstilt for hver formulering.

- 20 For hver medisinflaske var sammensetningen av bulkløsningen som følger (tabell VIII), bemerk at vannet fordampes ved frysetørkingsprosedyre:

Tabell VIII

| Ingrediens               | ET-NF A  | ET-NF B  | ET-NF C  | ET-NF D  | ET-NF E   | ET-NF F  |
|--------------------------|----------|----------|----------|----------|-----------|----------|
| ET-743                   | 1 mg     | 1 mg     | 1 mg     | 1 mg     | 1 mg      | 1 mg     |
| Sukrose                  | 400 mg   | -        | -        | 1000 mg  | 1000 mg   | -        |
| Laktose                  | -        | 400 mg   | 1000 mg  | -        | -         | 200 mg   |
| Sitronsyre monohydrat    | 43,6 mg  | 43,6 mg  | 109 mg   | 109 mg   | -         | 43,6 mg  |
| Natriumsitrat            | 45,12 mg | 45,12 mg | 112,8 mg | 112,8 mg | -         | 45,12 mg |
| Kalium dihydrogen fosfat | -        | -        | -        | -        | 68 mg     | -        |
| Fosforsyre               | -        | -        | -        | -        | q.s. pH 4 | -        |
| Vann for injeksjon       | 4 ml     | 4 ml     | 10 ml    | 10 ml    | 10 ml     | 4 ml     |

Bulkløsninger ble fremstilt og frysetørket under følgende spesielle protokoller:

5

Formuleringer ET-NF A, ET-NF B og ET-NF F

Fremstilling av 2 l sitronsyre ca. 0,2 M: 76,86 g sitronsyre ble løst i en volumetrisk kolbe på 2 l og løsningen ble brakt til sluttvolumet med vann for injeksjon.

Sluttmolariteten til løsning av sitronsyre var 0,183 M.

10

Fremstilling av 2 l natriumsitrat tilnærmet 0,2 M: 117,64 g natriumsitrat ble løst i en volumetrisk kolbe på 2 l og løsningen ble brakt til et sluttvolum med vann for injeksjon.

Sluttmolariteten til løsningen av natriumsitrat var 0,175 M.

15

Fremstilling av 4 l sitratbuffer pH 4 tilnærmet 0,1 M: 1125 ml sitronsyreløsning 0,2 N

ble blandet med 875 ml natriumsitratløsning 0,2 M i en volumetrisk kolbe til 4 l.

Løsningen ble brakt til et sluttvolum med vann for injeksjon. pH til løsningen ble

sjekket og justert til pH 4. Sluttmolariteten til løsningen av sitratbuffer var 0,989 M.

20

143,83 mg ET-743 ble tilsatt til et sammenblandingsglasskar og løst opp ved magnetisk røring i ca. 80% av påkrevet totalvolum av sitratbuffer 0,1 M i ca. 1 time (opløsningen ble sjekket visuelt).

Deretter ble mengden av sukrose eller laktose (55 g sukroseformulering A og B, og 27,5 g laktoseformulering F) tilsatt og blandingen ble rørt i en ytterligere periode på ca. 1 time til oppløsning.

- 5 Etter sjekking av pH ble løsningen brakt til sluttvolumet ved tilsetning av sitratbuffer 0,1 M pH 4. Ny justering til pH 4 med sitronsyre var nødvendig for formulering A. Tetthet til sluttløsning: 1,04 g/l. Sluttvekt 572 mg. Løsningen ble filtrert gjennom et 0,22 µm PVDF filter. Løsningen ble fylt i 25 ml medisinflasker ved anvendelse en automatisk pumpe og silikon platinaherdet rør 3,2 mm. Standard fyllevolum var 4 ml. Fyllevolumet ble sjekket ved regulære intervaller (hver 15 medisinflaske) og fyllevolumet justert hvis påkrevet.

Etter fyllelyofilisering ble stoppere plassert og rørene ble overført til lyofiliseringsapparatet ved 5°C.

15

Lyofiliseringsprosessen ble utført i henhold til følgende tabell IX:

Tabell IX:

| Sykel       | Trinn                  | Trykk     | Settpunkt T (°C) | Helling (min.)  | Oppholdstid |
|-------------|------------------------|-----------|------------------|-----------------|-------------|
| Tilsetning  | Lagring T <sup>a</sup> | atm       | 5°C              | F               |             |
| Frysing     | Fryse 1                | atm       | -50°C            | 1 time 50 min.  |             |
|             | Fryse 2                | atm       | -50°C            | 0,5°C/min.      | 6 timer     |
| Vakuum      | Ch. vakuum             | 0,5 mb    |                  |                 |             |
| Sublimering | 1° tørking             | 0,080 mb  | -27°C            | 45 min.         |             |
|             | 1° tørking             | 0,080 mb  | -27°C            | 0,5°C/min.      | 58 timer    |
| 2. tørking  | 2° tørking             | <0,020 mb | 25°C             | 3 timer 30 min. |             |
|             | 2° tørking             | <0,020 mb | 25°C             | 0,25°C/min.     |             |
|             | Stopping               | 0,010 mb  | 25°C             |                 |             |

20

Medisinflaskene ble forseglet. En endelig avstemning ble utført. Medisinflaskene ble overført til et fryseområde (-20°C).

Formulering ET-NF C og ET-NF D

Fremstilling av en 1 l sitronsyre tilnærmet 0,2M; 38,48 g sitronsyre ble løst i en volumetrisk kolbe på 1 l og løsningen ble brakt til volumet med vann for injeksjon.

5 Slutmolariteten til løsningen av sitronsyre var 0,183 M.

Fremstilling av 1 l natriumsitrat tilnærmet 0,2 M: 58,82 g natriumsitrat ble løst i en volumetrisk kolbe på 1 l og løsningen ble brakt til sluttvolumet med vann for injeksjon. Slutmolariteten til løsningen av natriumsitrat var 0,175 M.

10

Fremstilling av 2 l sitratbuffer pH 4 tilnærmet 0,1 M: 850 ml sitronsyreløsning 0,2 M ble blandet med 650 ml natriumsitratløsning 0,2 M i en volumetrisk kolbe på 2 l. Løsningen ble brakt til sluttvolumet med vann for injeksjon. pH til løsningen ble sjekket og justert til pH 4. Endelig molaritet til løsningen av sitratbuffer var 0,089 M.

15

141,21 mg ET-743 ble tilsatt til et sammenblandingsglasskar og løst opp ved magnetisk røring i ca. 80% av totalvolumet av sitratbuffer 0,1 M i ca 1 time (oppløsning ble sjekket visuelt). Mengden sukrose eller laktose (135 g) ble tilsatt og blandingen ble rørt i en ytterligere periode på ca. 1 time til oppløsning. Etter sjekking av pH ble løsningen  
20 brakt til et sluttvolum ved tilsetning av sitratbuffer 0,1 M pH 4. Ingen ny justering av pH var nødvendig. Tetthet i sluttløsningen: 1,04 g/l. Sluttvekt 1404 mg. Løsningen ble filtrert gjennom et 0,45 µm PVDF filter. Løsningen ble fylt i 25 ml medisinflasker ved anvendelse av en automatisk pumpe og silikon platinaherdede rør 3,2 mm. Standard fyllevolum var 10 ml. Fyllevolumet ble sjekket ved regulære intervaller (hver 15  
25 medisinflaske) og fyllevolumet justert hvis påkrevet. Etter fylling ble lyofiliseringsstoppere plassert og begrene brakt til lyofiliseringsapparatet ved 5°C. Lyofiliseringsprosessen ble utført som tidligere for formuleringer ET-NF A, ET-NF B og ET-NF F (tabell IX).

30

På grunn av det store volumet i begrene ga den foreslåtte syklen ikke en adekvat lyofilisering og dette førte til kollaps. For å unngå en ny fremstilling ble alle medisinflaskene rekonstitusjonert med 10 ml rensset vann, renseprofilen til noen rekonstitusjonert løsninger ble sjekket, stoppere ble erstattet med to hele stoppere og følgende nye sykel ble anvendt (tabell X):

35

Tabell X

| Syklus      | Trinn      | Trykk     | Settpunkt T (°C) | Hellingning (min.)             | Holdetid |
|-------------|------------|-----------|------------------|--------------------------------|----------|
|             | Fryse 2    | atm       | -50°C            |                                | 6 timer  |
| Vakuum      | Ch. vakuum | 0,5 mb    |                  |                                |          |
| Sublimering | 1° tørking | 0,080 mb  | -23°C            | 45 min.<br>0,5°C/min.          |          |
|             | 1° tørking | 0,080 mb  | -27°C            |                                | 58 timer |
| 2. tørking  | 2° tørking | <0,020 mb | 25°C             | 3 timer 30 min.<br>0,25°C/min. |          |
|             | 2° tørking | <0,020 mb | 23°C             |                                | 80 timer |
|             | Stopping   | 0,010 mb  | 25°C             |                                |          |

Etter frysetørking ble medisinflaskene forseglet. En endelig avstemning ble utført. Medisinflaskene ble overført til et fryseområde (-20°C).

5

#### Formulering ET-NF E

141,21 mg ET-743 ble tilsatt til et sammenblandingsskål og løst opp ved magnetisk røring i 1080 ml wfi + 3,240 ml fosforsyre 1 N i ca. 1 time (oppløsningen ble sjekket visuelt). Mengden sukrose (135 g) og kaliumfosfat (9,18 g) ble tilsatt og blandingen ble rørt i ytterligere 1 time til total oppløsning av molekylet.

10

Etter sjekking av pH og ny justering til pH4 med fosforsyre 1 N ble løsningen brakt til sluttvolumet ved tilsetning av vann for injeksjon. Tetthet til sluttløsningen: 1,04 g/l. Sluttvekt 1404 mg. Løsningen ble filtrert gjennom et 0,45 µm PVDF filter. Løsningen ble fylt i 25 ml medisinflasker ved anvendelse av en automatisk pumpe og silikon platinaherdede rør 3,2 mm. Standard fyllvolum var 10 ml. Fyllevolumet ble sjekket ved regulære intervaller (hver 10 medisinflaske) og fyllevolumet justert hvis påkrevet. Etter fylling ble lyofiliseringsstoppere plassert og medisinflaskene tilsatt lyofiliseringsapparatet ved 5°C. Lyofiliseringsprosessen ble utført som tidligere for formuleringer ET-NF A, ET-NF B og ET-NF F (tabell IX).

20

På grunn av det store volumet i medisinflaskene ga den foreslåtte syklen ikke en adekvat lyofilisering og dette førte til kollaps. For å unngå en ny fremstilling ble begrene rekonstitusjonert med 10 ml rensset vann, renseprofilen til noen rekonstitusjonerte løsninger ble sjekket, stoppere ble erstattet med to hele stoppere og en ny sykel ble anvendt som i tilfelle formuleringene ET-NF C og ET-NF D (tabell X).

25

Etter frysetørring ble begrene forseget. En siste avstemning ble utført. Medisinflaskene ble overført til et fryseområde (-20°C).

5 Den ønskede ET-743 konsentrasjonen ble oppnådd i alle tilfellene og urenhetsprofilen var tilsvarende mellom formuleringer. Ingen forskjeller i ET-743 konsentrasjon og urenhetsprofiler ble observert ved tørkingen (før og etter filtrering, og etter fylling). Farven i bulkløsningen var svakt gulaktig i de formuleringene som inneholdt laktose.

10 Formuleringer med 4 ml fylling og 10 ml fylling ble initielt frysetørket ved å følge den indikerte protokollen. Mens formuleringer med 4 ml fylling ble korrekt lyofilisert kollapset formuleringer med 10 ml fylling. En trykkvariasjon i den andre desikasjonen indikerte kollaps og koking av den frysetørrede kaken. Medisinflaskene med formuleringer ET-NF C, ET-NF D og ET-NF E ble rekonstitusjonert med 10 ml renset vann. Renseprofilen til formuleringene ble sjekket. Idet ingen modifisering i  
15 renhetsprofilen ble observert sammenliknet med bulkløsningene ble det bestemt å lyofilisere begrene en gang til ved anvendelse av den indikerte angitte frysetørkede sykelen. Batchene ble lyofilisert som beskrevet, som resulterte i gode aspekter uten kollaps, men noe bunnkontraksjon.

20 ET-743 innholdet i begrene var innenfor spesifikasjoner (05%-105%). Urenhetsprofilene viste likheter mellom formuleringer og de profilene var sammenliknbare med urenheter i bulkløsningene. Restvanninnhold var lavere eller lik 2% med de største verdiene værende de i formuleringene med 10 ml fylling.

25 pH til de rekonstitusjonerte løsningene var mellom pH 4 og pH 4,2 i alle tilfellene. Løsningene var klare eller fargeløse uten synlig fremmed stoff eller presipitasjon. Reskonstitusjonstiden var tilsvarende for alle formuleringer og mindre enn 30 sek.

#### Eksempel 4

30 Formålet med studien var å undersøke stabiliteten til ET-743 i de forskjellige formuleringene ET-NF A, ET-NF B, ET-NF C, ET-NF D, ET-NF E og ET-NF F ved 1 mg/medisinflaske under forskjellige temperaturbetingelser.

35 En batch på 130 medisinflasker i hver formulering ET-NF A, ET-NF B, ET-NF C, ET-NF D, ET-NF E og ET-NF F, 1 mg ET-743/medisinflaske, ble fremstilt i henhold til eksempel 3.

Stabilitetstesting ble utført ved en temperatur på 5°C, 25°C/65% RH og 40°C/70% RH.

Figur 4 og eksempel XI viser ET-743 renhetsutvikling til de nye formuleringene ved lagring ved 5°C, sammenliknet med de tre vanlige formuleringene (som inneholder ET-743, mannitol og fosfatbuffer).

**Tabell XI**

| ET-743 renhet (%) |             |             |             |         |         |
|-------------------|-------------|-------------|-------------|---------|---------|
|                   | Referanse 1 | Referanse 2 | Referanse 3 | ET-NF A | ET-NF B |
| t = 0             | 97,70       | 96,90       | 96,90       | 99,06   | 99,00   |
| 1 måned           | 94,70       | 94,60       | 94,00       | 99,28   | 98,86   |
| 2 måneder         | 93,80       | 92,70       | 93,70       | 99,21   | 98,97   |
| 3 måneder         | 92,50       | 91,00       | 91,20       | 99,22   | 98,88   |

10 **Tabell XI (fortsetter)**

| ET-743 renhet (%) |         |         |         |         |
|-------------------|---------|---------|---------|---------|
|                   | ET-NF C | ET-NF D | ET-NF E | ET-NF F |
| t = 0             | 98,83   | 98,98   | 99,15   | 98,88   |
| 1 måned           | 95,53   | 99,03   | 99,14   | 98,71   |
| 2 måneder         | 98,88   | 99,15   | 99,21   | 98,80   |
| 3 måneder         | 98,86   | 99,12   | 99,16   | 98,92   |

Figur 6 og tabell XII viser ET-743 renhetsutvikling til de nye formuleringene ved lagring ved 25°C/65% RH sammenliknet med tre vanlige formuleringer (som inneholder ET-743, mannitol og fosfatbuffer).

**Tabell XII**

| ET-743 renhet (%) |             |             |             |         |         |
|-------------------|-------------|-------------|-------------|---------|---------|
|                   | Referanse 1 | Referanse 2 | Referanse 3 | ET-NF A | ET-NF B |
| t = 0             | 97,70       | 96,90       | 97,70       | 99,06   | 99,00   |
| 15 dager          | 84,70       | 84,50       | 89,50       | 98,98   | 98,09   |
| 1 måned           | 74,50       | 72,40       | 81,90       | 99,08   | 98,13   |
| 2 måneder         |             |             |             | 99,10   | 98,38   |
| 3 måneder         |             |             |             | 98,98   | 98,15   |

Tabell XII (fortsetter)

| ET-743 renhet (%) |         |         |         |         |
|-------------------|---------|---------|---------|---------|
|                   | ET-NF C | ET-NF D | ET-NF E | ET-NF F |
| T = 0             | 98,83   | 98,98   | 99,15   | 98,88   |
| 15 dager          | 98,35   | 98,90   | 99,11   | 98,31   |
| 1 måned           | 98,01   | 99,03   | 99,13   | 98,32   |
| 2 måneder         | 98,35   | 98,99   | 99,10   | 98,28   |
| 3 måneder         | 98,33   | 98,93   | 99,06   | 98,14   |

- 5 Figur 8 og tabell XIII viser ET-743 renhetsutvikling til de nye formuleringene ved lagring ved 40°C/70% RH, sammenliknet med en vanlig formulering (som inneholder ET-743, mannitol og fosfatbuffer).

Tabell XIII

10

| ET-743 renhet (%) |             |         |         |         |         |         |         |
|-------------------|-------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|                   | Referanse 4 | ET-NF A | ET-NF B | ET-NF c | ET-NF D | ET-NF E | ET-NF F |
| t = 0             | 94,92       | 99,06   | 99,00   | 98,83   | 98,98   | 99,15   | 98,88   |
| 2 dager           | 87,17       | 99,02   | 98,10   | 98,48   | 98,95   | 99,12   | 97,53   |
| 7 dager           | 82,04       | 98,68   | 97,08   | 97,86   | 98,63   | 98,89   | 97,20   |
| 15 dager          | 76,33       | 98,75   | 97,33   | 97,77   | 98,55   | 98,71   | 96,66   |
| 1,5 måned         |             | 98,52   | 96,99   | 97,53   | 97,54   | 98,47   | 95,79   |
| 3 måneder         |             | 98,24   | 95,92   | 96,67   | 94,79   | 97,84   | 95,91   |

I tillegg viser figur 5 og tabell XIV ET-701 urenhetsproduksjon til de nye formuleringene med lagring ved 5°C sammenliknet med tre vanlige formuleringer (som inneholder Et-743, mannitol og fosfatbuffer).

15

Tabell XIV

| ET-701 (%) |             |             |             |         |         |
|------------|-------------|-------------|-------------|---------|---------|
|            | Referanse 1 | Referanse 2 | Referanse 3 | ET-NF A | ET-NF B |
| T = 0      | 0,70        | 0,84        | 0,53        |         | 0,11    |
| 1 måned    | 2,56        | 3,09        | 1,73        |         | 0,12    |
| 2 måneder  | 3,45        | 3,54        | 2,60        | 0,12    | 0,13    |
| 3 måneder  | 4,61        | 5,04        | 4,28        | 0,13    | 0,13    |

Tabell XIV (fortsetter)

| ET-701 (%) |         |         |         |         |
|------------|---------|---------|---------|---------|
|            | ET-NF C | ET-NF D | ET-NF E | ET-NF F |
| T = 0      | 0,15    | 0,16    | 0,15    | 0,11    |
| 1 måned    | 0,12    | 0,12    | 0,14    | 0,11    |
| 2 måneder  | 0,16    | 0,14    | 0,15    | 0,12    |
| 3 måneder  | 0,16    | 0,15    | 0,15    | 0,12    |

Figur 7 og tabell X viser ET-701 urenhetsproduksjon til de nye formuleringene ved lagring ved 25°C/65% RH, sammenliknet med de tre vanlige formuleringene (som inneholder ET-743, mannitol og fosfatbuffer.

Tabell XV

| ET-701 (%) |             |             |             |         |         |
|------------|-------------|-------------|-------------|---------|---------|
|            | Referanse 1 | Referanse 2 | Referanse 3 | ET-NF A | ET-NF B |
| T = 0      | 0,70        | 0,84        | 0,53        | 0,09    | 0,11    |
| 15 dager   | 7,99        | 8,20        | 4,22        | 0,14    | 0,12    |
| 1 måned    | 10,56       | 14,18       | 6,86        | 0,11    | 0,12    |
| 2 måneder  |             |             |             | 0,17    | 0,17    |
| 3 måneder  |             |             |             | 0,17    | 0,17    |

10

Tabell XV (fortsetter)

| ET-701 (%) |         |         |         |         |
|------------|---------|---------|---------|---------|
|            | ET-NF C | ET-NF D | ET-NF E | ET-NF F |
| T = 0      | 0,15    | 0,16    | 0,15    | 0,11    |
| 15 dager   | 0,18    | 0,17    | 0,16    | 0,13    |
| 1 måned    |         | 0,18    | 0,18    |         |
| 2 måneder  | 0,18    | 0,19    | 0,24    | 0,15    |
| 3 måneder  | 0,22    | 0,23    | 0,24    | 0,18    |

Som viser i disse figurene var stabiliteten til de nye formuleringene høyere enn stabiliteten til de vanlige formuleringene. I tillegg ble hovednedbrytingsproduktet til de vanlige formuleringene ET-701, dramatisk redusert i de nye formuleringene.

15

Eksempel 5

Tre nye formuleringer basert på sukrose som bulkmiddel ble anvendt for ytterligere stabilitetsstudier. Disse nye formuleringene var forskjellig i fosfatbuffermolaritet (0,05 M vs 0,1 M) og fyllevolum eller, med andre ord, i ET-743 konsentrasjon i bulkløsningen (10 ml vs 4 ml).

Fremstilling av en batch på minst 50 medisinflasker for hver av disse formuleringene er beskrevet. Et sammendrag av formuleringsbeskrivelsen per medisinflaske er som følger (tabell XVI), bemerk at vannet fordamer i løpet av frysetørkingsprosedyren:

Tabell XVI

|                           | ET-NF G               |                     | ET-NF H             |                     | ET-NF I             |                     |
|---------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                           | Konsentrasjon (mg/ml) | Slutt-sammensetning | Konsentrasjon mg/ml | Slutt-Sammensetning | Konsentrasjon Mg/ml | Slutt-sammensetning |
| Ingrediens                |                       |                     |                     |                     |                     |                     |
| ET-743                    | 0,250                 | 1 mg                | 0,100               | 1 mg                | 0,250               | 1 mg                |
| Sukrose                   | 100                   | 400 mg              | 100                 | 1 g                 | 100                 | 400 mg              |
| Kalsium dihydrogen fosfat | 6,8                   | 27,2 mg             | 13,6                | 136 mg              | 13,6                | 54,4 mg             |
| Fosforsyre                | q.s. pH 4,0           | q.s. pH 4,0         | q.s. pH 4,0         | q.s. pH 4,0         | q.s. pH 4,0         | q.s. pH 4,0         |
| Vann for injeksjon        | q.s. 1 ml             | 4 ml                | q.s. 1 ml           | 10 ml               | q.s. 1 ml           | 4 ml                |

Et volum på 240 ml for formuleringene ET-NF-G og ET-NF-I ble fremstilt: 62,76 mg ET-743 ble tilsatt til et sammenblandingsglasskar og løst opp ved magnetisk røring i en løsning av 192 ml wfi + 1N fosforsyre (576 µl for NFG, 816 µl for NF I) i ca 1 time (oppløsning sjekket visuelt).

Mengden av sukrose (24 g) og kaliumfosfat (1,63 g for NF G; 3,26 g for NF I) ble tilsatt og blandingen ble rørt i en ytterligere periode på ca. 1 time til oppløsning.

Etter sjekking av pH og justering til pH 4,00 hvis nødvendig med 1N fosforsyre ble løsningen brakt til sluttvolumet ved tilsetning av vann for injeksjon. Tetthet til sluttløsning: 1,94 g/l. Sluttvekt 249,6 g. Løsningen ble filtrert gjennom et 0,45 µm PVDF filter.

- Løsningen ble fylt i 25 ml medisinflasker ved anvendelse av en automatisk pumpe og silikon platinaherdede rør 3,2 mm. Standard fyllvolum var 4 ml. Fyllevolumet ble sjekket ved regulære intervaller (hver 15 medisinflaske) og justert og hvis nødvendig.
- 5 Etter fylling ble lyofiliseringsstoppere plassert og begrene tilsatt lyofilisering ved 5°C.

Lyofiliseringsprosessen ble utført i henhold til følgende parametere (tabell XVII):

**Tabell XVII**

| Sykel       | Trinn      | Trykk     | Settpunkt T (°C) | Helling (min.)                 | Holdtid  |
|-------------|------------|-----------|------------------|--------------------------------|----------|
|             | Lagring T* | Atm       | 5°C              |                                |          |
| Frysing     | Fryse 1    | Amt       | -50°C            | 1 time 50 min<br>0,5°C/min     | 6 timer  |
|             | Fryse 2    | Amt       | 50°C             |                                |          |
| Vakuum      | Ch. vakuum | 0,5 mb    |                  |                                |          |
| Sublimering | 1° tørking | 0,080 mb  | -27°C            | 45 min.<br>0,5°C/min.          | 58 timer |
|             | 1° tørking | 0,080 mb  | -27°C            |                                |          |
| 2. tørking  | 2° tørking | <0,020 mb | 25°C             | 3 timer 30 min.<br>0,25°C/min. | 40 timer |
|             | 2° tørking | <0,020 mb | 25°C             |                                |          |
|             | Slutt      | 0,010 mb  | 25°C             |                                |          |

10

Etter frysetørking ble medisinflaskene forseglet. En siste avstemningsperiode ble utført. Medisinflaskene ble overført til et fryseområde (-20°C)

Et volum på 600 ml av formuleringen ET-NF-H ble fremstilt som følger:

- 15 62,76 mg ET-743 ble tilsatt til et sammenblandingsglasskar og løst opp ved magnetisk røring i en løsning av 480 ml wfi + 1,44 ml 1N fosforsyre i ca. 1 time (oppløsning sjekket visuelt). Mengden av sukrose (60 g) og kaliumfosfat (8,16 g) ble tilsatt og blandingen ble rørt i en ytterligere periode på ca. 1 time til oppløsning.
- 20 Etter sjekking av pH og ny justering til pH 4,00 hvis nødvendig med 1N fosforsyre ble løsningen brakt til sluttvolumet ved tilsetning av vann for injeksjon. Tetthet til sluttløsningen: 1,04 g/l. Sluttvekt 624 g. Løsningen ble filtrert gjennom et 0,45 µm PVDF filter. Løsningen ble fylt i 25 ml medisinflasker ved anvendelse av en automatisk

pumpe og silikon platinaherdet rør 3,2 mm. Standard fyllevolum var 10 ml.

Fyllevolumet ble sjekket ved regulære intervaller (hvert 15 medisinflaske) og justert hvis påkrevet. Etter fylling ble lyofiliseringsstoppere plassert og medisinflaskene tilsatt lyofiliseringsapparatet ved 5°C. Lyofiliseringsprosessen ble utført i henhold til følgende

5 paramtere (tabell XVIII):

**Tabell XVIII**

| Sykel       | Trinn      | Trykk     | Settpunkt T (°C) | Helling (min.)                 | Holdtid  |
|-------------|------------|-----------|------------------|--------------------------------|----------|
| Frysing     | Fryse 1    | Amt       | -50°C            | 1 time 50 min<br>0,5°C/min     | 6 timer  |
|             | Fryse 2    | Amt       | 50°C             |                                |          |
| Vakuum      | Ch. vakuum | 0,5 mb    |                  |                                |          |
| Sublimering | 1° tørking | 0,080 mb  | -27°C            | 45 min.<br>0,5°C/min.          | 62 timer |
|             | 1° tørking | 0,080 mb  | -27°C            |                                |          |
| 2. tørking  | 2° tørking | <0,020 mb | 25°C             | 3 timer 30 min.<br>0,25°C/min. | 50 timer |
|             | 2° tørking | <0,020 mb | 25°C             |                                |          |
|             | Slutt      | 0,010 mb  | 25°C             |                                |          |

Etter frysetørking ble medisinflaskene forseglet. En endelig avstemning ble utført.

10 Begrene ble overført til et fryseområde (-20°C).

ET-743 innholdet var innenfor spesifikasjoner (95%-105%). Urenhetsprofiler viste likheter for alle formuleringene og sammenliknbare med urenhetene i bulkløsningene.

15 Restvanninnhold var lavere enn 2%, værende den høyeste verdien for formuleringen med 10 ml fylling.

pH til de rekonstitusjonerte løsningene var mellom pH 4 og pH 4,28 i alle tilfeller.

Løsninger var klare og fargeløse uten synlig fremmed stoff eller presipitasjon.

Rekonstitusjonstiden var tilsvarende for alle formuleringer og mindre enn 30 sek.

20

Stabilitetstesting ble utført i løpet av 3 måneder ved en lagringstemperatur på 40°C/70% RH.

Figur 9 og tabell XIX viser ET-743 renhetsutvikling til de nye formuleringene ved lagring ved 40°C/70% RH.

5 Tabell XIX

| ET-743 renhet (%) |         |         |         |
|-------------------|---------|---------|---------|
|                   | ET-NF G | ET-NF H | ET-NF I |
| t= 0              | 99,18   | 99,23   | 99,00   |
| 7 dager           | 99,04   | 98,68   |         |
| 15 dager          | 98,97   | 98,86   | 98,79   |
| 1,5 måneder       | 98,72   | 98,61   | 98,40   |
| 2 måneder         | 98,29   |         |         |
| 3 måneder         |         |         | 97,71   |

I tillegg er i figur 8 stabilitetsdata vist sammenliknet med en vanlig formulering (som inneholder ET-743, mannitol og fosfatbuffer).

10

Resultatene oppnådd i eksempel 4 og 5 indikerer at alle formuleringene som innbefatter et disakkarid som bulkmiddel er mer stabile enn vanlige formuleringer som inneholder mannitol som bulkmiddel. Formulering ET-NF-G er en foretrukket formulering.

15 Utførelsesformer av formuleringer ifølge oppfinnelsen ble testet etter lagring under et antall lagringsbetingelser (som inkluderer temperaturer på -20°C, 4°C og 25°C/60% RH) ved forskjellige lagringstider (som inkluderer lagringstider på 3 måneder, måneder og 9 måneder). Undersøkelserresultatene indikerer at minst 99,5% av ET-743 holdt seg etter 9 måneder med lagring ved -20°C, minst 99% av ET-743 holdt seg etter 9 måneder ved lagring ved 4°C og minst 97% av ET-743 holdt seg etter 9 måneder ved lagring ved 25°C/6+-% RH. Totale urenheter som inkluderer ET-701, ET-745 og andre urenheter overskred ikke 1,66% etter 9 måneder lagring ved 25°C/60% RH. I tillegg overskred nivået av ET-701 urenheter ikke 0,21% etter 9 måneder med nevnte lagringsbetingelser.

25 Alle trekk og fordeler ved foreliggende oppfinnelse er nærliggende i lys av beskrivelsen tilveiebrakt heri. Basert på foreliggende beskrivelse, kan modifikasjoner og tilpasninger til de forskjellige betingelsene og anvendelsene gjøres som således genererer utførelsesformer innenfor omfanget av oppfinnelsen, slik den er angitt i kravene.

P a t e n t k r a v

1.  
Sammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter et  
5 e c t e i n a s c i d i n og et disakkarid.
2.  
Sammensetning ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at  
e c t e i n a s c i d i n e t omfatter ET-743.  
10
3.  
Sammensetning ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t  
v e d at nevnte disakkarid er valgt fra gruppen som består av laktose, trehalose,  
sukrose og blandinger derav.  
15
4.  
Sammensetning ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at  
nevnte disakkarid er sukrose.
- 20 5.  
Sammensetning ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, k a r a k -  
t e r i s e r t v e d at forholdet (vekt/vekt) mellom ET-743 og  
disakkarid er fra ca. 1:100 til ca. 1:1500.
- 25 6.  
Sammensetning ifølge krav 5, k a r a k t e r i s e r t v e d at  
forholdet (vekt/vekt) mellom ET-743 og disakkarid er fra ca. 1:250 til ca. 1: 600.
7.  
30 Sammensetning ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at  
forholdet (vekt/vekt) mellom ET-743 og disakkarid er ca. 1:400.
8.  
Sammensetning ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, k a r a k -  
35 t e r i s e r t v e d at den ytterligere omfatter en buffer.

9.  
Sammensetning ifølge krav 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at  
nevnte buffer er valgt fra fosfatbuffer, sitratbuffer, glysin/saltsyrebuffer og blandinger  
derav.
- 5 10.  
Sammensetning ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, k a r a k -  
t e r i s e r t v e d at den ytterligere omfatter et overflateaktivt middel.
- 10 11.  
Sammensetning ifølge krav 10, k a r a k t e r i s e r t v e d at  
det overflateaktive middel er valgt fra polyoksyetylen 20 sorbitan monooleat, polyoksyyl  
40 stearat og blandinger derav.
- 15 12.  
Sammensetning ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, k a r a k -  
t e r i s e r t v e d at sammensetningen er i form av en lyofilisert  
formulering.
- 20 13.  
Lyofilisert formulering ifølge krav 12, k a r a k t e r i s e r t  
v e d at den fylofiserte formuleringen er i en medisinflaske og omfatter en mengde  
av ET-743.
- 25 14.  
Lyofilisert formulering ifølge krav 13, k a r a k t e r i s e r t  
v e d at nevnte mengde ET-743 er ca. 250 µg.
15.  
30 Lyofilisert formulering ifølge krav 14, k a r a k t e r i s e r t  
v e d at nevnte medisinflaske inneholder en formulering som omfatter: ca. 0,25 mg  
ET-743, ca. 100 mg sukrose og ca. 6,8 mg fosfat, hvori nevnte 6,8 mg fosfat beregnes  
som kalium dihydrogenfosfat.

16.

Lyofilisert formulering ifølge krav 13, k a r a k t e r i s e r t  
v e d at nevnte mengde ET-743 er ca. 1 mg.

5 17.

Lyofilisert formulering ifølge krav 16, k a r a k t e r i s e r t  
v e d at nevnte medisinflaske inneholder en formulering som omfatter: ca. 1,0 mg  
ET-743, ca. 400 mg sukrose og ca. 27,2 mg fosfat, hvori nevnte 27,2 mg fosfat beregnes  
som kalium dihydrogen fosfat.

10

18.

Fremgangsmåte for fremstilling av et beger som inneholder en lyofilisert formulering av  
et ecteinascidin, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter  
frysetørrking av en bulkløsning som omfatter ecteinascidinet og et disakkarid.

15

19.

Fremgangsmåte ifølge krav 18, k a r a k t e r i s e r t v e d at  
ecteinascidinet er ET-743.

20 20.

Fremgangsmåte for å redusere dannelse av ET-701 i en formulering av ET-743,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter frysetørrking av en  
bulkløsning som omfatter ET-743 og et disakkarid.

25 21.

Fremgangsmåte for fremstilling av en lyofilisert formulering som definert i hvilket som  
helst av kravene 12-17, k a r a k t e r i s e r t v e d at den  
omfatter oppløsning av et ecteinascidin i et surt medium, sammenblende det  
forhåndsoppløste ecteinascidinet med andre komponenter i bulkløsningen og eventuelt  
30 justere pH i den endelige løsningen.

22.

Fremgangsmåte ifølge krav 21, k a r a k t e r i s e r t v e d at  
ecteinascidinet er ET-743.

23.

Fremgangsmåte for fremstilling av en løsning for intravenøs infusjon, k a r -  
a k t e r i s e r t v e d at den omfatter: å tilveiebringe en  
medisinflaske som omfatter lyofilisert ecteinascidin og et disakkarid, tilsette vann for å  
5 danne en rekonstituert løsning og fortynne nevnte rekonstituerte løsning med et vandig  
system.

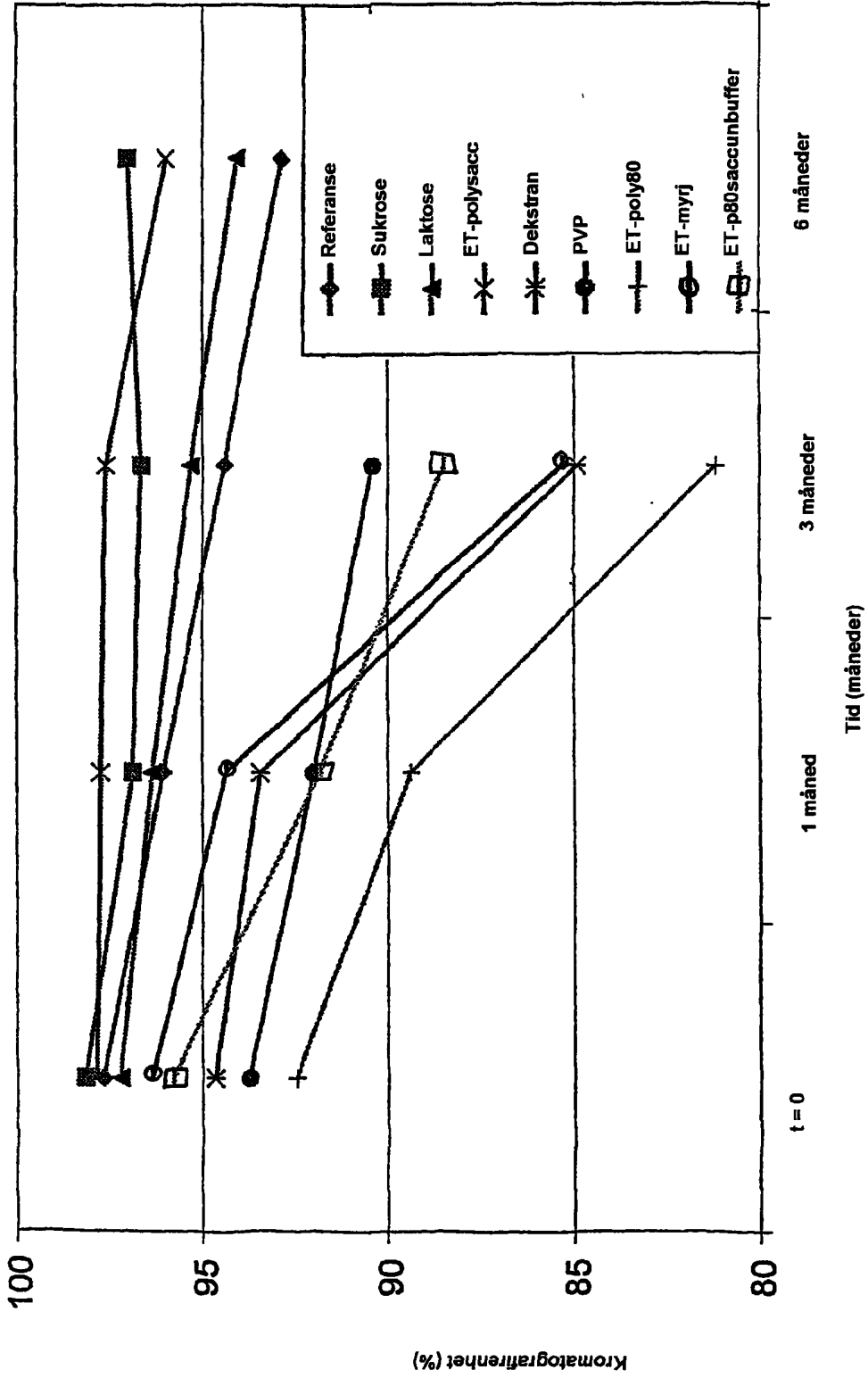
24.

Fremgangsmåte ifølge krav 23, k a r a k t e r i s e r t v e d at  
10 ecetinascidinet er ET-743.

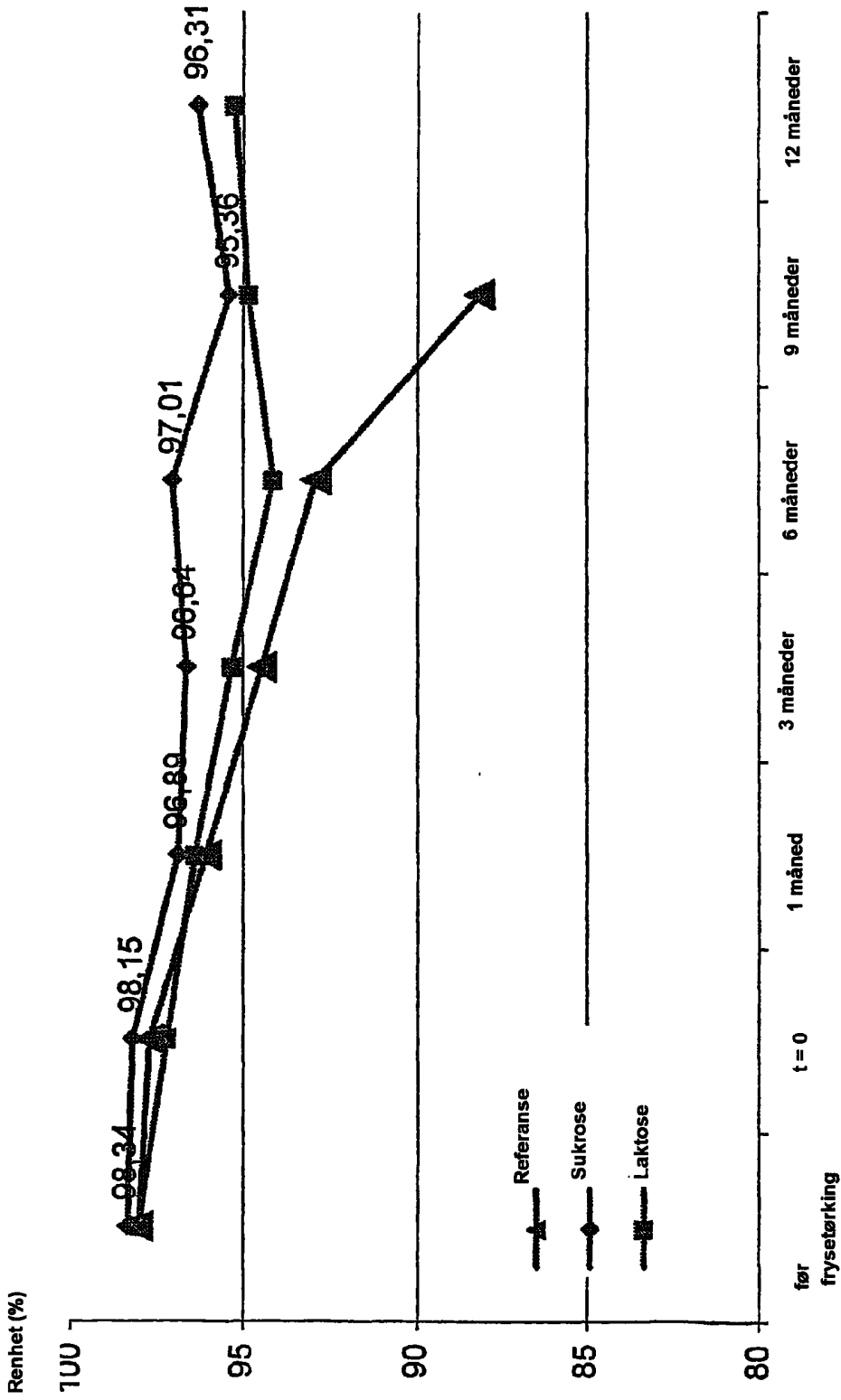
25.

Anvendelse av en løsning fremstilt ifølge krav 23, for fremstilling av et medikament for  
behandling av kreft, hvori løsningen blir administrert ved intravenøs infusjon.

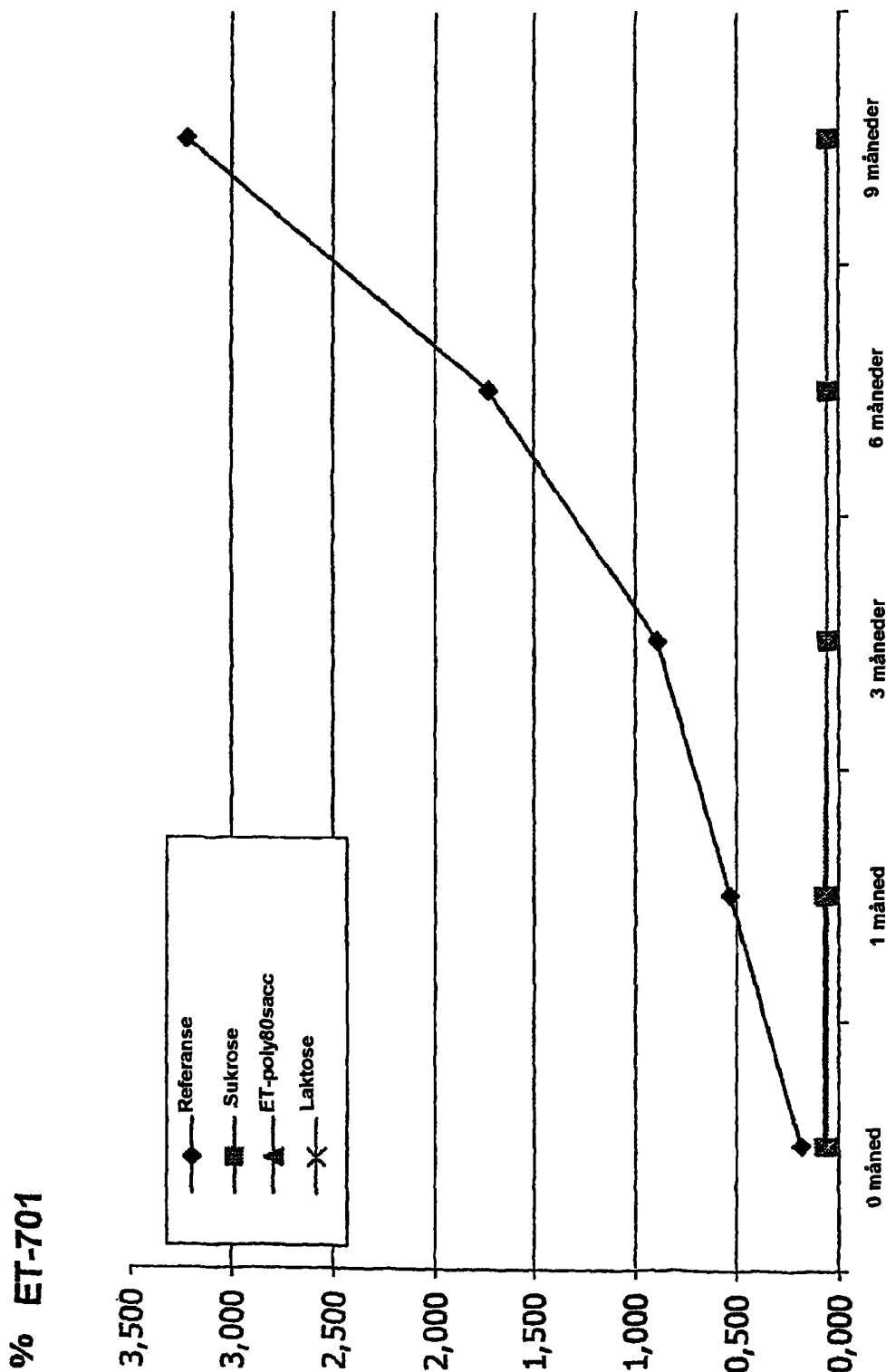
15



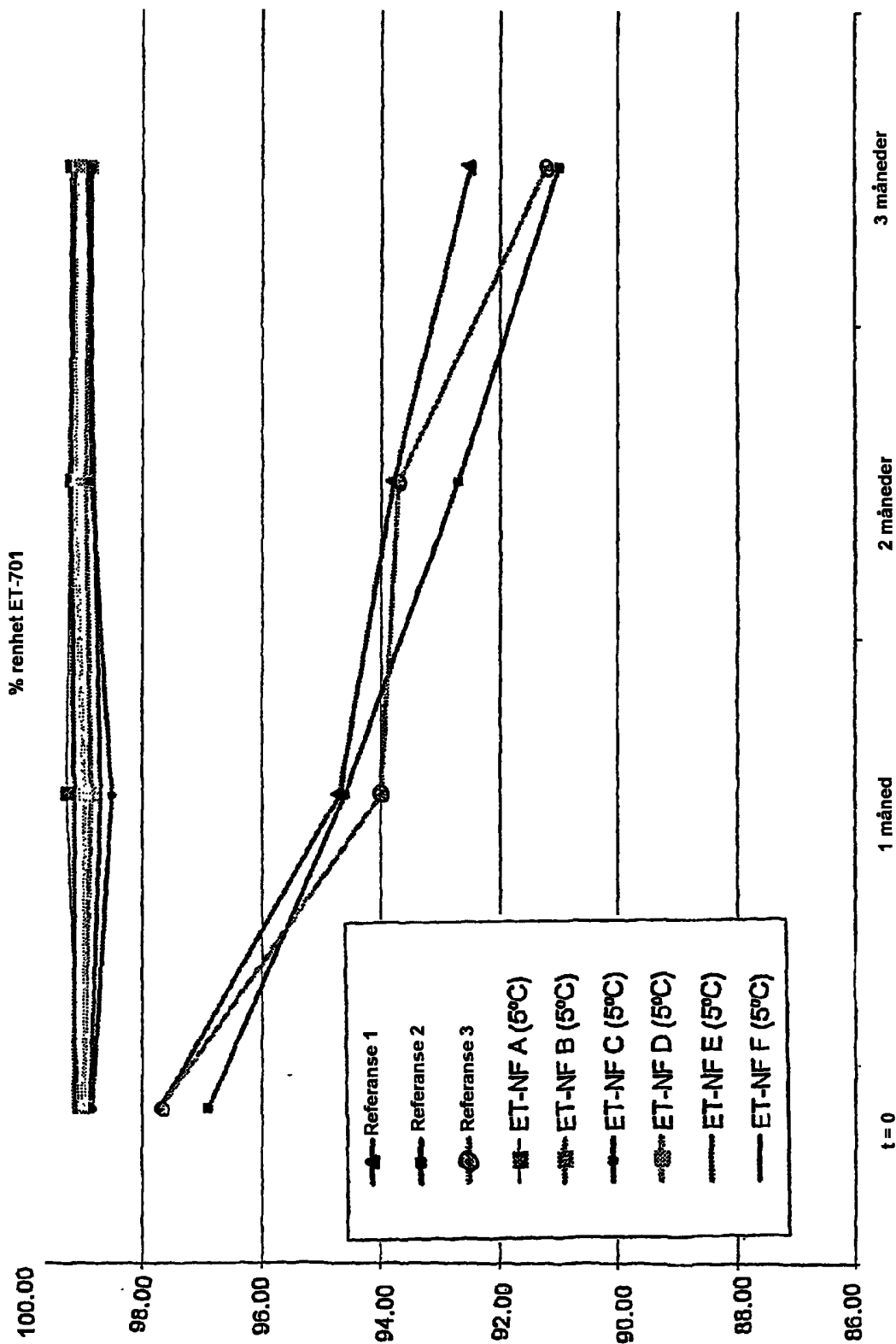
Figur 1



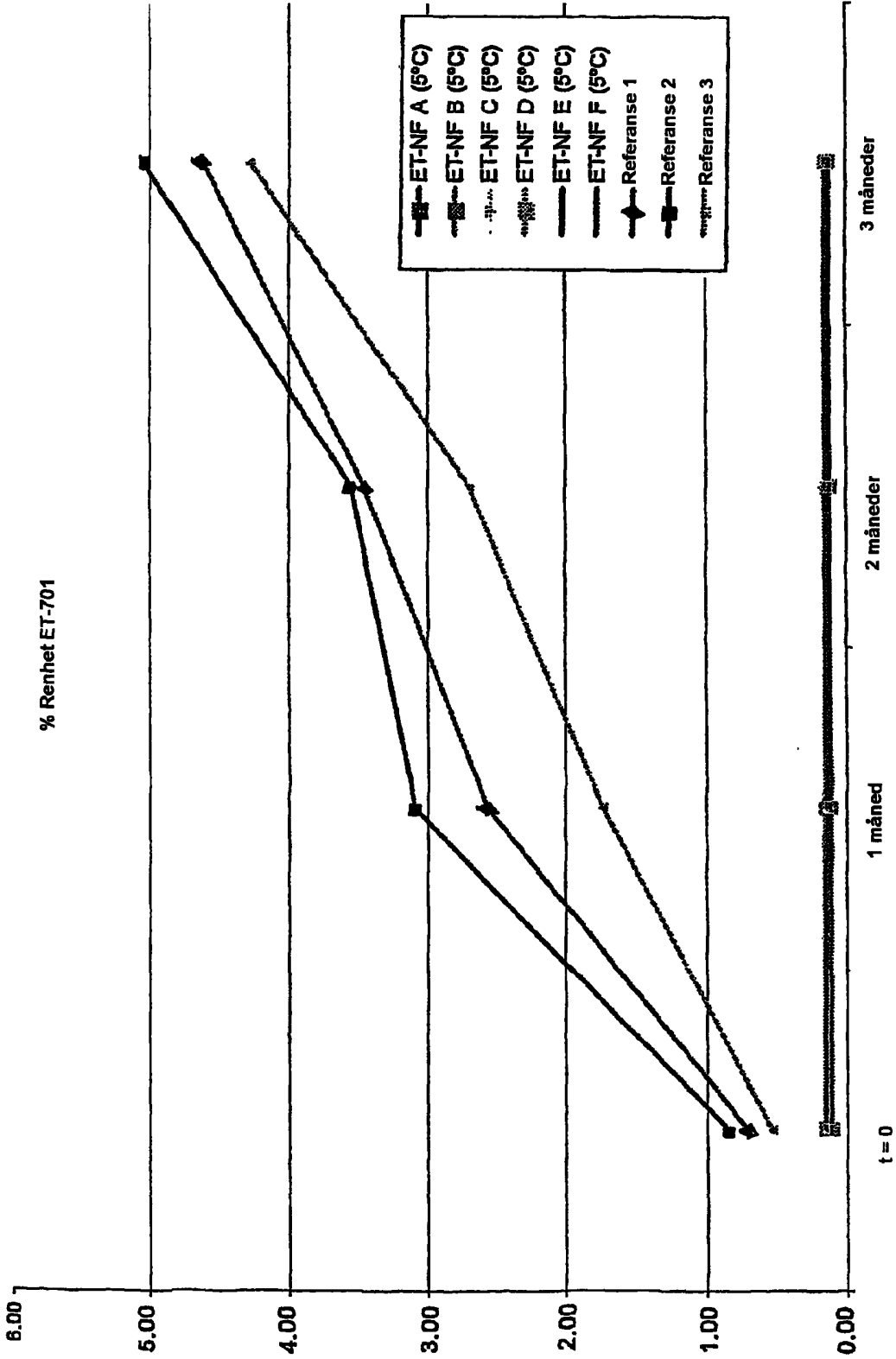
Figur 2



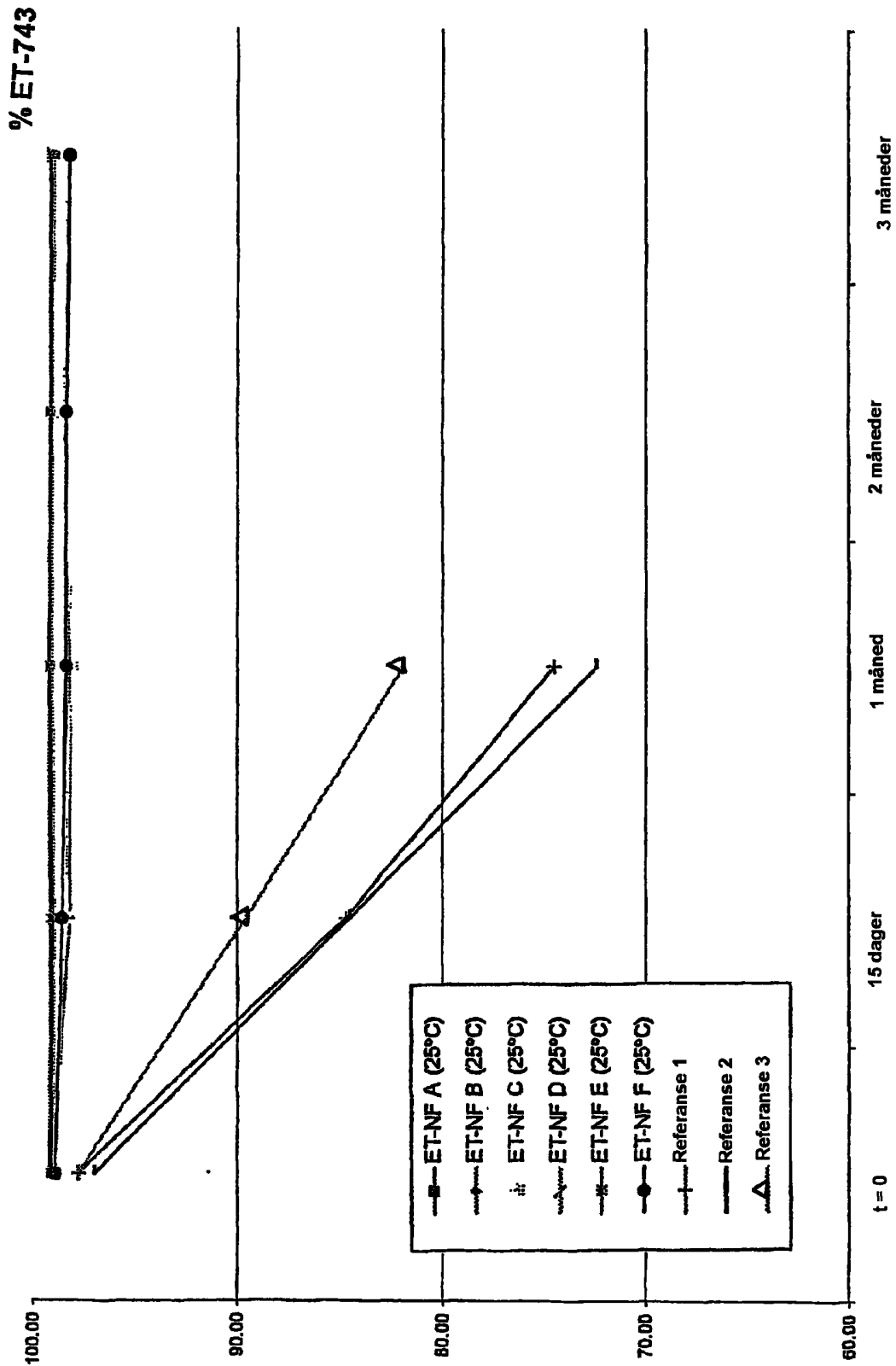
Figur 3



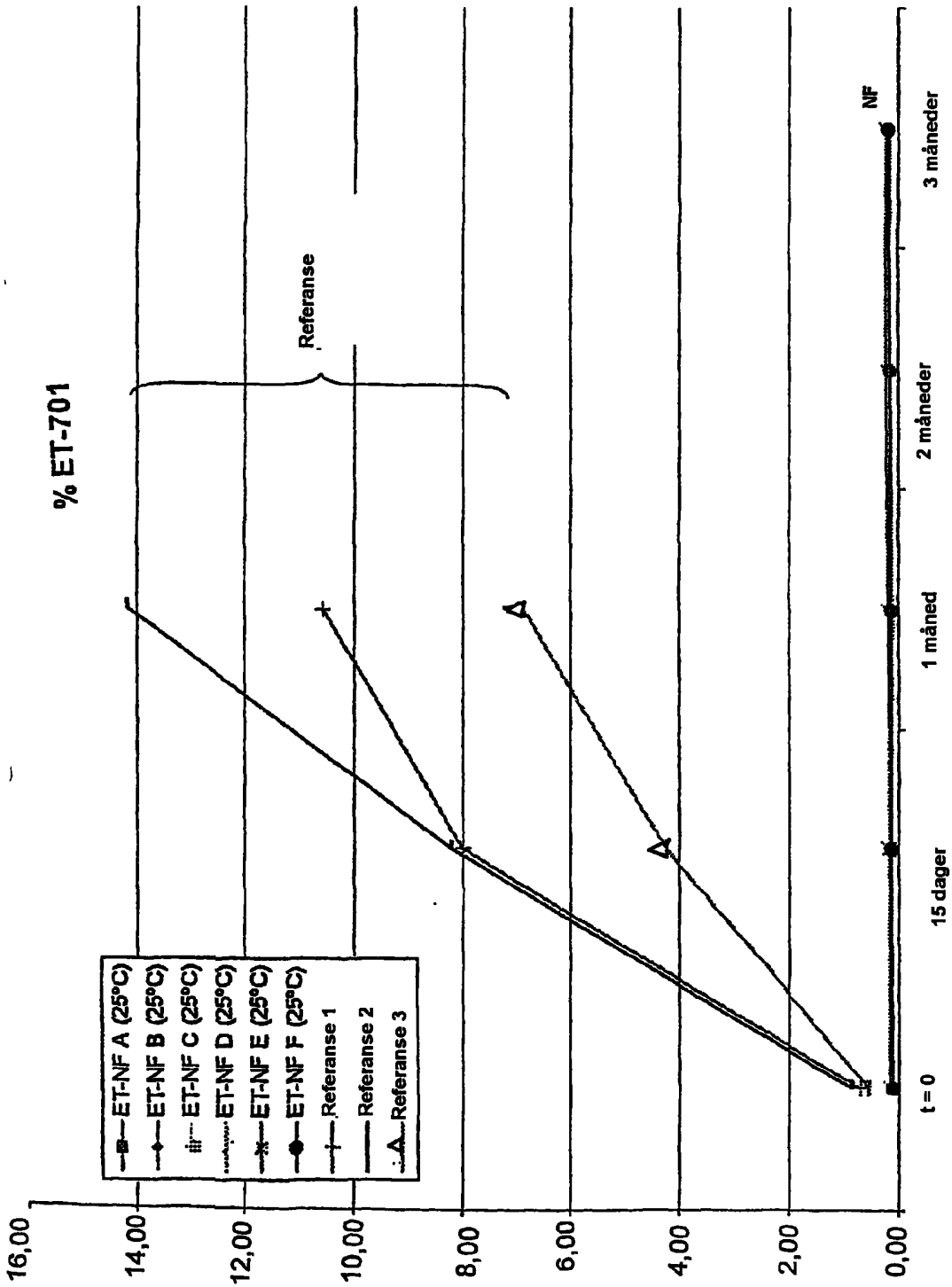
Figur 4



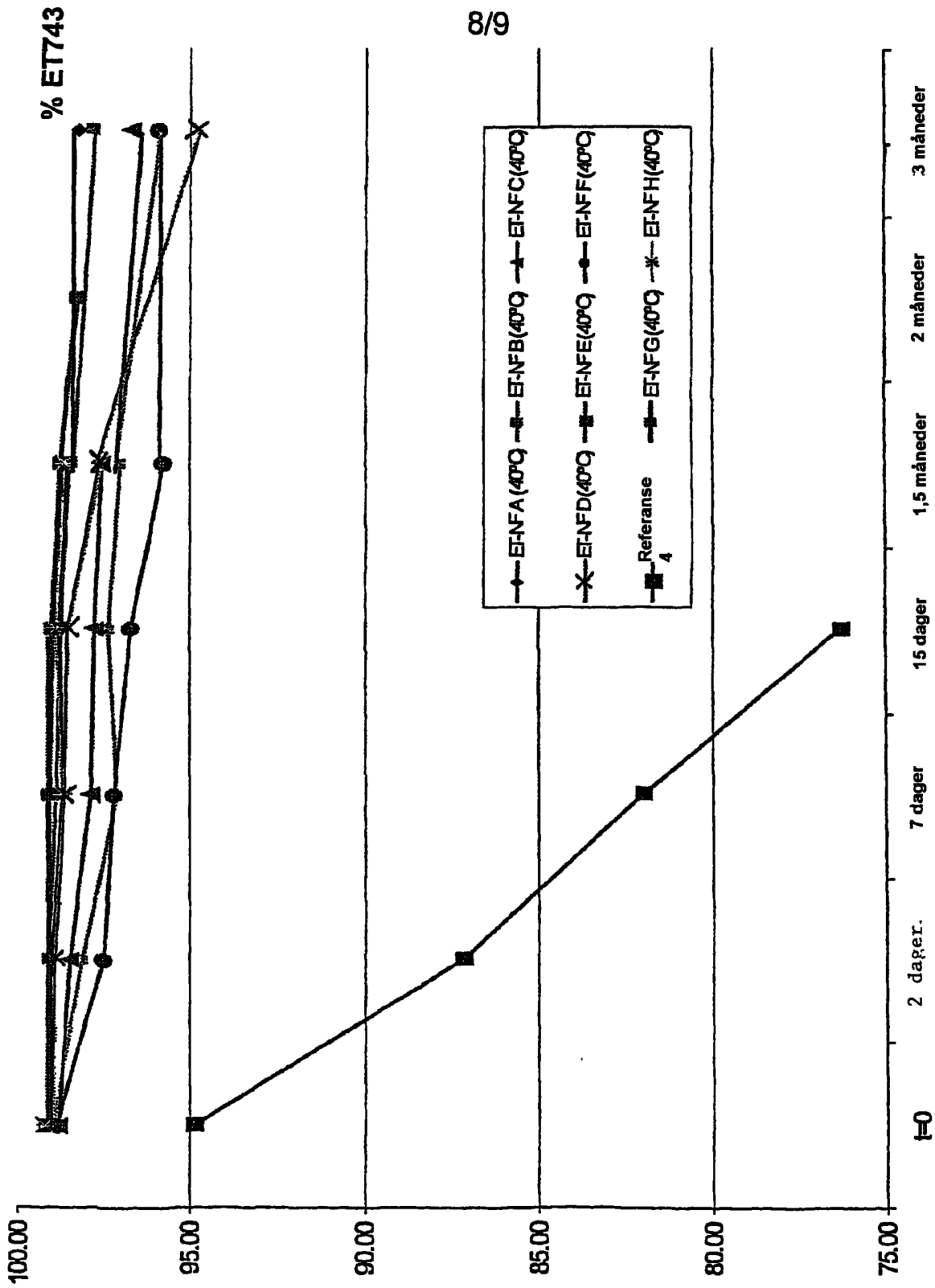
Figur 5



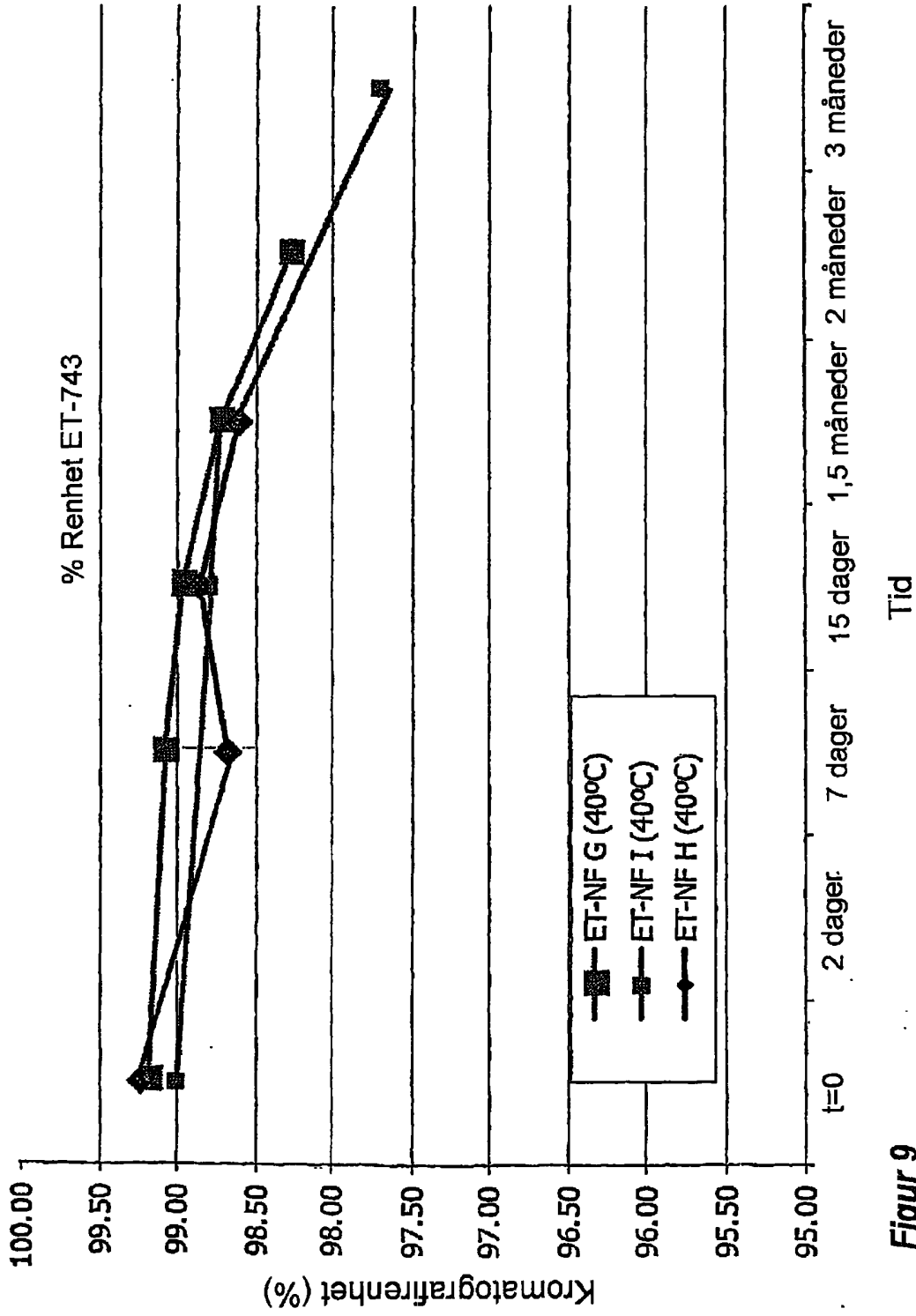
Figur 6



Figur 7



Figur 8



Figur 9