

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 979**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/05** (2006.01)  
**A61K 47/10** (2007.01)  
**A61K 47/12** (2006.01)  
**A61K 47/26** (2006.01)  
**F26B 5/06** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2012** E 17173249 (8)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2020** EP 3228319

54 Título: **Preparación liofilizada de dipéptidos citotóxicos**

30 Prioridad:

**28.04.2011 SE 1150371**  
**15.09.2011 US 201161535126 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.03.2021**

73 Titular/es:

**ONCOPEPTIDES AB (100.0%)**  
**Västra Trädgårdsgatan 15**  
**111 53 Stockholm, SE**

72 Inventor/es:

**SPIRA, JACK y**  
**LEHMANN, FREDRIK**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 813 979 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Preparación liofilizada de dipéptidos citotóxicos

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a preparaciones farmacéuticas liofilizadas que comprenden dipéptidos citotóxicos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, a procedimientos para su preparación, a composiciones que comprenden las preparaciones farmacéuticas liofilizadas y a su uso en el tratamiento del cáncer.

**Antecedentes de la técnica**

10 El cáncer es una enfermedad que es difícil de curar y que puede ser letal. En consecuencia, se están realizando constantemente intentos de desarrollar nuevas terapias para cáncer en la sociedad de investigación. La amplia mayoría de cánceres están presentes como tumores sólidos, por ejemplo cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata, mientras que el resto son tumores malignos hematológicos y linfoides, por ejemplo leucemias y linfomas.

15 Se usa con frecuencia quimioterapia en un intento de curar o paliar la enfermedad. Ya que las células de cáncer se dividen típicamente de forma rápida, la quimioterapia habitualmente actúa destruyendo rápidamente células en división. En el sentido amplio, la mayoría de fármacos quimioterapéuticos actúan alterando la mitosis (es decir la división celular), dirigiéndose eficazmente a células de división rápida. Ya que estos fármacos provocan daño a células se denominan citotóxicos. Algunos fármacos provocan que las células experimenten apoptosis (denominada "muerte celular programada"). Con frecuencia se usa quimioterapia de combinación, cuando se usan dos o más fármacos que tienen modos de acción diferentes juntos para optimizar el efecto antitumoral, minimizar efectos secundarios y evitar el desarrollo de resistencia. Los resultados obtenidos con quimioterapia varían según el tipo tumoral. Algunos tumores son muy sensibles y el tratamiento tiene entonces una alta probabilidad de conducir a cura.

20 Los fármacos quimioterapéuticos pueden generalmente dividirse en agentes alquilantes, antimetabolitos, antraciclinas, alcaloides vegetales, inhibidores de topoisomerasa y otros agentes antitumorales. Los fármacos afectan a la división celular o la síntesis de ADN.

25 Como fármacos quimioterapéuticos en el tratamiento de una amplia diversidad de enfermedades neoplásicas, se usan agentes alquilantes, tales como fármacos derivados de mostaza de nitrógeno, es decir derivados de bis(2-cloroetil)amina. Los agentes alquilantes tienen la capacidad de unir covalentemente grupos alquilo a sitios electronegativos en células. Por lo tanto, estos agentes actúan alterando la función celular formando enlaces covalentes con heteroátomos en moléculas importantes biológicamente como ARN, ADN y proteínas. Son ejemplos de agentes alquilantes mecloretamina, ciclofosfamida, clorambucilo, ifosfamida, temozolomida y melfalán que modifican químicamente el ADN de una célula.

30 El documento WO01/96367 desvela di y tripéptidos alquilantes y uno o dos aminoácidos adicionales o derivados de aminoácidos. Se ha demostrado que estos derivados tienen una eficacia mejorada en una diversidad de tipos tumorales.

35 Melfalán, es decir, *p*-[bis-(2-cloroetil)amino]fenilalanina, es un conjugado de mostaza de nitrógeno y el aminoácido fenilalanina, que se sintetizó a mediados de los años cincuenta (Patente de Estados Unidos n.º 3.032.584). Esta sustancia alquilante clásica se convirtió pronto en un fármaco valioso en el campo quimioterapéutico y aún es importante en el tratamiento de, por ejemplo, mieloma. El uso clínico de melfalán en el tratamiento de tumores sólidos de estadio tardío ha tenido, sin embargo, eficacia limitada. En la búsqueda de una acción más selectiva en células malignas se han sintetizado por lo tanto análogos de melfalán.

40 Larionov L. F., Cancer Res (1961), 21, 99-104 desvela diversos derivados relacionados con melfalán.

Los archivos de registro STN RN: 1060633-95-5, RN: 88 7609-28-1, RN 790650-89-4, RN: 781606-39-1, RN: 773046-98-3, RN: 767621-58-9, RN: 760165-58-0 y RN: 757941-61-0 desvelan diversos derivados relacionados con melfalán.

Koltun, M y col., Biopharmaceutics & Drug disposition (210), 31, 450-454 desvela formas de melfalán.

Ma D Q y col., International Journal of Pharmaceutics (1999), 189, 227-234 desvela formas de melfalán.

45 Murav'ev I y col., Farmatsiya (1978), 27, (2), 13-15 (con resumen en Chemical Abstracts n.º 1978: 412066) desvela derivados relacionados con melfalán.

Baheti y col., Journal of Excipients and Food Chemicals, 2010, 1(1), 41-54, describe excipientes usados en diversas formulaciones liofilizadas de moléculas pequeñas.

50 La liofilización o criodesecación es un procedimiento para deshidratar muestras usadas para preservar o aumentar la estabilidad o para detener la degradación. Debido al bajo contenido de agua de productos liofilizados, típicamente aproximadamente 1-4 %, la acción de microorganismos y enzimas se inhibe y se aumenta de este modo la vida del producto. En liofilización, la muestra para liofilizar se disuelve en una solución acuosa y se congela posteriormente

después de lo cual se reduce la presión circundante. La muestra se somete después a sublimación, opcionalmente mediante la aplicación de calor, para sublimar el agua congelada directamente de la fase sólida a la fase gaseosa. El contenido de agua final en el producto es muy bajo, típicamente de aproximadamente 1 % a 4 %. La liofilización se usa habitualmente en el campo farmacéutico para aumentar la vida útil de productos farmacéuticos.

## 5 **Sumario de la invención**

En general, los derivados de éster dipeptídicos lipófilos padecen una escasa solubilidad en soluciones acuosas. Por lo tanto, el uso de disolventes orgánicos, tales como DMA (dimetilacetamida), es necesario para disolver dichos dipéptidos. Sin embargo, los disolventes orgánicos son con frecuencia tóxicos y pueden también provocar la destrucción de dispositivos médicos usados para la administración de los dipéptidos a sujetos, tales como pacientes de cáncer. En consecuencia, para superar los problemas con la disolución y proporcionar los dipéptidos citotóxicos en un disolvente orgánico, existe la necesidad de preparaciones farmacéuticas alternativas de dipéptidos citotóxicos que tengan suficiente solubilidad en soluciones fisiológicamente aceptables.

La presente invención se refiere a preparaciones liofilizadas que comprenden etil éster de melfalanil-L-p-fluorofenilalanina, también conocido como melfalán flufenamida, así como sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en particular, clorhidrato de etil éster de melfalanil-L-p-fluorofenilalanina, también conocido como clorhidrato de melfalán flufenamida o J1.

Un aspecto de la presente invención se refiere a una preparación farmacéutica liofilizada que comprende

- (i) melfalán flufenamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y
- (ii) al menos un excipiente seleccionado del grupo que comprende  $\beta$ -ciclodextrina;  $\alpha$ -ciclodextrina; hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; y sulfobutiléter- $\beta$ -ciclodextrina.

Un aspecto más de la presente invención es una preparación farmacéutica liofilizada que es soluble en una solución acuosa.

Un aspecto más de la presente invención es un procedimiento para la preparación de una preparación farmacéutica liofilizada como se describe en el presente documento, por el que:

- a. se disuelve melfalán flufenamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en un disolvente orgánico para obtener una solución de melfalán flufenamida;
- b. se añade agua a la solución de melfalán flufenamida para obtener una solución de melfalán flufenamida acuosa, en una concentración de aproximadamente 0,2-3,0 mg/ml;
- c. se añade al menos un excipiente seleccionado del grupo que comprende  $\beta$ -ciclodextrina;  $\alpha$ -ciclodextrina; hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; y sulfobutiléter- $\beta$ -ciclodextrina a la solución de melfalán flufenamida; y
- d. la solución acuosa de melfalán flufenamida que contiene excipiente(s) se somete a liofilización.

Un aspecto más de la invención es un kit de partes, que comprende un primer recipiente que comprende una preparación farmacéutica liofilizada como se define en el presente documento, y un segundo recipiente que comprende una solución fisiológicamente aceptable.

Un aspecto de la presente invención es una preparación farmacéutica liofilizada como se describe en el presente documento, para su uso como un medicamento.

Se desvela en el presente documento un kit de partes como se describe en el presente documento, para su uso como un medicamento.

Un aspecto de la presente invención es una preparación farmacéutica liofilizada como se describe en el presente documento, para uso en el tratamiento y/o la prevención del cáncer, tal como cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, mesotelioma, mieloma múltiple, cáncer de mama y/o cualquier cáncer sólido o hematológico.

Aún un aspecto de la invención es un kit de partes como se describe en el presente documento, para uso en el tratamiento y/o la prevención del cáncer, tal como cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, mesotelioma, mieloma múltiple, cáncer de mama y/o cualquier cáncer sólido o hematológico. Se desvela en el presente documento un procedimiento para el tratamiento y/o la prevención de cáncer, tal como cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, mesotelioma, mieloma múltiple, cáncer de mama y/o cualquier cáncer sólido o hematológico, por el que una preparación farmacéutica liofilizada como se describe en el presente documento se administra en una dosis terapéuticamente eficaz a un sujeto que lo necesite.

A no ser que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque pueden usarse procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente

documento en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen a continuación procedimientos y materiales adecuados.

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, dibujos, ejemplos y de las reivindicaciones.

## 5 **Breve descripción de los dibujos**

Las Figuras 1A-D contienen gráficas de cuatro mediciones de velocidad de disolución repetidas de melfalán flufenamida liofilizada sin excipientes por el procedimiento A de acuerdo con el Ejemplo 2. Se extrajeron muestras en los puntos temporales indicados y se determinó la cantidad de melfalán flufenamida disuelta por HPLC. El eje y muestra la cantidad de melfalán flufenamida en mg/ml.

10 Las Figuras 2A-E contienen gráficas de mediciones de velocidad de disolución de melfalán flufenamida liofilizada en presencia de excipientes como se indica en las figuras por el procedimiento A de acuerdo con el Ejemplo 2. Se extrajeron muestras en los puntos temporales indicados y se determinó la cantidad de melfalán flufenamida disuelta mediante HPLC. El eje y muestra la cantidad de melfalán flufenamida en mg/ml.

15 La Figura 3 es una gráfica de medición de velocidad de disolución de melfalán flufenamida sin excipientes mediante el procedimiento B de acuerdo con el Ejemplo 2. Se extrajeron muestras en los puntos temporales indicados y se determinó la cantidad de melfalán flufenamida disuelta mediante HPLC. El eje y muestra la cantidad de melfalán flufenamida en mg/ml.

20 Las Figuras 4A-E contienen gráficas de mediciones de velocidad de disolución de melfalán flufenamida liofilizada en presencia de excipientes como se indica en las figuras por el procedimiento B. Se extrajeron muestras en los puntos temporales indicados y se determinó la cantidad de melfalán flufenamida disuelta mediante HPLC. El eje y muestra la cantidad de melfalán flufenamida en mg/ml.

25 La Figura 5 contiene gráficas de mediciones de velocidad de disolución de la siguiente manera, A: melfalán flufenamida liofilizada sin Polisorbato 80; B melfalán flufenamida liofilizada en presencia de Polisorbato 80 10 %; C melfalán flufenamida liofilizada en presencia de Polisorbato 80 al 50 %; D melfalán flufenamida liofilizada en presencia de Polisorbato 80 al 100 %. Las cantidades son relativas a la cantidad de melfalán flufenamida. El eje y muestra la cantidad disuelta de melfalán flufenamida en relación con el patrón interno como se determina usando HPLC.

30 La Figura 6 es una fotografía de tubos de vidrio con melfalán flufenamida (J1) que después de la liofilización se disuelve en una concentración de 1 mg/ml en una solución de glucosa al 5 % que contiene Polisorbato 80 50 % (mol) (izquierda) y sin Polisorbato 80 (derecha).

La Figura 7 contiene fórmulas estructurales para melfalán flufenamida (etil éster de L-melfalanil-L-*p*-fluorofenilalanina), isopropil éster de L-melfalanil-L-*p*-fluorofenilalanina (JV28), etil éster de L-melfalanil-L-*p*-fluorofenilalanina (J3).

## **Descripción detallada de la invención**

35 Los dipéptidos citotóxicos no liofilizados o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos pueden tener una baja solubilidad en soluciones acuosas, que pueden necesitar el uso de disolventes orgánicos, tales como DMA (dimetilacetamida), para disolver dichos dipéptidos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Por lo tanto, cuando se va a administrar un dipéptido citotóxico a un paciente, la sustancia tiene que disolverse en primer lugar en un disolvente orgánico, tal como DMA, y a continuación diluirse en una solución para infusión antes de la administración al paciente. El paciente se expone por este procedimiento a disolventes orgánicos, cuya exposición puede ser peligrosa para el paciente. Además, el disolvente orgánico puede destruir los dispositivos médicos usados para la administración de melfalán flufenamida a sujetos, tales como pacientes de cáncer.

45 Los presentes inventores han descubierto ahora sorprendentemente que cuando ciertos dipéptidos citotóxicos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos se liofilizan en presencia de un excipiente, la preparación farmacéutica liofilizada resultante puede tener una solubilidad aún mayor en una solución fisiológicamente aceptable. De hecho, la solubilidad puede ser tan alta que la etapa de disolver el dipéptido citotóxico o sal farmacéuticamente aceptable del mismo en un disolvente orgánico puede omitirse y el dipéptido citotóxico puede disolverse directamente en una solución acuosa fisiológicamente aceptable, y administrarse a un paciente. Preferentemente, dicho dipéptido citotóxico es melfalán flufenamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

50 En preparaciones previas, se obtuvo melfalán flufenamida de síntesis como un polvo blanco en forma cristalina. La forma cristalina solamente puede disolverse en soluciones acuosas altamente ácidas, lo que para fines de fabricación prácticos es imposible. La presencia de excipientes como tales, no ha mejorado suficientemente la solubilidad. Por lo tanto, previamente la melfalán flufenamida se había disuelto en su lugar en DMA (dimetilacetamida) en una solución de glucosa. La preparación es factible pero inestable: 7 % de degradación/h. Además, se produce dimerización y la solución se vuelve amarillo brillante. Esa preparación fue, sin embargo, inestable y la velocidad de polimerización varió

de una manera inaceptable.

En consecuencia, existe la necesidad de identificar vías alternativas para proporcionar una preparación que comprende melfalán flufenamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma que sea soluble con estabilidad aumentada. Además, la preparación debería ser soluble en agua para evitar asuntos negativos de tener un disolvente orgánico en el producto que se proporciona al paciente (tal como DMA).

Un aspecto de la presente invención es una preparación farmacéutica liofilizada que comprende

- (i) melfalán flufenamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y
- (ii) al menos un excipiente seleccionado del grupo que comprende  $\beta$ -ciclodextrina;  $\alpha$ -ciclodextrina; hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; y sulfobutiléter- $\beta$ -ciclodextrina.

10 En otra realización de este aspecto, dicho melfalán flufenamida es clorhidrato de melfalán flufenamida (J1).

En otro aspecto de la invención, se proporciona una preparación farmacéutica que comprende

- (i) clorhidrato de melfalán flufenamida (J1); y
- (ii) al menos un excipiente seleccionado del grupo que comprende  $\beta$ -ciclodextrina;  $\alpha$ -ciclodextrina; hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; y sulfobutiléter- $\beta$ -ciclodextrina.

15 La invención proporciona una preparación liofilizada que es estable en forma seca y soluble en una solución acuosa sin presencia de un disolvente orgánico. Aunque ha sido posible previamente preparar una preparación liofilizada de melfalán flufenamida solamente, esta preparación se disolvió demasiado lentamente en soluciones acuosas en comparación con el momento de degradación. La incorporación de un excipiente en la preparación de melfalán flufenamida liofilizada (mediante solución inicial en un disolvente orgánico) mejora el tiempo de reconstitución considerablemente, pero no altera significativamente la estabilidad de melfalán flufenamida reconstituida. Como resultado, se amplía la ventana temporal para la melfalán flufenamida reconstituida, y esto mejora los tratamientos de pacientes, por ejemplo permitiendo velocidades de infusión más bajas, cuando sea necesario. Una preparación "sin presencia de un disolvente orgánico" podría incluir cantidades traza de disolvente orgánico, típicamente menor de 0,5 % (p/p).

25 La preparación farmacéutica liofilizada de melfalán flufenamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como se describe en el presente documento, es un polvo blanco, suave, a diferencia de una melfalán flufenamida no liofilizada o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, que puede estar en forma de un polvo denso, ligeramente amarillento.

30 Típicamente, la liofilización comprende cuatro etapas, pretratamiento, congelación, secado primario y secado secundario. En la etapa de pretratamiento, la sustancia para liofilizar se prepara para la liofilización por ejemplo preparando una solución que tiene la concentración deseada o mezclando la sustancia con componentes adicionales para obtener un resultado aceptable. La etapa de congelación puede realizarse en un matraz de liofilización en un baño enfriado por ejemplo por refrigeración mecánica, hielo seco y metanol, o nitrógeno líquido. Están disponibles máquinas de liofilización para liofilización a mayor escala. Habitualmente, las temperaturas de congelación son de entre -50 °C y -80 °C.

En la etapa de secado primaria, la presión se redujo hasta el intervalo de algunos kilopascales, y puede proporcionarse calor para que el agua se sublime desde el material. La cantidad de calor necesaria puede calcularse usando el calor de sublimación latente de las moléculas que se van a sublimar. La duración de este periodo depende, pero puede durar varios días para conservar la estructura de los materiales.

40 El objetivo de la etapa de secado secundaria final es retirar cualquier molécula de agua no congelada. En esta fase, la temperatura puede ser de hasta por encima de 0 °C, para romper cualquier interacción físico-química que se haya formado entre las moléculas de agua y el material congelado.

En el contexto de la presente invención, debe entenderse que se liofiliza melfalán flufenamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. Se entiende por lo tanto que la expresión "una preparación farmacéutica liofilizada de una melfalán flufenamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma", significa que la melfalán flufenamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma está liofilizada.

Aspectos adicionales de la presente invención proporcionan melfalán flufenamida liofilizada o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, un kit de partes que comprende dicha melfalán flufenamida, procedimientos para preparación de dicha melfalán flufenamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, composiciones que comprenden dicha melfalán flufenamida liofilizada o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y usos de la misma.

"Liofilización", "liofilizado", etc. puede usarse en el presente contexto indistintamente con "criodesecación", "criodesecado", etc.

- Se exponen ejemplos de dipéptidos citotóxicos que pueden liofilizarse como se describe en el presente documento pero que no quedan dentro de las reivindicaciones en el documento WO01/96367. El extremo N terminal de una molécula debería preferentemente no estar protegido como amida o carbamato. Esto significa que R<sub>4</sub> en fórmula I en el mismo no debería preferentemente ser un grupo protector, tal como formilo, acetilo o propionilo, o benzoilo, ya que la forma protegida del compuesto en general tiene una actividad citotóxica menor que la forma libre correspondiente.
- Los aminoácidos naturales se refieren a aminoácidos que existen normalmente y ejercen sus funciones en organismos vivos. Los aminoácidos modificados se refieren a aminoácidos que se han modificado de alguna manera en una estructura química y composición química diferentes de un aminoácido natural. Un ejemplo de un aminoácido cíclico natural es la prolina. Son ejemplos de aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina, triptófano e histidina.
- Los dipéptidos citotóxicos, tales como melfalán flufenamida, también pueden contener proporciones no naturales de isótopos atómicos en uno o más de sus átomos. Por ejemplo, los compuestos pueden radiomarcarse con isótopos radiactivos, tales como, por ejemplo, tritio (<sup>3</sup>H), deuterio (<sup>2</sup>H), yodo-125 (<sup>125</sup>I) o carbono-14 (<sup>14</sup>C).

El dipéptido citotóxico melfalán flufenamida difiere claramente de melfalán:

- Diferencia en estructura (melfalán flufenamida es un etil éster en el extremo C terminal en lugar del ácido carboxílico en melfalán. Melfalán es por lo tanto un zwitterión, pero melfalán flufenamida no).
- Diferencia en tamaño (melfalán flufenamida es un dipéptido, es decir, aproximadamente el doble del tamaño de melfalán).
- Diferencia en la lipofilia, siendo melfalán flufenamida claramente más lipófila.
- Diferencia en la estabilidad en soluciones acuosas. El melfalán es 10.000 veces más estable en soluciones acuosas en comparación con J1. J1 se hidroliza rápidamente en agua.
- Diferencia en las rutas de degradación. La principal ruta de degradación en melfalán flufenamida implica hidrólisis del etil éster, mientras que la principal degradación en melfalán se refiere a la reactividad de los grupos de (cloro)alquilo.

Basándose en, pero sin limitación, las diferenciaciones anteriores, está claro que las enseñanzas sobre el melfalán y, en particular, preparaciones y formulaciones del mismo, no se aplican a melfalán flufenamida y preparaciones y formulaciones de la misma.

La inclusión de al menos un excipiente proporciona preparación liofilizada que es estable como tal e hidrosoluble sin la presencia de un disolvente orgánico a una tasa suficiente en comparación con la tasa de degradación y es, por lo tanto, útil en terapia y menos tóxico.

- La preparación farmacéutica liofilizada de acuerdo con la invención puede contener solamente melfalán flufenamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, o una mezcla de melfalán flufenamida con uno o más dipéptidos citotóxicos diferentes o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Además, la preparación farmacéutica liofilizada puede contener una mezcla de dos o más sales farmacéuticamente aceptables diferentes.

Un aspecto de la invención es una preparación farmacéutica liofilizada, que comprende

- (i) melfalán flufenamida; y
- (ii) una combinación de dos o más excipientes seleccionados del grupo que comprende un polisorbato; un polietilenglicol; β-ciclodextrina; α-ciclodextrina; hidroxipropil-β-ciclodextrina; sulfobutiléter-β-ciclodextrina; lactosa; alcohol bencílico; succinato disódico; propilenglicol; Cremofor EL; Dimetilsulfóxido; D-manitol; Trehalosa; Sacarosa; y un aminoácido.

Un aspecto más de la invención es una preparación farmacéutica liofilizada que comprende:

- (i) clorhidrato de melfalán flufenamida (J1); y
- (ii) una combinación de dos o más excipientes seleccionados del grupo que comprende un polisorbato; un polietilenglicol; β-ciclodextrina; α-ciclodextrina; hidroxipropil-β-ciclodextrina; sulfobutiléter-β-ciclodextrina; lactosa; alcohol bencílico; succinato disódico; propilenglicol; Cremofor EL; Dimetilsulfóxido; D-manitol; Trehalosa; Sacarosa; y un aminoácido.

Las sales farmacéuticamente aceptables para todos los aspectos de la presente invención pueden ser, por ejemplo, una sal de adición de ácidos de un compuesto descrito en el presente documento que es suficientemente básica, por ejemplo, una sal de adición de ácidos, por ejemplo, con un ácido inorgánico u orgánico, por ejemplo ácido clorhídrico, bromhídrico, nítrico, metanosulfónico, sulfúrico, fosfórico, trifluoroacético, paratolueno sulfónico, 2-mesitileno sulfónico, cítrico, acético, tartárico, fumárico, láctico, succínico, málico, malónico, maleico, 1,2-etanodisulfónico, adípico, aspártico, bencenosulfónico, benzoico, etanosulfónico o nicotínico.

En este documento, cuando se usa la expresión “melfalán flufenamida”, también se pretende incluir sal o sales farmacéuticamente aceptables de la misma, incluso si esto no se indica explícitamente.

Como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, cuando melfalán flufenamida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se liofiliza en presencia de un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como uno cualquiera seleccionado de un polisorbato; un polietilenglicol;  $\beta$ -ciclodextrina;  $\alpha$ -ciclodextrina; hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; sulfobutiléter- $\beta$ -ciclodextrina; lactosa; alcohol bencílico; succinato disódico; propilenglicol; Cremofor EL; dimetil sulfóxido; D-manitol; trehalosa; sacarosa; y un aminoácido; puede obtenerse un aumento inesperadamente alto de la solubilidad de la preparación farmacéutica liofilizada, lo que permite la disolución directa de la melfalán flufenamida liofilizada en una solución acuosa, tal como una solución fisiológicamente aceptable. Esto está en contraste con una melfalán flufenamida no liofilizada que no es posible disolver directamente en una solución acuosa pero que primero tiene que disolverse en un disolvente orgánico antes la dilución en una solución acuosa. Se desvela por lo tanto en el presente documento una preparación farmacéutica liofilizada que comprende melfalán flufenamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que melfalán flufenamida se liofiliza en presencia de un excipiente.

La melfalán flufenamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma puede liofilizarse en presencia de uno o más de un excipiente o excipientes (p. ej., uno, dos, tres, cuatro, cinco o más excipientes). Los ejemplos de excipientes que pueden usarse como se describe en el presente documento incluyen, sin limitación, polisorbatos tales como polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60 y polisorbato 80; polietilenglicoles tales como PEG 400 y PEG 300;  $\beta$ -ciclodextrina,  $\alpha$ -ciclodextrina, sulfobutiléter- $\beta$ -ciclodextrina, hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, lactosa, alcohol bencílico, succinato disódico, propilenglicol, Cremofor EL, dimetil sulfóxido, D-manitol, trehalosa, sacarosa y aminoácidos tales como histidina.

En un aspecto de la invención, el excipiente se selecciona de una cualquiera de  $\beta$ -ciclodextrina;  $\alpha$ -ciclodextrina; hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; y sulfobutiléter- $\beta$ -ciclodextrina.

La cantidad de excipiente tal como  $\beta$ -ciclodextrina, es normalmente de aproximadamente 10-100 % en peso de la cantidad de melfalán flufenamida, tal como 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 o 10 % en peso de la cantidad de melfalán flufenamida.

En un aspecto más de la invención, la cantidad del excipiente tal como  $\beta$ -ciclodextrina, es normalmente de aproximadamente 10-50 % en peso de la cantidad de melfalán flufenamida, tal como 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 o 10 % en peso de la cantidad de melfalán flufenamida.

Un aspecto más de la invención es una preparación farmacéutica liofilizada que comprende

(i) melfalán flufenamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y

(ii) al menos un excipiente seleccionado del grupo que comprende  $\beta$ -ciclodextrina;  $\alpha$ -ciclodextrina; hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; y sulfobutiléter- $\beta$ -ciclodextrina;

en la que la cantidad del excipiente es de aproximadamente 10-100 % en peso de melfalán flufenamida.

En otra realización de este aspecto, la melfalán flufenamida está representada por clorhidrato de melfalán flufenamida (J1).

Un aspecto más de la invención es una preparación farmacéutica liofilizada que comprende

(i) melfalán flufenamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y

(ii) al menos un excipiente seleccionado del grupo que comprende  $\beta$ -ciclodextrina;  $\alpha$ -ciclodextrina; hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; y sulfobutiléter- $\beta$ -ciclodextrina;

en la que la cantidad del excipiente es de aproximadamente 10-50 % en peso de clorhidrato de melfalán flufenamida (J1).

En otra realización de este aspecto, la melfalán flufenamida está representada por clorhidrato de melfalán flufenamida (J1).

Aún un aspecto más de la invención es una preparación farmacéutica liofilizada que comprende

(i) clorhidrato de melfalán flufenamida (J1); y

(ii) al menos un excipiente seleccionado del grupo que comprende  $\beta$ -ciclodextrina;  $\alpha$ -ciclodextrina; hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; y sulfobutiléter- $\beta$ -ciclodextrina;

en la que la cantidad del excipiente es de aproximadamente 10-100 % en peso de clorhidrato de melfalán flufenamida (J1).

Aún un aspecto más de la invención es una preparación farmacéutica liofilizada que comprende

(i) clorhidrato de melfalán flufenamida (J1); y

(ii) al menos un excipiente seleccionado del grupo que comprende  $\beta$ -ciclodextrina;  $\alpha$ -ciclodextrina; hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; y sulfobutiléter- $\beta$ -ciclodextrina;

5 en la que la cantidad del excipiente es de aproximadamente 10-50 % en peso de clorhidrato de melfalán flufenamida (J1).

En una realización de la invención, la cantidad de excipiente puede ser hasta la cantidad clínicamente aceptable.

10 Un aspecto de la invención es una combinación de los excipientes polisorbato 80, PEG 400 y  $\beta$ -ciclodextrina, tal como 80 % en peso de polisorbato 80, 80 % en peso de PEG 400 y 50 % en peso de  $\beta$ -ciclodextrina, de la cantidad de melfalán flufenamida. Una preparación farmacéutica liofilizada de un derivado de melfalán o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede, de acuerdo con la invención, comprender uno o más derivados de melfalán o una sal o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y uno o más excipientes como se definen en el presente documento.

15 Como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, un efecto de la presencia de un excipiente durante la liofilización es que la preparación farmacéutica liofilizada resultante que comprende melfalán flufenamida tiene una solubilidad potenciada en soluciones acuosas, tales como una solución fisiológicamente aceptable, en comparación con cuando melfalán flufenamida se liofiliza sin un excipiente como se describe en el presente documento. En particular, la solubilidad en soluciones acuosas de melfalán flufenamida cuando se liofiliza en presencia de un excipiente o excipientes es mayor en comparación con la solubilidad del producto no liofilizado. Esta solubilidad  
20 aumentada de melfalán flufenamida, en particular cuando se liofiliza en presencia de un excipiente como se describe en el presente documento, en comparación con el producto no liofilizado, tiene ventajas sustanciales cuando se llega a la administración de melfalán flufenamida a un paciente.

25 Debido a una baja solubilidad de melfalán flufenamida no liofilizada en soluciones fisiológicamente aceptables acuosas usadas para administración del fármaco a un paciente, es necesario disolver en primer lugar la melfalán flufenamida no liofilizada en un disolvente orgánico, tal como DMA. Melfalán flufenamida se almacena con frecuencia por lo tanto disuelta en DMA. Previamente no ha sido posible disolver directamente la melfalán flufenamida en una solución acuosa, sino que se han tenido que usar disolventes orgánicos. Una vez disuelta en el disolvente orgánico, esta solución de melfalán flufenamida y disolvente orgánico puede disolverse en soluciones fisiológicamente aceptables para administración a un sujeto.

30 Ya que la melfalán flufenamida es muy tóxica, para minimizar la exposición del personal médico a dichos fármacos, se usan dispositivos especiales para transferir los fármacos después de disolución en disolventes orgánicos a la solución para administración. Estos dispositivos de transferencia son con frecuencia tubos de plástico que comprenden policarbonato. Sin embargo, dichos tubos son sensibles a y pueden ser destruidos por disolventes orgánicos, tales como DMA. Por lo tanto, en los casos en los que el fármaco para administrar está disuelto en dicho disolvente orgánico,  
35 es posible que no pueda usarse el dispositivo de transferencia, y en su lugar el fármaco disuelto tiene que añadirse directamente a la solución fisiológicamente aceptable usada para administración justo antes del momento de la administración al paciente. Esto puede ser peligroso para el personal médico, que están por lo tanto en riesgo de exponerse al fármaco tóxico.

40 Como se ha mencionado anteriormente, la liofilización de melfalán flufenamida aumenta su solubilidad en soluciones fisiológicamente aceptables. Este aumento puede ser aún más pronunciado cuando se liofiliza melfalán flufenamida en presencia de uno o más excipientes. Como se describe en el presente documento, cuando se liofiliza melfalán flufenamida en presencia de un excipiente como se desvela en el presente documento, la solubilidad de melfalán flufenamida puede aumentarse, en comparación con la melfalán flufenamida no liofilizada. Puede evitarse el uso de un disolvente orgánico, tal como DMA, para disolver en primer lugar melfalán flufenamida.

45 Melfalán flufenamida que se ha liofilizado en presencia de al menos un excipiente, tal como polisorbato que por ejemplo puede ser polisorbato 80; un polietilenglicol que por ejemplo puede ser PEG 400 o PEG 300;  $\beta$ -ciclodextrina;  $\alpha$ -ciclodextrina; hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; sulfobutiléter- $\beta$ -ciclodextrina; lactosa; alcohol bencílico; succinato disódico; propilenglicol; Cremofor EL; Dimetilsulfóxido; D-manitol; Trehalosa; Sacarosa; o un aminoácido tal como histidina; o una combinación de dos o más de estos excipientes; puede disolverse directamente en una solución fisiológicamente  
50 aceptable, tal como solución de glucosa aproximadamente 4,5-5,5 % p, por ejemplo aproximadamente 5 %, o una solución de NaCl acuosa (por ejemplo NaCl aproximadamente 0,9 % p). Por lo tanto, es posible usar dispositivos que comprenden policarbonato y que se usan para la administración de melfalán flufenamida, minimizando el riesgo de exposición del personal médico al fármaco. Además, de esta manera se evita administrar la DMA tóxica al paciente. Esto permite preparar directamente la solución que comprende melfalán flufenamida a una concentración adecuada  
55 para administración al paciente. Como alternativa, puede prepararse en primer lugar una solución concentrada que comprende una preparación farmacéutica liofilizada de melfalán flufenamida en una solución fisiológicamente aceptable y después transferirse a la bolsa para infusión usando los dispositivos de transferencia usados habitualmente.

Además, cuando se disuelve melfalán flufenamida en DMA, puede formarse un aducto entre la melfalán flufenamida y la DMA. Usando una preparación farmacéutica liofilizada proporcionada de acuerdo con la invención, es posible disolver la melfalán flufenamida liofilizada directamente en una solución fisiológicamente aceptable, evitando en primer lugar disolver la melfalán flufenamida en DMA. Por lo tanto, puede evitarse la formación de aductos de DMA-melfalán flufenamida y no hay que administrar al paciente ni el aducto ni la DMA.

También se proporciona una composición farmacéutica que comprende una preparación farmacéutica liofilizada de melfalán flufenamida o sal farmacéuticamente aceptable de la misma como se define en el presente documento, que puede obtenerse opcionalmente por el procedimiento para preparar dicha preparación liofilizada desvelada en el presente documento. Dicha composición farmacéutica puede comprender además una solución fisiológicamente aceptable, tal como una solución acuosa de NaCl (por ejemplo aproximadamente 0,9 % p) o glucosa (por ejemplo glucosa aproximadamente 4,5-5,5 % p, tal como aproximadamente 5 % p.). Esta composición farmacéutica puede ser una solución concentrada que se pretende diluir antes de la administración a un sujeto o como una solución que permita la administración directa a un paciente.

Debido a la solubilidad aumentada de melfalán flufenamida después de liofilización en presencia de uno o más excipientes como se describe en el presente documento, es posible preparar una solución de melfalán flufenamida disuelta, tal como una composición farmacéutica que comprenda una melfalán flufenamida o sal farmacéuticamente aceptable de la misma, que esté sustancialmente sin disolventes orgánicos tales como DMA, diclorometano, tetrahidrofurano, 2-metil tetrahidrofurano, etil acetato, acetona, dimetilformamida, acetonitrilo, dimetilsulfóxido, dioxano, dietil éter, ácido acético, n-butanol, isopropanol, n-propanol, *terc*-butanol, *sec*-butanol, metanol, etanol y ácido acético. Por "sustancialmente sin" se entiende en el presente documento que la composición farmacéutica comprende solamente cantidades traza de un disolvente orgánico, tal como menos de aproximadamente un total de aproximadamente 0,1 % p de un disolvente orgánico. En un aspecto, la preparación liofilizada o la composición farmacéutica no contienen ninguna cantidad medible de un disolvente orgánico. Dichas preparaciones serían menos tóxicas y por lo tanto más toleradas por un paciente, es decir que proporcionarían menos efectos secundarios tales como vómitos, náuseas u otros síntomas generales cuando se infundan.

En un aspecto de la invención, se proporciona una preparación farmacéutica liofilizada de la invención, que está sin, o sustancialmente sin, disolventes orgánicos.

La invención proporciona una composición farmacéutica que consiste en una preparación farmacéutica liofilizada de la invención, que comprende melfalán flufenamida o sal farmacéutica de la misma, y la solución fisiológicamente aceptable, tal como una solución de glucosa. Como se ha desvelado anteriormente en el presente documento, el derivado de melfalán puede ser melfalán flufenamida o una mezcla de melfalán flufenamida y uno o más dipéptidos citotóxicos diferentes, liofilizados bien juntos o bien por separado.

La composición farmacéutica puede obtenerse por disolución de melfalán flufenamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma en una solución fisiológicamente aceptable. Por lo tanto también se desvela en el presente documento un procedimiento para preparar una composición farmacéutica que comprende la etapa de disolver la preparación farmacéutica liofilizada que comprende melfalán flufenamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma en una solución fisiológicamente aceptable.

La expresión "solución fisiológicamente aceptable" como se define en el presente documento, es una solución acuosa, tal como una solución de NaCl (tal como NaCl aproximadamente 0,9 % p) o solución de glucosa, tal como glucosa aproximadamente 4,5-5,5 % p, por ejemplo aproximadamente 5 % p, u otra solución fisiológicamente aceptable. Cualquiera de dichas soluciones puede estar opcionalmente tamponada.

Una composición farmacéutica que comprende melfalán flufenamida liofilizada y una solución fisiológicamente aceptable para administración directa a un sujeto generalmente comprende melfalán flufenamida a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml o menos, tal como aproximadamente 0,2 mg/ml. Sin embargo, la composición farmacéutica puede comprender melfalán flufenamida en una concentración de hasta aproximadamente 4 mg/ml para dilución en una solución fisiológicamente aceptable antes de su administración a un paciente.

Un aspecto de la invención proporciona un procedimiento para preparar una preparación farmacéutica liofilizada, por el que:

- a) se disuelve melfalán flufenamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en un disolvente orgánico para obtener una solución de melfalán flufenamida;
- b) se añade agua a la solución de melfalán flufenamida para obtener una solución de melfalán flufenamida acuosa, en una concentración de aproximadamente 0,2-3,0 mg/ml;
- c) se añade al menos un excipiente seleccionado del grupo que comprende  $\beta$ -ciclodextrina;  $\alpha$ -ciclodextrina; hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; y sulfobutiléter- $\beta$ -ciclodextrina a la solución de melfalán flufenamida; y
- d) la solución de melfalán flufenamida acuosa que contiene excipiente(s) se somete a liofilización.

En una realización de este aspecto, se proporciona un procedimiento, por el que:

- a) se disuelve melfalán flufenamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en un disolvente orgánico;
- 5 b) se añade agua a la solución obtenida en la etapa a) para obtener una solución de dicha melfalán flufenamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en una concentración de aproximadamente 0,2-3,0 mg/ml;
- c) se añade al menos un excipiente seleccionado del grupo que comprende  $\beta$ -ciclodextrina;  $\alpha$ -ciclodextrina; hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; y sulfobutiléter- $\beta$ -ciclodextrina a la solución obtenida en la etapa b); y
- d) la solución obtenida en la etapa c) se somete a liofilización.

10 El disolvente orgánico puede seleccionarse de uno cualquiera de etanol, ácido que contiene etanol, glicerina, propilenglicol, alcohol bencílico, dimetilacetamida (DMA), N-metil-2-pirrolidona, isopropanol, n-butanol, *terc*-butanol, metil *terc*-butiléter, propilenglicol, dimetilsulfóxido, tetrahidrofurano, 2-metil tetrahidrofurano, acetona, dimetilformamida, acetonitrilo, dioxano, ácido acético, ácido láctico, ácido propiónico, n-butanol, isopropanol, n-propanol, *terc*-butanol, *sec*-butanol, metanol y una mezcla de etanol y agua. Preferentemente, dicho disolvente orgánico es etanol.

15 El excipiente puede seleccionarse del grupo que comprende  $\beta$ -ciclodextrina;  $\alpha$ -ciclodextrina; hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; y sulfobutiléter- $\beta$ -ciclodextrina.

La melfalán flufenamida en dichos métodos es preferentemente clorhidrato de melfalán flufenamida (J1).

Se desvela en el presente documento un procedimiento para la preparación de una preparación farmacéutica liofilizada como se describe en el presente documento, por el que

- 20 a) se disuelve melfalán flufenamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en un disolvente orgánico;
- b) se añade agua a la solución obtenida en la etapa a) para obtener una solución de dicha melfalán flufenamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en una concentración de 0,2-3,0 mg/ml;
- 25 c) se añade al menos un excipiente como se define en el presente documento, a la solución obtenida en la etapa b); y
- d) la solución obtenida en la etapa c) se somete a liofilización.

Preferentemente, dicho disolvente orgánico es etanol.

Se desvela en el presente documento un procedimiento para la preparación de una preparación farmacéutica liofilizada como se describe en el presente documento, por el que

- 30 a) se disuelve clorhidrato de melfalán flufenamida (J1), en un disolvente orgánico;
- b) se añade agua a la solución obtenida en la etapa a) para obtener una solución de dicho clorhidrato de melfalán flufenamida (J1), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en una concentración de aproximadamente 0,2-3,0 mg/ml;
- 35 c) se añade al menos un excipiente como se define en el presente documento, a la solución obtenida en la etapa b); y
- d) la solución obtenida en la etapa c) se somete a liofilización.

40 Los ejemplos de disolventes orgánicos útiles para disolver melfalán flufenamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma en la etapa a), puede ser uno seleccionado de etanol, ácido que contiene etanol, glicerina, propilenglicol, alcohol bencílico, dimetilacetamida (DMA), N-metil-2-pirrolidona, isopropanol, n-butanol, *terc*-butanol, metil *terc*-butil éter, propilenglicol, dimetilsulfóxido, tetrahidrofurano, 2-metil tetrahidrofurano, acetona, dimetilformamida, acetonitrilo, dioxano, ácido acético, ácido láctico, ácido propiónico, n-butanol, isopropanol, n-propanol, *terc*-butanol, *sec*-butanol, metanol, y una mezcla de etanol y agua.

Se desvela en el presente documento un procedimiento para la preparación de una preparación farmacéutica liofilizada como se describe en el presente documento, por el que

- 45 a) se disuelve melfalán flufenamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en un disolvente orgánico seleccionado de uno cualquiera de etanol, ácido que contiene etanol, glicerina, propilenglicol, alcohol bencílico, dimetilacetamida (DMA), N-metil-2-pirrolidona, isopropanol, n-butanol, *terc*-butanol, metil *terc*-butil éter, propilenglicol, dimetilsulfóxido, tetrahidrofurano, 2-metil tetrahidrofurano, acetona, dimetilformamida, acetonitrilo, dioxano, ácido acético, ácido láctico, ácido propiónico, n-butanol, isopropanol, n-propanol, *terc*-butanol, *sec*-

butanol, metanol, y una mezcla de etanol y agua;

b) se añade agua a la solución obtenida en la etapa a) para obtener una solución de dicha melfalán flufenamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en una concentración de aproximadamente 0,2-3,0 mg/ml;

5 c) se añade al menos un excipiente como se define en el presente documento, a la solución obtenida en la etapa b); y

d) la solución obtenida en la etapa c) se somete a liofilización

Se desvela en el presente documento un procedimiento para la preparación de una preparación farmacéutica liofilizada como se describe en el presente documento, por el que

10 a) se disuelve clorhidrato de melfalán flufenamida (J1), en un disolvente orgánico seleccionado de uno cualquiera de etanol, ácido que contiene etanol, glicerina, propilenglicol, alcohol bencílico, dimetilacetamida (DMA), N-metil-2-pirrolidona, isopropanol, n-butanol, *terc*-butanol, metil *terc*-butil éter, propilenglicol, dimetilsulfóxido, tetrahidrofurano, 2-metil tetrahidrofurano, acetona, dimetilformamida, acetonitrilo, dioxano, ácido acético, ácido láctico, ácido propiónico, n-butanol, isopropanol, n-propanol, *terc*-butanol, *sec*-butanol, metanol, y una mezcla de etanol y agua;

15 b) se añade agua a la solución obtenida en la etapa a) para obtener una solución de dicho clorhidrato de melfalán flufenamida (J1), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en una concentración de aproximadamente 0,2-3,0 mg/ml;

c) se añade al menos un excipiente como se define en el presente documento, a la solución obtenida en la etapa b); y

20 d) la solución obtenida en la etapa c) se somete a liofilización

Cuando se usa ácido que contiene etanol para disolver melfalán flufenamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma en la etapa a) en el procedimiento anterior, el ácido puede ser HCl, en una concentración de por ejemplo 5-20 mM, o la concentración de HCl puede ser por ejemplo 10 mM, en el etanol.

25 Cuando se disuelve melfalán flufenamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma en etanol y agua, la concentración de etanol puede ser de aproximadamente 10-100 % vol, tal como 10-90 % vol, 50-90 % vol, o aproximadamente 70 % vol.

El agua usada para disolver y/o diluir muestras de una preparación farmacéutica liofilizada de acuerdo con la presente invención, es agua estéril o purificada, o agua para inyección (WFI).

30 Cuando se usa etanol para disolver melfalán flufenamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, la solución obtenida en la etapa a) se diluye en la etapa b) de modo que la concentración de etanol sea de aproximadamente 2 %-100 % en volumen, tal como aproximadamente 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 %, o tal como 5-15 %, o tal como 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 %. Típicamente, la concentración de etanol después de la etapa de dilución b) es aproximadamente del 9 %.

La solución obtenida en la etapa b) puede esterilizarse por filtración antes de la etapa de liofilización c).

35 La etapa de liofilización c) comprende las etapas típicas de congelación y secado primario y secundario como se describe en el presente documento. Puede encontrarse información acerca de cómo se realiza la liofilización por ejemplo en Rey, L. y May, J. Freeze Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products (2010), ISBN 978-1439B2575-4. En la etapa de congelación, la muestra se congela por ejemplo en un baño de hielo seco-acetona a una temperatura de aproximadamente -70 °C a -90 °C, tal como aproximadamente -70 °C, -75 °C, -78 °C, -80 °C, -82 °C, -85 °C, -88 °C o -90 °C, por ejemplo, durante 10 minutos a 120 minutos.

Como alternativa, la muestra puede congelarse en un congelador a una temperatura de aproximadamente -14 °C a -25 °C, tal como -14 °C, -16 °C, -18 °C, -20 °C, -22 °C o -25 °C, por ejemplo durante aproximadamente 10 minutos a 24 horas. También es posible congelar la muestra en nitrógeno líquido.

45 La etapa c) puede realizarse aplicando técnicas convencionales para la liofilización, véase por ejemplo Rey, L. y May, J. Freeze Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products (2010), ISBN 978-1439B2575-4.

Por ejemplo, en la etapa de secado primario, la presión puede reducirse hasta aproximadamente 0,01 kPa a 5 kPa, tal como 0,1 kPa a 1 kPa. La temperatura está típicamente por debajo de 0 °C, tal como -50 a 0 °C o -20 a -1 °C, por ejemplo -50 °C, -40 °C, -30 °C, -20 °C, -10 °C o -5 °C. Esta fase puede durar, por ejemplo, de 4 horas a 48 horas, por ejemplo de 12 horas a 24 horas.

50 En la etapa de secado secundario final, cuando se ha evaporado la mayoría del agua, la temperatura puede ser como en la etapa de secado primario o por encima de 0 °C.

Cuando deben estar presentes uno o más excipientes como se define en el presente documento durante la liofilización, estos pueden añadirse en la etapa b) antes o después de la dilución de la solución obtenida en la etapa a) y antes de realizar la liofilización. Los excipientes pueden añadirse en forma de polvo pero generalmente se añaden como una solución acuosa. Los excipientes pueden estar por lo tanto presentes durante la liofilización.

- 5 También se desvela en el presente documento una preparación farmacéutica liofilizada como se define en el presente documento que puede obtenerse por el procedimiento anteriormente desvelado.

También se proporciona en el presente documento un kit de partes que comprende:

- (i) un primer recipiente que comprende una preparación farmacéutica liofilizada que comprende melfalán flufenamida como se describe en el presente documento; y
- 10 (ii) un segundo recipiente que comprende una solución fisiológicamente aceptable, tal como una solución de NaCl (tal como NaCl aproximadamente 0,9 % p) o una solución de glucosa, tal como solución de glucosa aproximadamente 4,5-5,5 % p, por ejemplo solución de glucosa aproximadamente 5 % p, u otra solución fisiológicamente aceptable.

- 15 Dicho kit puede también puede comprender un dispositivo para mezclar los contenidos de los dos recipientes entre sí y/o para transferir la mezcla resultante a un dispositivo, tal como una bolsa que comprende una solución de glucosa, para la administración a un paciente.

- 20 Dicho kit puede consistir en el primer recipiente que comprende una preparación farmacéutica liofilizada que comprende melfalán flufenamida como se describe en el presente documento y el segundo recipiente que comprende la solución fisiológicamente aceptable. La melfalán flufenamida en el kit también puede estar en mezcla con un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. Un ejemplo es glucosa al 5 % con, por ejemplo, albúmina 1 % u otra proteína o compuesto. La cantidad de solución fisiológicamente aceptable puede ser una cantidad pequeña para preparar una solución concentrada de la preparación farmacéutica liofilizada que comprende melfalán flufenamida, o una cantidad mayor para permitir la preparación de una solución que tenga la concentración deseada para administración a un paciente. Como alternativa, el kit puede comprender tanto un recipiente que comprende una solución fisiológicamente aceptable para preparar una solución concentrada de la preparación farmacéutica liofilizada como un segundo recipiente, tal como una bolsa para infusión, que comprende una cantidad mayor de una solución fisiológicamente aceptable para la preparación de la solución más diluida para administración a un sujeto.

- 30 Una preparación farmacéutica liofilizada, composición farmacéutica o kit proporcionado en el presente documento pueden comprender solamente melfalán flufenamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como un agente antitumoral. Sin embargo, también puede combinarse melfalán flufenamida con uno o más agentes antitumorales, tales como otras sustancias antitumorales tales como gemcitabina, etopósido, doxorubicina o taxanos u otras sustancias terapéuticamente eficaces. Cuando se combina con otros agentes antitumorales estos pueden mezclarse con melfalán flufenamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma antes de liofilización y posteriormente liofilizarse junto con melfalán flufenamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma o combinarse con la melfalán flufenamida liofilizada o sal farmacéuticamente aceptable de la misma después de liofilización, tal como en un kit o una composición farmacéutica. La melfalán flufenamida liofilizada también puede mezclarse con una o más sustancias antitumorales en forma seca, incluso aunque no esté liofilizada, después de liofilización de melfalán flufenamida o sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

- 40 La melfalán flufenamida proporcionada en el presente documento tiene una actividad citotóxica y puede por lo tanto usarse en la prevención y/o el tratamiento de cáncer como se describe en otra parte (véase por ejemplo documento WO 01/96367). En el documento WO 01/96367 se demostró una reducción de la supervivencia de células tumorales del compuesto para diferentes tumores hematológicos y/o sólidos, por ejemplo cáncer de pulmón, mieloma, linfoma, leucemia, cáncer de mama y carcinoma ovárico. Además, en el documento WO 01/96367 se demostró que el compuesto evitaba la resistencia al melfalán. El compuesto puede usarse por lo tanto en la prevención y/o el tratamiento de cáncer, reducir el crecimiento tumoral y/o destruir células tumorales. Por lo tanto, el compuesto puede usarse para curar y/o prolongar la supervivencia de pacientes aquejados de enfermedades cancerosas.

- 50 También se proporciona en el presente documento la preparación farmacéutica liofilizada, kit o composición farmacéutica como se desvela y se reivindica en el presente documento, para su uso como un medicamento. La invención también se refiere a dicha preparación farmacéutica liofilizada, kit o composición farmacéutica, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de cáncer, tal como cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, mesotelioma, mieloma múltiple, cáncer de mama y/o cualquier otro cáncer sólido o hematológico.

- 55 También se desvela en el presente documento el uso de una preparación farmacéutica liofilizada, kit o composición farmacéutica como se desvela y se reivindica en el presente documento, para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de cáncer, tal como cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, mesotelioma, mieloma múltiple, cáncer de mama y/o cualquier otro cáncer sólido o hematológico.

Un aspecto más de la presente invención es una preparación farmacéutica liofilizada, kit o composición farmacéutica que comprende clorhidrato de melfalán flufenamida (J1) en combinación con otro fármaco útil en el tratamiento de

cáncer, para uso en el tratamiento y/o prevención de cáncer, tal como cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, mesotelioma, mieloma múltiple, cáncer de mama y/o cualquier otro cáncer sólido o hematológico.

5 También se desvela en el presente documento un procedimiento para el tratamiento de y/o la prevención de cáncer, tal como cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, mesotelioma, mieloma múltiple, cáncer de mama y/o cualquier otro cáncer sólido o hematológico. El procedimiento puede comprender la administración de una preparación farmacéutica liofilizada, un kit o una composición farmacéutica como se proporciona en el presente documento en una dosis terapéuticamente eficaz a un sujeto que lo necesite. El sujeto es típicamente un ser humano o un animal doméstico.

10 También se desvela en el presente documento un procedimiento para el tratamiento y/o la prevención de cáncer, tal como cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, mesotelioma, mieloma múltiple, cáncer de mama y/o cualquier otro cáncer sólido o hematológico, en el que la preparación farmacéutica liofilizada, un kit o una composición farmacéutica que comprende clorhidrato de melfalán flufenamida (J1) se proporciona en una dosis terapéuticamente eficaz a un sujeto que lo necesite, en combinación con otro fármaco, útil en el tratamiento del cáncer. El sujeto es típicamente un ser humano o un animal doméstico.

15 La administración de una preparación farmacéutica liofilizada, un kit o una composición farmacéutica a un sujeto que lo necesite puede tener lugar por inyecciones intravenosas. También es posible administrar melfalán flufenamida liofilizada o una composición farmacéutica que comprende dicha melfalán flufenamida liofilizada en cavidades corporales, tal como instilación en la vejiga, o en cavidades peritoneales o pleurales.

20 Puede administrarse melfalán flufenamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma en una cantidad de aproximadamente 20-130 mg, tal como 30-75 mg, por ejemplo 50 mg de cantidad total de melfalán flufenamida por administración. La composición farmacéutica o kit proporcionados en el presente documento que comprenden melfalán flufenamida puede tener por lo tanto una cantidad de melfalán flufenamida liofilizada tal que pueda administrarse esta cantidad.

25 Puede administrarse melfalán flufenamida liofilizada o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma diariamente, cada dos o tres días, semanalmente, cada dos, tres o cuatro semanas o incluso como una única dosis alta (por ejemplo antes del trasplante) dependiendo del sujeto y la forma de cáncer para tratar.

Se pretende que la palabra "prevención" como se usa en el presente documento, incluya terapia en un paciente que se ha sometido a quimioterapia contra cualquier forma de cáncer como se describe en el presente documento, y que se somete a terapia continuada con el objetivo de prevenir que se produzca cualquier metástasis de dicho cáncer.

30 También se desvela en el presente documento el uso de un excipiente seleccionado del grupo que comprende polisorbato 80; PEG 400;  $\beta$ -ciclodextrina;  $\alpha$ -ciclodextrina; hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; sulfobutiléter- $\beta$ -ciclodextrina; lactosa; alcohol bencílico; succinato disódico; propilenglicol; PEG 300, Cremofor EL; dimetil sulfóxido; D-manitol; trehalosa; sacarosa; e histidina, en una preparación liofilizada de melfalán flufenamida para reducir el tiempo de reconstitución de la preparación liofilizada de melfalán flufenamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, cuando se reconstituye en un disolvente acuoso.

35 Dicha melfalán flufenamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, es, por ejemplo, clorhidrato de melfalán flufenamida (J1).

Dicha melfalán flufenamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, se disuelve, por ejemplo, en etanol antes de someter dicha melfalán flufenamida a dicho excipiente.

40 En este documento pueden usarse indistintamente "liofilización", "criodesecación", "liofilizado", "criodesecado" y similares.

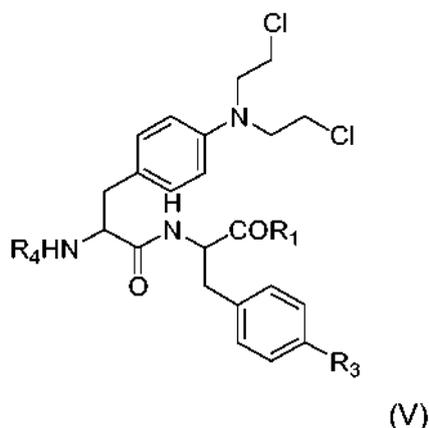
El polisorbato 80 (que tiene el nombre químico monooleato de sorbitano polioxietileno 20 y el número de registro de CAS 9005-65-6) está disponible en el mercado de, por ejemplo, Fluka o Sigma-Aldrich.

45 PEG 400 tiene la fórmula empírica  $\text{HOCH}_2(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_m\text{CH}_2\text{OH}$ , en la que m es 8,7, y el peso molecular promedio es 380-420, y está disponible en el mercado de, por ejemplo, Fluka o Sigma-Aldrich.

PEG 300 tiene la fórmula empírica  $\text{HOCH}_2(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_m\text{CH}_2\text{OH}$ , en la que m es 6,4, y el peso molecular promedio es 285-315, y está disponible en el mercado de, por ejemplo, Fluka o Sigma-Aldrich.

Cremofor EL® es una marca comercial comercializada por Sigma-Aldrich, y es aceite de ricino polioxietileno que tiene el número de registro de CAS 61791-12-6.

50 También se desvelan dipéptidos citotóxicos ilustrativos que pueden usarse como se describe en el presente documento en el documento WO01/96367 y pueden tener la fórmula V



en la que

R<sub>1</sub> es alquiloxi, cicloalquiloxi, ariloxi, arilaquiloxi, NH<sub>2</sub>, alquilamino, cicloalquilamino o arilamino;

R<sub>3</sub> es NH<sub>2</sub>, OH, O-alquilo, N-alquilo, O-acilo, NH-acilo, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl)<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, F, CF<sub>3</sub> o H; y

5 R<sub>4</sub> es un aminoácido cíclico o aromático natural o modificado, o H; así como sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

Además, los péptidos citotóxicos que pueden usarse como se describe en el presente documento incluyen péptidos de la fórmula I o V, en donde R<sub>3</sub> es F. Los dipéptidos son ejemplos de péptidos de la fórmula I o V, en los que R<sub>1</sub> es alquiloxi; R<sub>3</sub> es F, CF<sub>3</sub>, H, OH, O-alquilo, NO<sub>2</sub>, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl)<sub>2</sub>, NH-acilo o NH<sub>2</sub>; y R<sub>4</sub> es H.

10 Los tripéptidos son ejemplos de péptidos de la fórmula I o V, en los que R<sub>1</sub> es alquiloxi; R<sub>3</sub> es F, CF<sub>3</sub>, H, OH, O-alquilo, NH-acilo, NO<sub>2</sub>, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl)<sub>2</sub> o NH<sub>2</sub>; y R<sub>4</sub> es un aminoácidos cíclico o aromático natural o modificado.

Puede prepararse melfalán flufenamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, como se desvela en el documento WO 01/96367. El ejemplo 1 del documento WO 01/96367 desvela un procedimiento sintético para preparar melfalán flufenamida (etil éster de L-melfalanil-L-*p*-fluorofenilalanina), así como su sal de clorhidrato, clorhidrato de melfalán flufenamida J1 (etil éster de L-melfalanil-L-*p*-fluorofenilalanina, compuesto J1).

15 Los derivados dipeptídicos desvelados en el documento WO01/96367 pueden sintetizarse a partir de melfalán protegido por *tert*-butoxicarbonilo (Boc) como se desvela en el mismo y pueden liofilizarse y usarse como se describe en el presente documento. Además, el documento WO01/96367 desvela la preparación de derivados tripeptídicos, en los que se acoplaron aminoácidos protegidos por Boc con el derivado dipeptídico que contiene melfalán usando EDC/NMM/HOBt como reactivos de acoplamiento (EDC es trietilamina o clorhidrato de 1-[3-dimetilamino]propil]-3-etilcarbodiimida, NMM es N-metilmorfolina y HOBt es 1-hidroxibenzotriazol). Se desvela en el presente documento que dichos derivados tripeptídicos pueden liofilizarse y usarse como se describe en el presente documento.

25 Se desvela en el presente documento que ejemplos de derivados de melfalán que pueden liofilizarse y usarse como se describe en el presente documento incluyen melfalán flufenamida, isopropil éster de L-melfalanil-L-*p*-fluorofenilalanina (JV28), etil éster de L-prolinil-L-melfalanil-L-*p*-fluorofenilalanina (J3) (Figura 7) y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Estos compuestos se han desvelado previamente en el documento WO01/96367, que también proporciona procedimientos para su preparación. Melfalán flufenamida, JV28 y J3 pueden transformarse en melfalán en el cuerpo. En el documento WO 01/96367, se demostró que estos derivados tienen una actividad de destrucción celular aumentada contra tumores, incluso cuando se usan a concentraciones menores que melfalán. Además, puede evitarse la resistencia a melfalán.

30 La invención se describirá adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos.

## Sección experimental

### Ejemplo 1: liofilización de clorhidrato de melfalán flufenamida (J1) en diferentes condiciones

En este experimento se ensayó la liofilización de clorhidrato de melfalán flufenamida (J1) en diversas condiciones.

#### 35 Ejemplo 1A

Se disolvieron cantidades pesadas de J1 en diversos volúmenes de agua desionizada en un baño de ultrasonidos con calentamiento ligero para conseguir soluciones transparentes. Las muestras se congelaron en un baño de hielo seco-acetona (-78 °C, muestras A1-A3) o en un congelador a -16 °C (muestras B1-B3). Después se realizó liofilización durante 16 horas a una presión de 0,1 kPa a temperatura ambiente con una trampa de hielo seco-acetona (-78 °C) entre el matraz de secado y la bomba.

40

La apariencia visual después del secado fue como se resume en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Seis soluciones diferentes de J1 a diversas concentraciones o temperaturas de congelación.

Exp n.º	mg de J1	ml de agua	conc (mg/ml)	apariciencia después del secado
J1A1	2,4	6	0,4	suave blanco
J1A2	2,7	27	0,1	suave blanco - parte no completamente seco
J1A3	2,5	10	0,25	suave blanco
J1B1	2,7	6,75	0,4	sólido blanco
J1B2	2,5	25	0,1	polvo amarillo claro
J1B3	2,8	11,2	0,25	suave blanco

### Ejemplo 1B

- 5 Se disolvieron muestras de los compuestos secos en acetonitrilo acuoso 50 % y se analizaron mediante HPLC (columna de ACE, C8, 50x3 mm, CH<sub>3</sub>CN 10-97 % en 3 min, 1 ml/min). En un caso (J1A1) la solución acuosa se analizó mediante HPLC antes de liofilización (J1A1-inicio). Las purezas después de secar fueron como se resume en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Pureza después de liofilización. Tr = tiempo de retención

Exp n.º	J1: Tr 2,27 (%)	Tr 1,87 (%)	Tr 1,44 (%)
J1A1-inicio	88	12	
J1A1	79	21	
J1A2	80	20	
J1A3	41	45	14
J1B1	34	42	25
J1B2	36	43	21
J1B3	79	21	

10

### Ejemplo 1C

A continuación se ensayó el uso de agua ligeramente ácida (por ejemplo HCl 0,01 %) para potenciar la velocidad de disolución o para disolver en primer lugar J1 en etanol, antes de añadir agua (neutra o ligeramente ácida).

- 15 Se prepararon tres muestras de J1 disolviendo melfalán flufenamida (aproximadamente 3 mg) en etanol acuoso 70 % (0,5 ml). Las soluciones se diluyeron con HCl 5 mM para proporcionar una concentración de 0,4 mg/ml. Ya que la melfalán flufenamida se disuelve rápidamente en etanol acuoso no fue necesario usar baño de ultrasonidos o calentar para obtener una solución transparente. Las soluciones se congelaron después en un baño de trampa de hielo seco-acetona (-78 °C) entre el matraz de secado y la bomba. La apariencia visual después de secar fue como se resume en la Tabla 3.

20

**Tabla 3.** Tres repeticiones de J1 disueltas en etanol y ácido

Exp n.º	mg de J1	ml de HCl	conc (mg/ml)	aparición después del secado
J1C1	3,0	7,0	0,4	sólido blando parte del cual está adherido al vidrio
J1C2	3,2	7,	0,4	sólido blando parte del cual está adherido al vidrio
J1C3	2,9	6,75	0,4	sólido blando parte del cual está adherido al vidrio

### Ejemplo 1D

Se realizaron dos ciclos de HPLC en cada muestra: uno del compuesto sólido que podría retirarse del matraz y uno disolviendo el resto en compuesto en el matraz (tabla 4)

5 **Tabla 4.** Pureza después de la liofilización.

#### Ciclo 1

Exp n.º	J1: Tr (%)	Tr (%)	Tr (%)
J1C1	2,25 (97 %)	2,32 (3 %)	
J1C2	2,24 (97 %)	1,87 (1 %)	1,98 (1 %)
J1C3	2,22 (99 %)	1,87 (1 %)	

#### Ciclo 2

Exp n.º	J1: Tr (%)	Tr (%)	Tr (%)
J1C1	2,25 (100 %)		
J1C2	2,25 (95 %)	1,88 (3 %)	1,98 (2 %)
J1C3	2,25 (97 %)	1,87 (3 %)	

En conclusión, disolviendo J1 en etanol al 70 %, diluyendo con HCl 5 mM y liofilizando se obtuvieron tres muestras con pureza >95 %.

### Ejemplo 1E

10 Se ensayó después la omisión del ácido y la dilución en su lugar del etanol con agua desionizada. Se prepararon tres muestras de J1 disolviendo J1 (aproximadamente 3 mg) en etanol acuoso 70 % (0,5 ml) a temperatura ambiente. Las soluciones se diluyeron con agua desionizada para proporcionar una concentración de 0,4 mg/ml. Las soluciones se congelaron después en un baño de hielo seco-acetona (-78 °C). Después se realizó liofilización durante 16 h a una presión de 0,1 kPa a temperatura ambiente con una trampa de hielo seco-acetona (-78 °C) entre el matraz de secado y la bomba. La apariencia visual después de secar fue como se resume en la Tabla 5 y las purezas en la Tabla 6.

15 **Tabla 5.** Tres replicaciones de J1 disuelto en etanol y agua.

Exp n.º	mg de J1	ml de agua	conc (mg/ml)	aparición después del secado
J1D1	3,15	7,37	0,4	sólido suave blanco
J1D2	3,11	7,27	0,4	sólido suave blanco
J1D3	3,17	7,42	0,4	sólido suave blanco

**Tabla 6.** Pureza después de liofilización.

Exp n.º	J1:Tr (%)
J1D1	2,26 (aproximadamente 100 %)
J1D2	2,26 (aproximadamente 100 %)

Exp n.º	(continuación)
	J1:Tr (%)
J1D3	2,25 (aproximadamente 100 %)

Disolviendo J1 en etanol al 70 %, diluyendo con agua y liofilizando se obtuvieron tres muestras repetidas con la misma pureza que el material de partida.

### **Ejemplo 2: efecto de los excipientes en la velocidad de disolución de melfalán flufenamida liofilizada**

5 En este experimento se ensayó el efecto en la velocidad de disolución añadiendo excipientes al proceso de liofilización del clorhidrato de melfalán flufenamida (J1). Se usaron los siguientes excipientes, todos los cuales son agentes de formulación comunes generalmente considerados seguros (GRAS) de acuerdo con la FDA (Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos):

- 10
- D-manitol, trehalosa y sacarosa;
  - clorhidrato de trizma y L-histidina;
  - Polisorbato 80, β-ciclodextrina;

en todos los experimentos se usó J1

- 15
- D-manitol se obtuvo de Sigma n.º 33440;
  - D-(+)-Trehalosa dihidrato se obtuvo de Sigma n.º T9449-25 g;
  - clorhidrato de Trizma se obtuvo de Sigma n.º T3253-100 g;
  - β-ciclodextrina hidrato se obtuvo de Sigma n.º 856088-5 g;
  - Polisorbato 80 se obtuvo de Fluka 59924-100 g.

20 Se realizó liofilización en un equipamiento Leybold Lyovac GT2. Se realizó CLEM (cromatografía líquida-espectrometría de masas) en un sistema HP1100 usando acetonitrilo-ácido trifluoroacético 0,1 % en agua como eluyente. Se usó una columna de ACE C8, 50 x 3 mm y un gradiente de acetonitrilo de 10-97 % en 3 min. Los viales de filtro fueron de Whatman, Mini-UniPrep, 0,45 mm.

#### **(i) Procedimiento A, liofilización**

25 Se disolvió melfalán flufenamida (30,1 mg) en 5 ml de etanol al 70 % con HCl 1 mM, disolución total en un periodo de 12 min a 18-19 °C. La solución se diluyó con agua (70 ml) y se distribuyó (10 ml) en matraces de fondo redondo de 250 ml con y sin excipiente (por ejemplo β-ciclodextrina, 9 mg). Cuando se hubo disuelto todo el material, las soluciones se congelaron por inmersión en un baño de hielo seco/acetona a -78 °C. Las soluciones congeladas se liofilizaron después a <0,01 kPa durante una noche y a temperatura ambiente, manteniendo la evaporación las muestras congeladas hasta su secado.

#### **(ii) Procedimiento A, medición de la velocidad de disolución**

30 Se añadió una solución de glucosa al 5 % (10 ml) en una parte a 18,5-19 °C al material liofilizado y se agitó con un imán. Se tomaron alícuotas (aproximadamente 0,3 ml) con una jeringa de 1 ml a diversos tiempos y se filtraron a través de un vial de filtro (0,45 μm). Se analizó el filtrado (8 μl) mediante HPLC.

#### **(iii) Procedimiento B, liofilización**

35 Se disolvió melfalán flufenamida (10,2 mg) en 1,67 ml de etanol al 70 % con HCl 5 mM, disolución total en un periodo de 5 minutos a 25 °C. La solución se diluyó con agua (23,3 ml) y se distribuyó (10 ml) a matraces con y sin excipientes (por ejemplo β-ciclodextrina, 9 mg). La solución de J1 y excipiente se distribuyó en viales de plástico con un filtro de 0,45 μm encajado (0,25 ml a cada vial). Los viales se congelaron por inmersión en un baño de hielo seco/acetona a -78 °C y se mantuvieron después a -20 °C durante una noche en una rejilla apropiada para los viales. Los viales congelados se cubrieron con papel de aluminio para evitar la contaminación cruzada y se mantuvieron en la rejilla preenfriada a -20 °C, exponiendo al mismo tiempo la rejilla en un desecador a <0,01 kPa durante una noche, manteniendo la evaporación las muestras congeladas hasta su secado.

#### **(iv) Procedimiento B, medición de la velocidad de disolución**

45 Se añadió una solución de glucosa al 5 % (0,5 ml), que contenía un patrón interno (ácido 3-metoxibenzoico, 0,08 mg/ml). Después de diversos tiempos (15 s-12 min) se filtraron los contenidos de los viales, el filtrado se transfirió directamente a viales de vidrio para evitar la filtración de material no disuelto al filtrado y se inyectaron 8 μl del filtrado al CLEM.

#### **Determinación de la velocidad de disolución**

En un primer enfoque, Procedimiento A, se liofilizaron soluciones acuosas de J1 con diferentes aditivos en matraces de fondo redondo. A cada compuesto liofilizado, se añadió una solución de glucosa con agitación controlada. Se

5 extrajeron alícuotas pequeñas con una jeringa a tiempos específicos y se filtraron a través de un filtro de jeringa GHP de 0,45 µm. El grado de disolución de J1 en el filtrado se determinó después por HPLC. Este procedimiento se usó con melfalán flufenamida liofilizada solamente y junto con D-manitol, trehalosa, sacarosa, Polisorbato 80 y β-ciclodextrina. El resultado de estos ensayos mostró que J1 se disolvió completamente en un periodo de 2-4 min independientemente del excipiente (véase Figura 1, sin excipientes, y Figura 2, con excipientes. Véase también Tabla 7). De hecho, la velocidad de disolución para J1 liofilizado con excipientes fue en realidad más rápida que lo que podría medirse usando este procedimiento.

**Tabla 7.** Adiciones de excipientes a J1 (4 mg) en liofilización, Procedimiento A.

Material liofilizado	Relación J1:aditivo (mg de J1:mg de aditivo)	Número de experimentos
D-Manitol*	4:2	1
D-Manitol*	4:10	2
Trehalosa*	4:2	1
Trehalosa*	4:10	2
Sacarosa*	4:10	1
p-Ciclodextrina	4:9	1
p-Ciclodextrina	4:18	2
Polisorbato 80*	4:0,05	1
Polisorbato 80*	4:0,265	2
<i>Ejemplo fuera de las reivindicaciones</i>		

10 Para mejorar la precisión y permitir la medición de la disolución a intervalos más cortos, se desarrolló el Procedimiento B. En este procedimiento, se añadieron soluciones acuosas de melfalán flufenamida y excipientes (véase Tabla 2) a viales de plástico de 2 ml y se liofilizaron. Después se añadió una solución de glucosa con el patrón interno ácido 3-  
 15 metoxibenzoico sin agitación. Después de diversos tiempos (15 s-6 min) los contenidos del vial se insertaron con un inserto de vial GHP de 0,45 µm, el filtrado se transfirió a un vial de vidrio y se determinó el grado de disolución de clorhidrato de melfalán flufenamida (J1) mediante HPLC con patrón interno. La falta de agitación hizo posible un procedimiento de disolución más lento, tanto más clínicamente relevante como con más facilidad para medir su cinética.

Con este procedimiento la cinética de disolución de J1 liofilizado pudo seguirse hasta la disolución completa después de 3-4 min (véase Figura 3, sin excipientes y la Figura 4, con excipientes, véase también Tabla 8).

20 **Tabla 8.** Adiciones de excipientes a J1 (4 mg) en liofilización, Procedimiento B.

Material liofilizado	Relación J1:aditivo (mg de J1:mg de aditivo)	Número de experimentos
J1:Manitol*	4:20	1
J1:Trehalosa*	4:20	1
J1: β-Ciclodextrina	4:9	1
J1-Polisorbato*	4:5	1
J1:Trizma HCL*	4:8	1
<i>* Ejemplo fuera de las reivindicaciones</i>		

La velocidad de disolución de J1, con y sin aditivos, determinada con el Procedimiento A y el Procedimiento B, se resume en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Sumario de tiempos de disolución de J1 con y sin aditivos, Procedimientos A y B.

Material liofilizado	Relación J1:aditivo (mg de J1:mg de aditivo)	Tiempo (min) Procedimiento A	Tiempo (min) Procedimiento B
J1 sin aditivos*		<2	3-4
J1:Trehalosa*	4:2	<2	
J1:Trehalosa*	4:10	<2	
J1:Trehalosa*	4:20		0,5-1
J1:Sacarosa*	4:10	<2	
J1:Manitol*	4:2	<2	
J1:Manitol*	4:10	<2	
J1:Manitol*	4:20		0,5-0,75
J1: β-Ciclodextrina	4:9	<2	0,75-1
J1: β-Ciclodextrina	4:18	<2	
J1:Polisorbato*	4:0,05	<2	
J1:Polisorbato*	4:0,265	<2	
J1:Polisorbato*	4:5		0,25-0,5
J1:Trizma HCL*	4:8		>12
* Ejemplo fuera de las reivindicaciones			

### Pureza y recuperación de J1

5 Se disolvió una muestra de clorhidrato de melfalán flufenamida (J1) en 50 % de acetonitrilo acuoso y se analizó inmediatamente con CLEM (cromatografía líquida-espectrometría de masas), mostrando solamente un pico (> 99 %). Se descubrió que la pureza de J1 directamente después de disolución en etanol 70 % que contenía HCl 1 mM o HCl 5 mM era aproximadamente 97 %, con un producto secundario menor de aproximadamente 3 %. La cantidad de este producto secundario aumentó si la solución se dejó a temperatura ambiente.

10 Los resultados demuestran que la velocidad de disolución de J1 liofilizado en solución de glucosa con agitación fue más rápida de lo que pudo medirse (Procedimiento A), lo que no permite ver el efecto de las adiciones de excipientes. Usando un Procedimiento B clínicamente más relevante sin agitación, la disolución de melfalán flufenamida liofilizada en solución de glucosa pudo seguirse hasta su compleción después de 3-4 minutos. La adición de los excipientes β-ciclodextrina\*, Polisorbato 80\*, Manitol\* y Trehalosa\* a la solución de melfalán flufenamida antes de la liofilización proporcionó en todos los casos disolución completa en menos de 1 minuto. La disolución más rápida fue proporcionada por la adición de Polisorbato 80\*, que proporcionó disolución completa en el primer punto temporal de 15 segundos. [ \* = Ejemplo fuera de las reivindicaciones].

### Ejemplo 3: ensayo del efecto de la concentración del excipiente Polisorbato 80 en la velocidad de disolución de melfalán flufenamida [Ejemplo fuera de las reivindicaciones]

20 Lo siguiente se realizó para ensayar la cantidad del excipiente Polisorbato 80 para añadir en el procedimiento de liofilización de melfalán flufenamida y para maximizar la velocidad de disolución en una solución de glucosa al 5 %. Se usó 0, 10, 50 y 100 % en peso en relación con melfalán flufenamida de Polisorbato 80. Los experimentos se procesaron por duplicado.

Se usó clorhidrato de melfalán flufenamida (J1) en todos los experimentos. El Polisorbato 80 usado se obtuvo de Fluka, 59924-100 g.

25 Se realizó liofilización en un equipamiento Leybold Lyovac GT2. Se realizó CLEM en un sistema HP1100 usando acetonitrilo-ácido trifluoroacético 0,1 % en agua como eluyente. Se usó una columna ACE C8, 50 x 3 mm y un gradiente de acetonitrilo 10-97 % en 3 min. Los viales de filtro fueron de Whatman, Mini-UniPrep, 0,45 mm.

Se realizó preparación general de solución de reserva 2 mg/ml de melfalán flufenamida antes de liofilización de la siguiente manera:

5 se suspendieron 11,0 mg de melfalán flufenamida en solución 10 mM de HCl en EtOH absoluto (0,5 ml). La mezcla se agitó durante 30 minutos antes de añadirse 0,2 ml de agua. La mezcla se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente (solución transparente) antes de añadirse a una solución a 0 °C de agua (4,8 ml). Se transfirieron 0,25 ml de la solución a un vial de plástico que contenía 10 %, 50 % o 100 % en peso de polisorbato 80. El vial se agitó, se enfrió y se liofilizó.

10 Se preparó una solución de glucosa al 5 % con un patrón interno de ácido 3-metoxibenzoico disolviendo ácido 3-metoxibenzoico (1,2 mg) en agua (15 ml). La mezcla se agitó durante 1 hora antes de añadirse 750 mg de glucosa agitando al mismo tiempo. Se añadieron 0,5 ml de la solución de glucosa al 5 % a cada vial de plástico liofilizado y las mezclas se filtraron, en diferentes puntos temporales, se transfirieron a un vial de vidrio y la disolución de J1 se determinó por HPLC.

#### Determinación de la velocidad de disolución

15 Se suspendió J1 (11 mg) en EtOH (0,5 ml) y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de añadirse agua (5 ml). La solución se dividió en 4 matraces diferentes que contenían 0 %, 10 %, 50 % o 100 % en peso (en relación con J1) de Polisorbato 80. Las soluciones se transfirieron a viales de plástico de 2 ml y se liofilizaron durante una noche.

20 Se añadió una solución de glucosa al 5 % con un patrón interno de ácido 3-metoxibenzoico a cada vial sin agitar y las mezclas se filtraron a través de un inserto de vial de GHP de 0,45 µm en diferentes puntos temporales (2-300 segundos). El filtrado se transfirió inmediatamente a un vial de vidrio para evitar la filtración de material no disuelto. La cantidad de J1 disuelto en relación con el patrón interno se determinó usando HPLC.

#### Resultados

La velocidad de disolución de J1 (1 mg/ml en solución de glucosa al 5 %) con y sin polisorbato 80 se resume en la Tabla 10 y se representa en la Figura 5

25

**Tabla 10.**

Material liofilizado (1 mg/ml)	Tiempo hasta conseguir disolución en estado estacionario (segundos)
J1 sin aditivos	300-600
J1 con Polisorbato 80 10 %	30-60
J1 con Polisorbato 80 50 %	30-60
J1 con Polisorbato 80 100 %	30-60

La Tabla 10 muestra que todas las muestras que contienen J1 liofilizado y el excipiente Polisorbato 80 se disuelven mucho más rápido que J1 liofilizado en ausencia de excipiente. Se prestó especial atención a la muestra que contenía Polisorbato 80 al 10 % y los puntos temporales en este experimento fueron:

30 filtración inmediata, 2 segundos, 15 segundos, 30 segundos y 5 minutos. En el primer punto temporal en el que la muestra se filtró inmediatamente, se disolvió aproximadamente el 40 % y después de 2 segundos se disolvió aproximadamente el 70 %. Se consiguió disolución completa después de 30-60 segundos.

35 La velocidad de disolución de J1 liofilizado a 1 mg/ml que contenía diversas cantidades de Polisorbato 80 en una solución de glucosa al 5 % fue de menos de 1 minuto para todas las muestras. La cantidad más baja de Polisorbato 80 para disolución rápida fue de entre el 10 y el 50 % en peso.

#### Ejemplo 4: ensayo del efecto de concentraciones de los excipientes Polisorbato 80, PEG 400 y β-ciclodextrina en la velocidad de disolución de melfalán flufenamida

40 Este ejemplo se realizó para estudiar el efecto de diferentes concentraciones de los excipientes Polisorbato 80, PEG 400 y β-ciclodextrina añadidos en el procedimiento de liofilización de melfalán flufenamida para maximizar la solubilidad y velocidad de disolución en una solución de glucosa al 5 % para el objetivo a largo plazo de desarrollar un material liofilizado, estable al almacenamiento y con fácil preparación para dosificación.

Se usó clorhidrato de melfalán flufenamida (J1) en todos los experimentos.

El polisorbato 80 usado se obtuvo de Fluka (59924-100 g), β-ciclodextrina de Aldrich (856088) y PEG 400 de Clariant (100316).

Se realizó liofilización en un equipamiento Leybold Lyovac GT2. La CLEM se procesó en un sistema HP1100 usando acetonitrilo-ácido trifluoroacético 0,1 % en agua como eluyente. Se usó una columna ACE C8, 50 x 3 mm y un gradiente de acetonitrilo al 10-97 % en 3 min. Los viales de filtro fueron de Whatman, Mini-UniPrep, 0,45 mm.

#### Preparación general de solución de reserva 2 mg/ml de melfalán flufenamida para liofilización

- 5 Se suspendieron 11,1 mg de melfalán flufenamida en solución 10 mM de HCl en EtOH absoluto (0,5 ml). La mezcla se agitó durante 30 minutos antes de añadirse 0,2 ml de agua. La mezcla se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente (solución transparente) antes de añadirse en gotas a una solución a 0 °C de agua (4,8 ml). Se transfirieron 0,25 ml o 0,5 ml de la solución a un vial de plástico que contenía los excipientes. El vial se agitó, se enfrió y se liofilizó.

#### Experimento de solubilidad

- 10 Se preparó una solución de glucosa al 5 % con un patrón interno disolviendo ácido 3-metoxibenzoico (1,2 mg) en agua (15 ml). La mezcla se agitó durante 1 hora antes de añadirse 750 mg de glucosa agitando al mismo tiempo. Se añadieron 0,2 ml de la solución de glucosa al 5 % a cada vial de plástico liofilizado y las mezclas se agitaron durante 10-15 segundos y se filtraron después de 5 minutos. El filtrado se transfirió a un vial de vidrio y la solubilidad de melfalán flufenamida se determinó por HPLC y una curva de calibración.

#### 15 Determinación de la solubilidad

Se usó una solución de reserva 2 mg/ml de clorhidrato de melfalán flufenamida (J1) como en experimentos previos.

Para una solubilidad de 2,5 mg/ml de J1 en solución de glucosa al 5 %, se distribuyeron 0,25 ml de la solución de reserva en viales de plástico de 2 ml que contenían una mezcla de los excipientes determinados por diseño experimental y las mezclas se enfriaron inmediatamente y se liofilizaron.

- 20 Los niveles alto/bajo de cada excipiente (en % en peso en relación con melfalán flufenamida) fueron los siguientes: polisorbato 80 (8 %-80 %), PEG 400 (80 %-400 %) y  $\beta$ -ciclodextrina (10 %-50 %). La cantidad más alta de cada excipiente se determinó a partir de la base de datos de ingredientes inactivos de la FDA de los fármacos administrados IV registrados. La  $\beta$ -ciclodextrina está en la lista de GRAS (Reconocidos en General Como Seguros) de la FDA pero no se proporcionan recomendaciones para inyecciones intravenosas hasta donde alcanza el conocimiento los inventores, lo que ha provocado que se establezca un nivel alto bastante conservador. El porcentaje en peso de cada excipiente en relación con clorhidrato de melfalán flufenamida (J1) (peso) se muestra en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Porcentaje en peso de cada excipiente en relación con J1.

Experimento n.º	Polisorbato 80 [%]	PEG 400 [%]	$\beta$ -ciclodextrina [%]
1	8	400	10
2	8	80	10
3	8	400	50
4	8	80	50
5	80	400	10
6	80	80	10
7	80	400	50
8	80	80	50
9	44	240	30
10	44	240	30
11	44	240	30

- 30 Como se demuestra en otros experimentos del presente documento, la velocidad de disolución de J1 aumentó notablemente con la adición de Polisorbato 80 en el procedimiento de liofilización. Se realizaron tres experimentos para intentar alcanzar una solubilidad de 5 mg/ml. Se añadió una solución de reserva de J1 a 3 viales de plástico diferentes (exp 12, 13 y 14) que contenían Polisorbato 80 (10 %, 50 % y 100 % en peso en relación con melfalán flufenamida). Las mezclas se enfriaron inmediatamente y se liofilizaron.

Se añadió una solución de glucosa al 5 % con un patrón interno (ácido 3-metoxibenzoico) a cada vial y los viales se agitaron y se permitió que reposaran durante 5 minutos. Las mezclas se filtraron a través de un vial de filtro de GHP de 0,45 µm y el filtrado se transfirió inmediatamente a un vial de vidrio para evitar la filtración de material no disuelto. La cantidad de J1 disuelto se determinó usando HPLC y una curva de calibración.

## 5 Resultados

Las solubilidades de J1 en mg/ml con niveles altos/bajos de los excipientes Polisorbato 80, PEG 400 y β-ciclodextrina se resumen en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Solubilidad de J1 en mg/ml.

Experimento	Polisorbato 80 [%]	PEG 400 [%]	β-ciclodextrina [%]	Solubilidad de J1 [mg/ml]
1	8	400	10	1,9
2	8	80	10	0,9
3	8	400	50	2
4	8	80	50	1,4
5	80	400	10	2
6	80	80	10	1,5
7	80	400	50	2
8	80	80	50	1,9
9	44	240	30	1,9
10	44	240	30	1,8
11	44	240	30	1,7
12	10	x	x	1
13	50	x	x	1,2
14	100	x	x	1,4
15*	x	x	x	0,67
16*	x	x	x	0,25
17	50	80	100	1,2

\*Los experimentos 15-16 no usaron J1 liofilizado, se usó polvo fino en el Experimento 15 y se usaron trozos mayores en el Experimento 16; ejemplo fuera de las reivindicaciones.

\*\* Ejemplo fuera de las reivindicaciones.

10 Los resultados proporcionados en la Tabla 12 demuestran que la solubilidad de J1 aumentó en todos los experimentos que contenían excipientes en comparación con J1 no liofilizado (entrada 15 y 16). La gran discrepancia en la solubilidad de J1 no solubilizado se debe probablemente al diferente tamaño de partículas en el lote, ya que la entrada 15 fue una suspensión de polvo blanco fino, mientras que la entrada 16 fue trozos mayores que proporcionaban menor tasa de disolución y por lo tanto mayor solubilidad de J1 en 5 minutos. La precisión del análisis se muestra en los experimentos  
15 centrales 9-11 (1,9, 1,8 y 1,7) con concentraciones de excipiente idénticas. Las 3 muestras con Polisorbato 80 como el excipiente (10, 50 y 100 %) mostraron una solubilidad de 1,0, 1,2 y 1,4 mg/ml, respectivamente.

Las entradas con una mezcla de los excipientes Polisorbato 80, Peg 400 y β-ciclodextrina mostraron varias combinaciones con solubilidades en o cerca de 2,0 mg/ml. Las mayores solubilidades determinadas 2,0 (entradas 3, 5 y 7) pudieron obtenerse solamente con altos niveles de PEG 400, que proporcionaban líquidos o semisólidos  
20 después de la liofilización.

Las muestras con menor cantidad de PEG 400 (entradas 2, 4, 6 y 8) formaron un polvo suave blanco después de liofilización, con la mayor solubilidad determinada de 1,9 mg/ml en la entrada 8. Esto condujo a ensayar si pudiera obtenerse una mayor solubilidad reduciendo la cantidad de PEG 400 y aumentando la cantidad de  $\beta$ -ciclodextrina. Se liofilizó una muestra adicional (fila 17 en la Tabla 12) que contenía Polisorbato 80 al 50 %, 80 % de PEG 400 y 100 % de  $\beta$ -ciclodextrina. La solubilidad de J1 con esta mezcla de excipientes fue de 1,2 mg/ml.

Los resultados demuestran que la solubilidad máxima de J1 con combinaciones de excipientes es cercana a 2 mg/ml.

Con el experimento 13 (ejemplo fuera de las reivindicaciones) se mostró que una solución de J1 con polisorbato 50 % proporcionaba una solubilidad de aproximadamente 1,2 mg/ml solamente, suficiente para una formulación de 1,0 mg/ml y que permitía la exclusión de PEG 400 y  $\beta$ -ciclodextrina.

## 10 Experimentos de confirmación visual

Para confirmar la disolución en un entorno clínicamente más relevante, se realizó un experimento a mayor escala en viales de vidrio transparente en lugar de viales de plástico. El vial 1 contenía una solución de 4,8 mg de clorhidrato de melfalán flufenamida (J1) y 2,4 mg de polisorbato 80. Como control el vial 2 contenía 4,8 mg de clorhidrato de melfalán flufenamida (J1) y no contenía Polisorbato 80. Los viales se liofilizaron durante una noche.

15 A cada vial que contenía el melfalán J1 liofilizado como material suave blanco, se añadieron 4,70 ml de una solución de glucosa al 5 % para proporcionar una concentración de J1 de 1,02 mg/ml. Las mezclas se agitaron durante 10-15 segundos y los tubos de ensayo que contenía J1 y Polisorbato 80 al 50 % mostraron una solución transparente después de 15 segundos, véase Figura 6, vial izquierdo. El tubo de referencia con J1 liofilizado sin el Polisorbato mostró pequeñas partículas y no estaba totalmente disuelto después de 30 minutos, véase Figura 6, vial derecho. El análisis de CL-EM reveló que la pureza de melfalán flufenamida después de 30 minutos era de >95 % en ambos viales.

Los resultados proporcionados en el presente documento demuestran que la solubilidad de J1 en solución de glucosa al 5 % podría potenciarse usando una mezcla de los excipientes Polisorbato 80, Peg 400 y  $\beta$ -ciclodextrina hasta 1,9 mg/ml. Dicha mezcla de excipientes con J1 dio como resultado un sólido blanco suave tras la liofilización.

25 La liofilización de J1 con polisorbato 80 al 50 % en peso, dio como resultado un sólido suave blanco que se disuelve rápidamente en solución de glucosa al 5 %. La concentración de saturación de 1,2 mg/ml es suficiente para usar en un entorno clínico para la preparación de dosificación a 1,0 mg/ml.

### **Ejemplo 5: ensayo de estabilidad [Ejemplo fuera de las reivindicaciones]**

El fin de la primera parte de este estudio fue investigar la velocidad de disolución de clorhidrato de melfalán flufenamida (J1) (liofilizado junto con Polisorbato 80) en solución de glucosa al 5 %.

30 La velocidad de disolución de J1 (liofilizado) en solución de glucosa al 5 % que contenía Polisorbato 80 se medirá en otro experimento.

Finalmente se medirá la velocidad de disolución de J1 no liofilizado en solución de glucosa al 5 % que contiene polisorbato 80.

35 La segunda parte es una investigación de la degradación de J1 en dos preparaciones diferentes a temperatura elevada. La primera preparación fue un sólido liofilizado que contenía polisorbato 80 y la segunda fue una solución 25 mg/ml de J1 en N,N-dimetilacetamida (DMA). La degradación se siguió durante 1 mes a +40 °C, usando dos preparaciones.

#### **(i) Determinación de la velocidad de disolución.**

40 Se añadió una solución de glucosa al 5 % a cada vial de plástico que contenía J1. Los viales se agitaron y se filtraron en diferentes puntos temporales. El filtrado se transfirió a viales de vidrio y la cantidad de J1 disuelto se determinó por HPLC.

#### **(ii) Diseño de estudio de estabilidad acelerado.**

45 Se almacenaron 10 viales con J1 liofilizado y Polisorbato 80 y 10 viales de solución de J1 en DMA a 40 °C durante 1 mes. Se extrajeron dos viales del material liofilizado (denominado liofilizado 1 y 2 en la tabla posterior) y un vial de la solución DMA (denominada DMA en la Tabla 1 posterior) de la cámara a 40 °C y se almacenaron a -20 °C y se analizaron al mismo tiempo para el ensayo y pureza de J1. Los tiempos de toma de muestras fueron de 0, 1, 3, 10 y 30 días. Cada vial liofilizado contenía 0,25 mg de J1. La solución de 25 mg/ml en DMA fue de Oncopeptides.

#### **(iii) Análisis y resultados**

50 Las muestras liofilizadas se disolvieron en 500  $\mu$ l de DMA en viales de filtro de 0,45  $\mu$ m Whatman. Las muestras se agitaron vorticialmente brevemente antes de presionar las dos partes del vial entre sí y de este modo filtrar la muestra. Las muestras de solución de 25 mg/ml se diluyeron con DMA separando en alícuotas 20  $\mu$ l de solución a viales de

HPLC y diluyendo con 980 µl de DMA. Se inyectaron 4 µl en el sistema cromatográfico.

La estabilidad se evaluó como la pureza relativa, ya que hubo una ligera variación en la cantidad de J1 en los viales liofilizados. Usando pureza relativa, cada muestra se normalizó frente a sí misma y se minimizó el efecto de variar la cantidad de J1 en el resultado de estabilidad.

- 5 La velocidad de disolución de J1 en glucosa al 5 % en presencia de PS se resume en la tabla 13:

**Tabla 13:** resumen de experimentos de disolución.

	Tiempo (minutos) hasta alcanzar la disolución en estado estacionario	Contenido en el vial de plástico	Solución
Exp. de disolución 1	1	J1 liofilizado +Polisorbato 80	5 % de glucosa
Exp. de disolución 2	1	J1 liofilizado	5 % de glucosa + Polisorbato 80
Exp. de disolución 3	1 - 2	J1 no liofilizado	5 % de glucosa+ Polisorbato 80

#### Resultados del ensayo de estabilidad

- 10 **Tabla 14.** Resultados del ensayo de estabilidad a 40 °C, comparación entre la solución de DMA y J1 liofilizado a +40 °C/humedad ambiental relativa

Día	Relativo a Liofilizado 2 [%]	Relativo a Liofilizado 2 [%]	Relativo promedio a Liofilizado [%]	Relativo a DMA [%]
0	98,80	98,74	98,77	96,81
1	98,77	98,69	98,73	95,76
3	98,71	98,77	98,74	95,43
10	98,55	98,66	98,61	92,22
30	98,32	98,42	98,37	86,90

- 15 Los resultados de la tabla 14 muestran que el material liofilizado esencialmente no cambia durante el periodo de ensayo. Solamente puede observarse un pequeño cambio de pureza. Además la velocidad de disolución de J1 liofilizado a 1 mg/ml en una solución de glucosa al 5 % fue de menos de 1 minuto en presencia de Polisorbato 80. La velocidad de disolución de J1 no liofilizado a 1 mg/ml en una solución de glucosa al 5 % que contenía polisorbato 80 se estimó en 1-2 minutos.

J1 en solución de DMA se degradó significativamente durante el almacenamiento a +40 °C durante un mes. La cantidad relativa se redujo de aproximadamente 96,8 % a 86,9 %. J1 almacenado como un sólido liofilizado solamente mostró una pequeña degradación del 98,7 % al 98,3 % durante el mismo periodo de tiempo.

## REIVINDICACIONES

1. Una preparación farmacéutica liofilizada que comprende
  - (i) melfalán flufenamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y
  - (ii) al menos un excipiente seleccionado del grupo que comprende  $\beta$ -ciclodextrina;  $\alpha$ -ciclodextrina; hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; y sulfobutiléter- $\beta$ -ciclodextrina.
2. Una preparación farmacéutica liofilizada de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la cantidad de excipiente es de aproximadamente 10-100 % en peso de dicha melfalán flufenamida.
3. Una preparación farmacéutica liofilizada de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la cantidad del excipiente es de 10-50 % en peso de dicha melfalán flufenamida.
4. Una preparación farmacéutica liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha melfalán flufenamida es clorhidrato de melfalán flufenamida (J1).
5. Una preparación farmacéutica liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además una solución fisiológicamente aceptable.
6. Una preparación farmacéutica liofilizada de acuerdo con la reivindicación 5, en la que dicha solución fisiológicamente aceptable es una solución de glucosa.
7. Una preparación farmacéutica liofilizada de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la cantidad de glucosa es de 4,5-5,5 % en peso de la preparación liofilizada.
8. Una preparación farmacéutica liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que está exenta, o sustancialmente exenta, de disolventes orgánicos.
9. Una combinación de kit de partes que comprende
  - (i) una preparación farmacéutica liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; y
  - (ii) una solución fisiológicamente aceptable.
10. Una preparación farmacéutica liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso como un medicamento.
11. Una preparación farmacéutica liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de cáncer.
12. Una preparación farmacéutica liofilizada para su uso, de acuerdo con la reivindicación 11, en la que dicho cáncer es uno cualquiera de cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, mesotelioma, mieloma múltiple, cáncer de mama o cáncer hematológico.
13. Una combinación de kit de partes de acuerdo con la reivindicación 9, para su uso en el tratamiento de cáncer.
14. Un procedimiento para preparar una preparación farmacéutica liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, mediante el cual:
  - a. se disuelve melfalán flufenamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en un disolvente orgánico para obtener una solución de melfalán flufenamida;
  - b. se añade agua a la solución de melfalán flufenamida para obtener una solución acuosa de melfalán flufenamida, a una concentración de aproximadamente 0,2-3,0 mg/ml;
  - c. se añade al menos un excipiente seleccionado del grupo que comprende  $\beta$ -ciclodextrina;  $\alpha$ -ciclodextrina; hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; y sulfobutiléter- $\beta$ -ciclodextrina a la solución de melfalán flufenamida; y
  - d. la solución acuosa de melfalán flufenamida que contiene excipiente(s) se somete a liofilización.
15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, mediante el cual:
  - a. se disuelve melfalán flufenamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en un disolvente orgánico;
  - b. se añade agua a la solución obtenida en la etapa a) para obtener una solución de dicha melfalán flufenamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, a una concentración de aproximadamente 0,2-3,0 mg/ml;
  - c. se añade al menos un excipiente seleccionado del grupo que comprende  $\beta$ -ciclodextrina;  $\alpha$ -ciclodextrina; hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; y sulfobutiléter- $\beta$ -ciclodextrina a la solución obtenida en la etapa b); y
  - d. la solución obtenida en la etapa c) se somete a liofilización.
16. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14 o 15, en el que el disolvente orgánico se selecciona de uno cualquiera de etanol, ácido que contiene etanol, glicerina, propilenglicol, alcohol bencílico, dimetilacetamida (DMA), N-metil-2-pirrolidona, isopropanol, n-butanol, *terc*-butanol, metil *terc*-butil éter, propilenglicol, dimetilsulfóxido,

tetrahidrofurano, 2-metil tetrahidrofurano, acetona, dimetilformamida, acetonitrilo, dioxano, ácido acético, ácido láctico, ácido propiónico, n-butanol, isopropanol, n-propanol, *terc*-butanol, *sec*-butanol, metanol y una mezcla de etanol y agua.

17. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que dicha melfalán flufenamida es clorhidrato de melfalán flufenamida (J1).

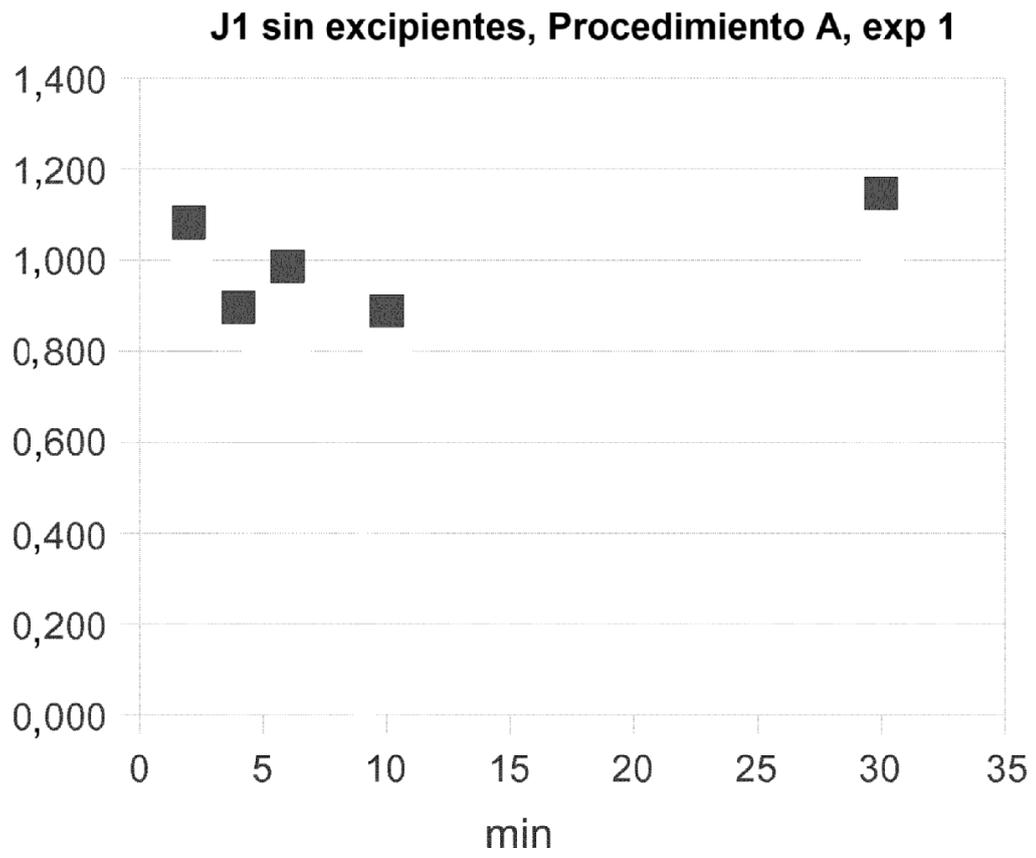


Fig. 1A

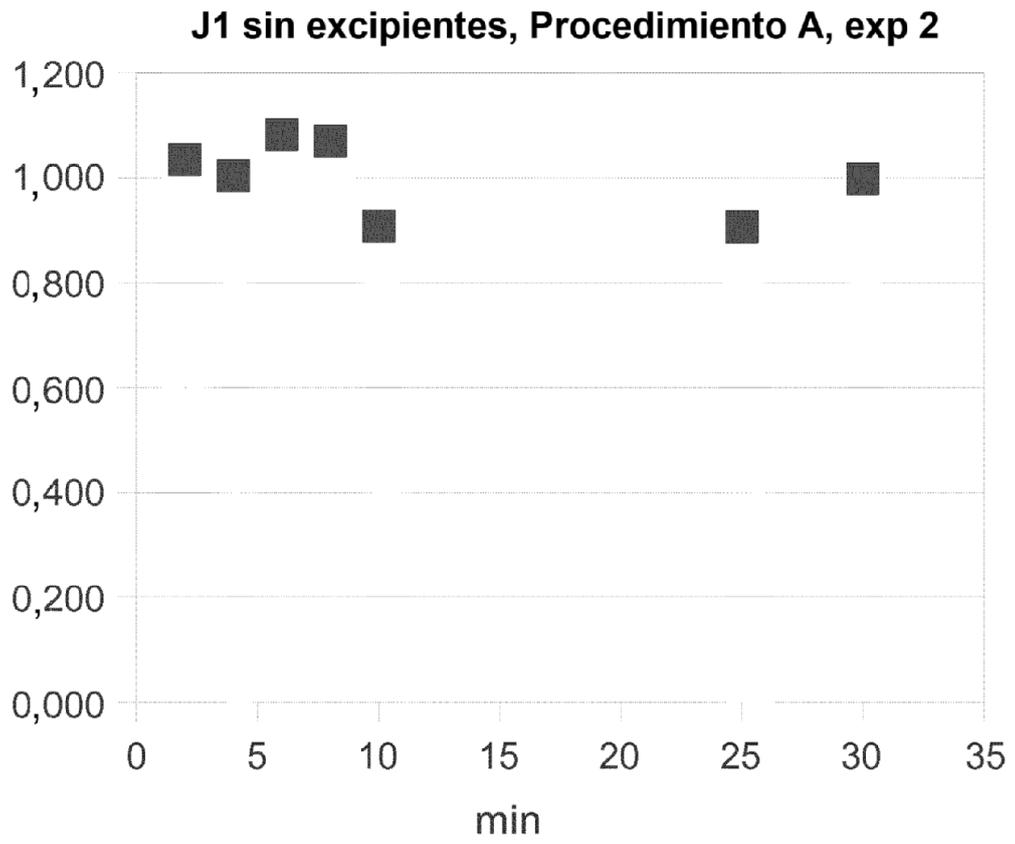


Fig. 1B

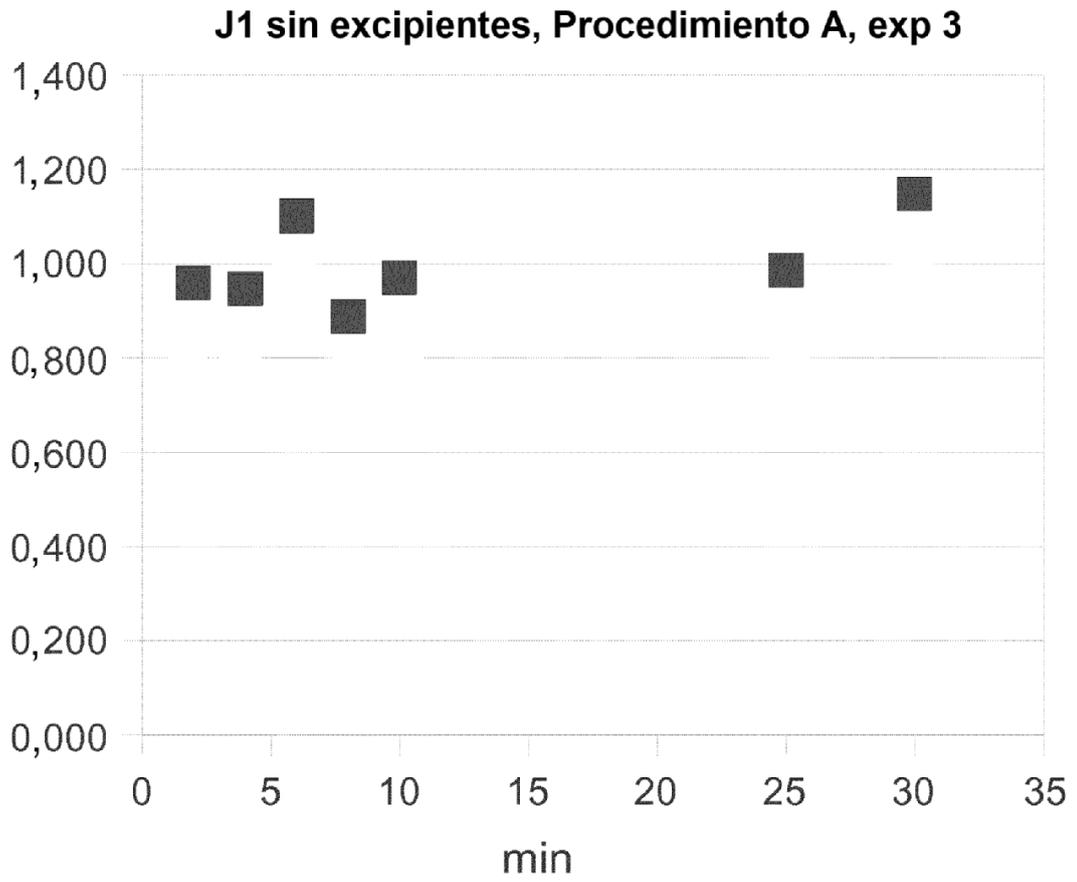


Fig. 1C

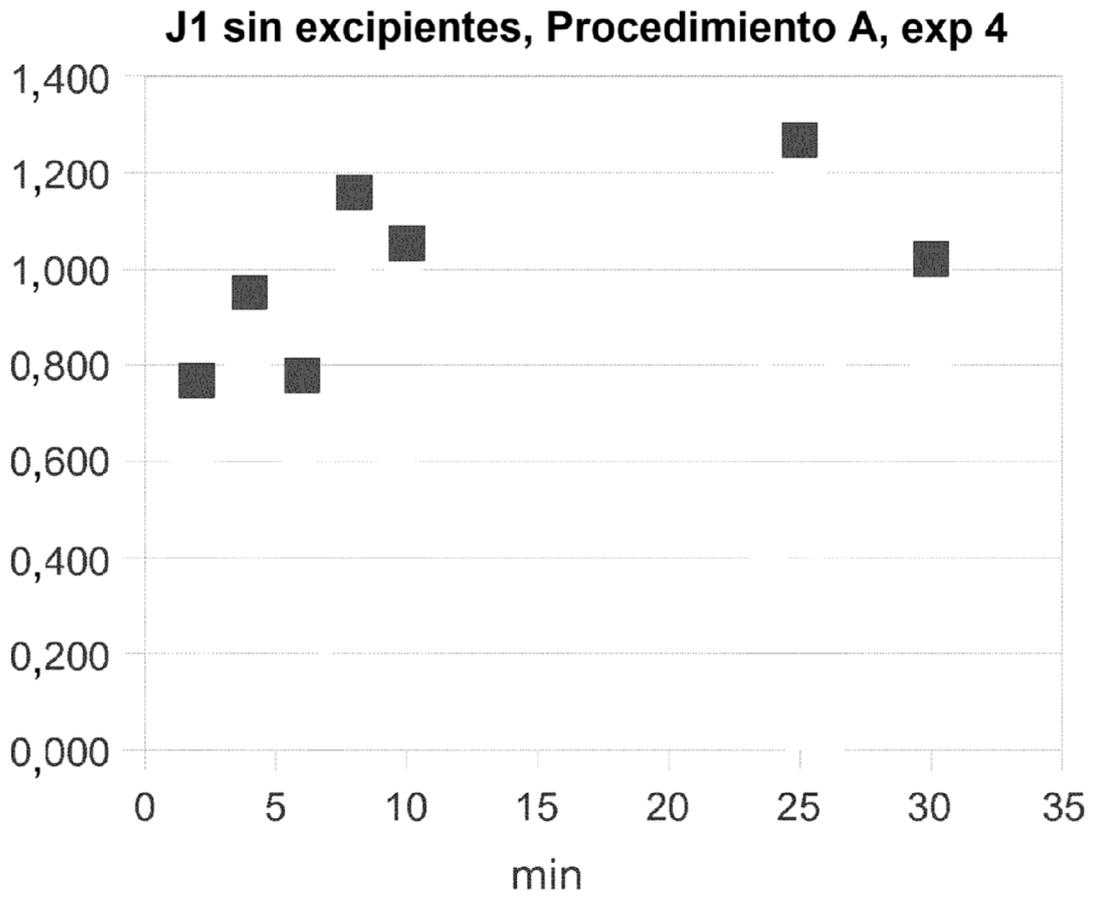


Fig. 1D

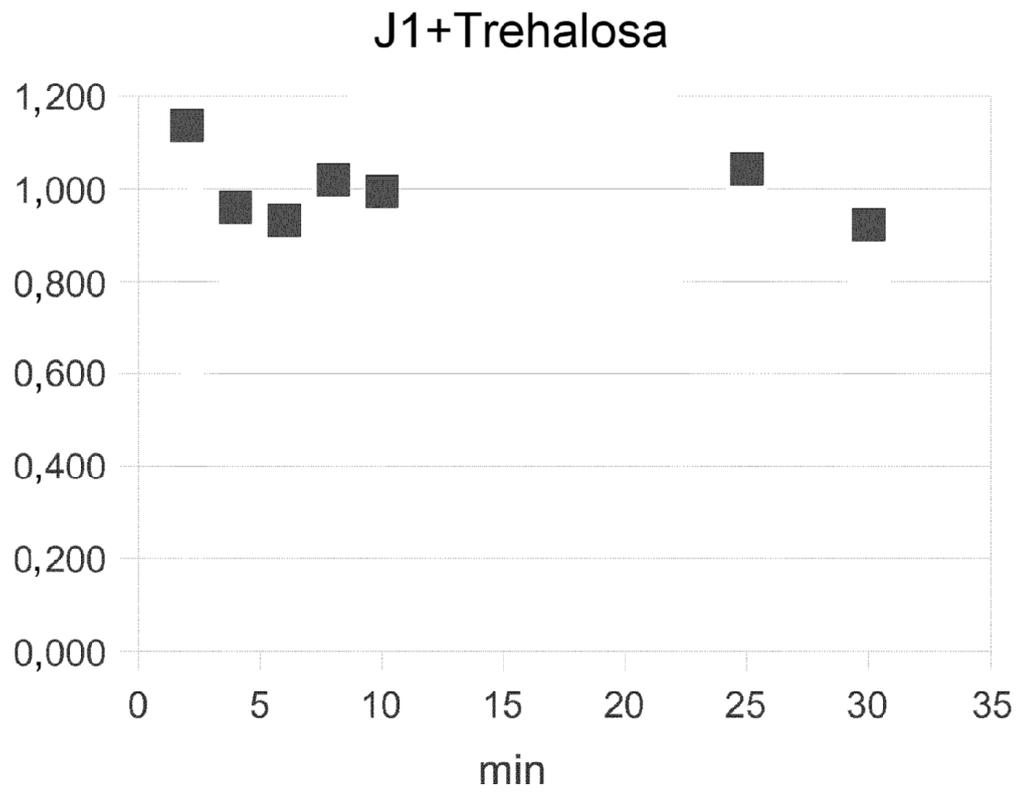


Fig. 2A

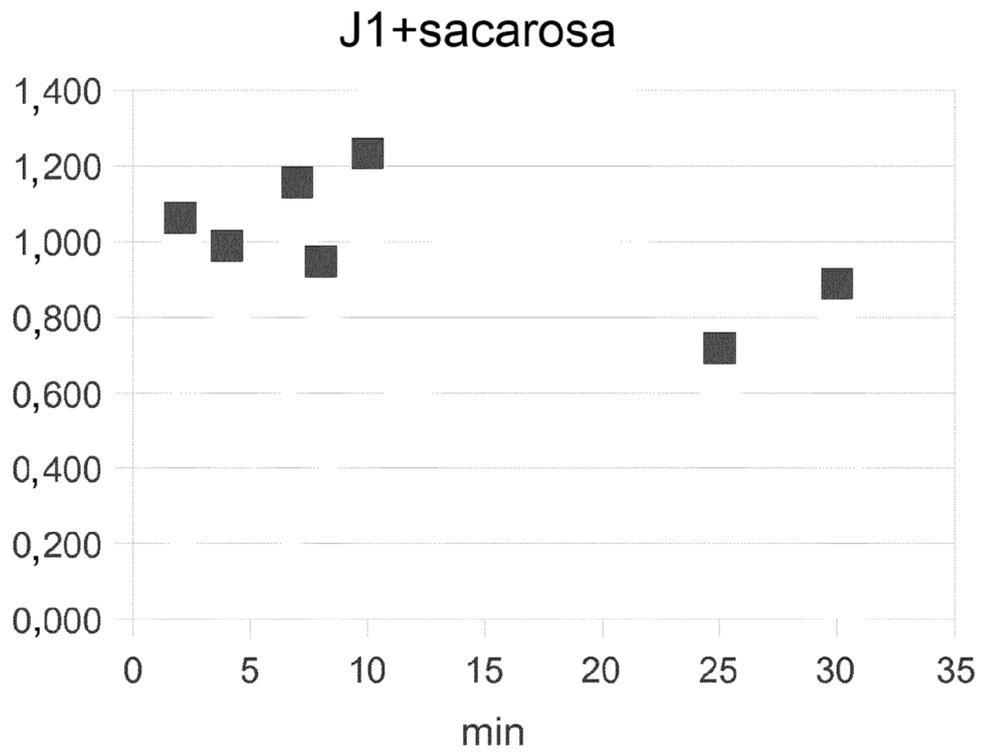


Fig. 2B

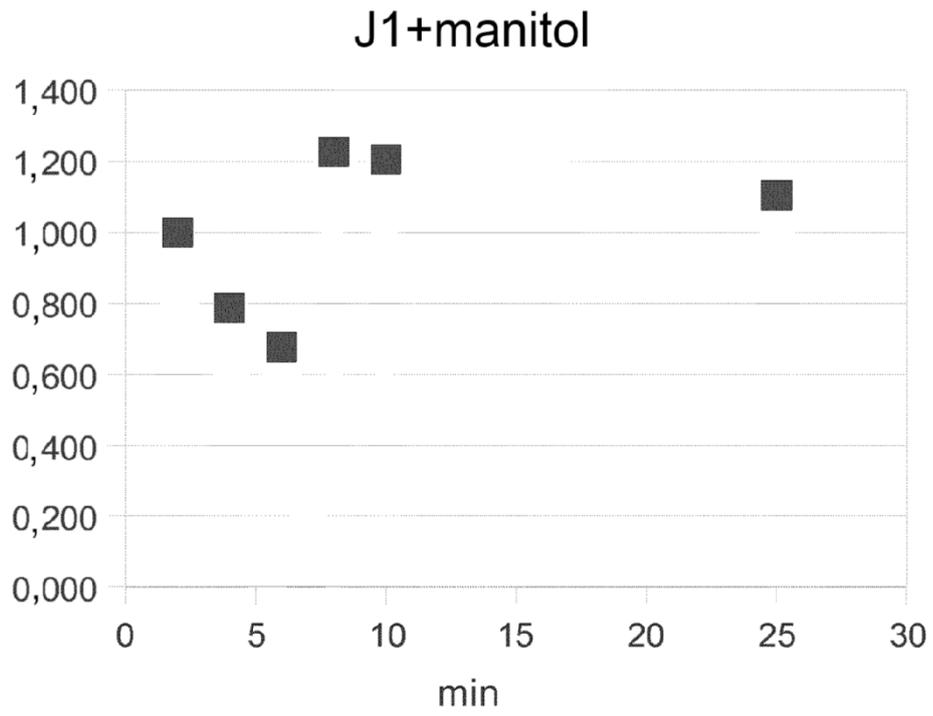


Fig. 2C

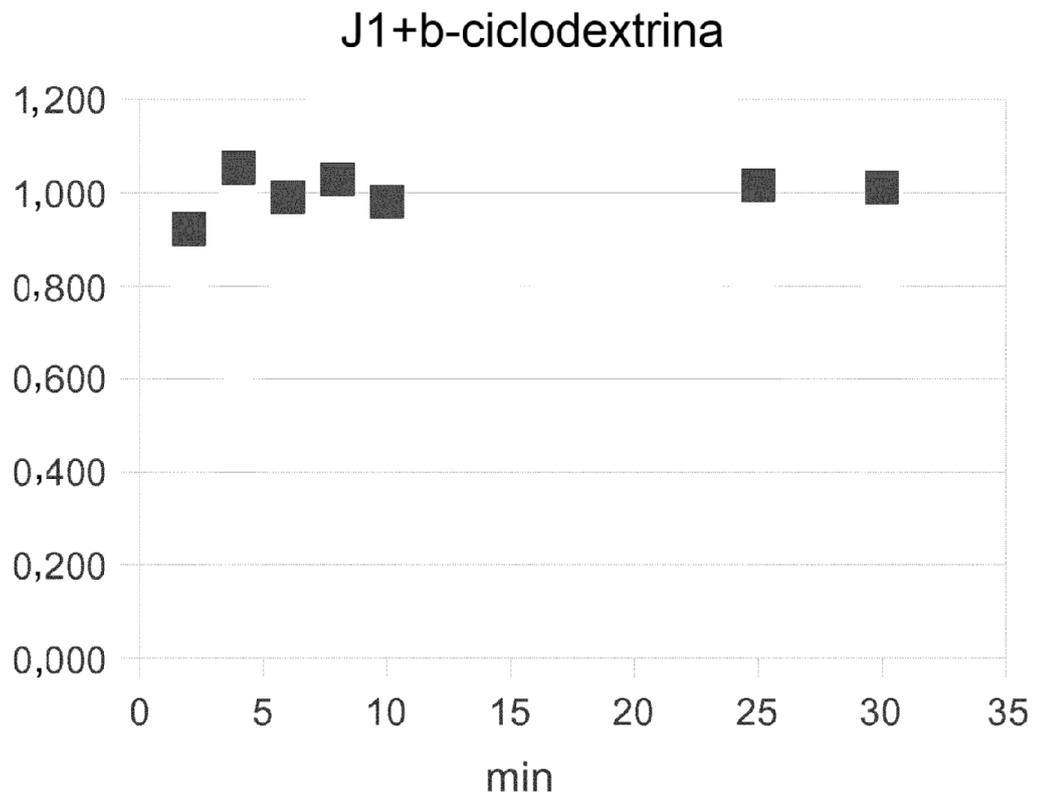


Fig. 2D

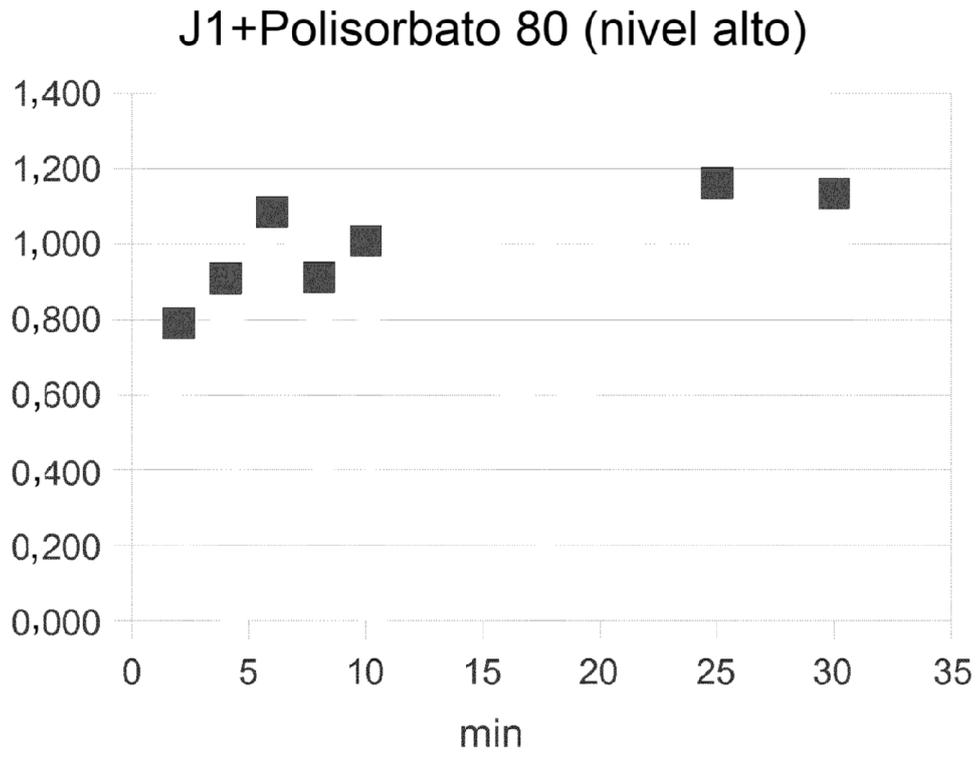


Fig. 2E

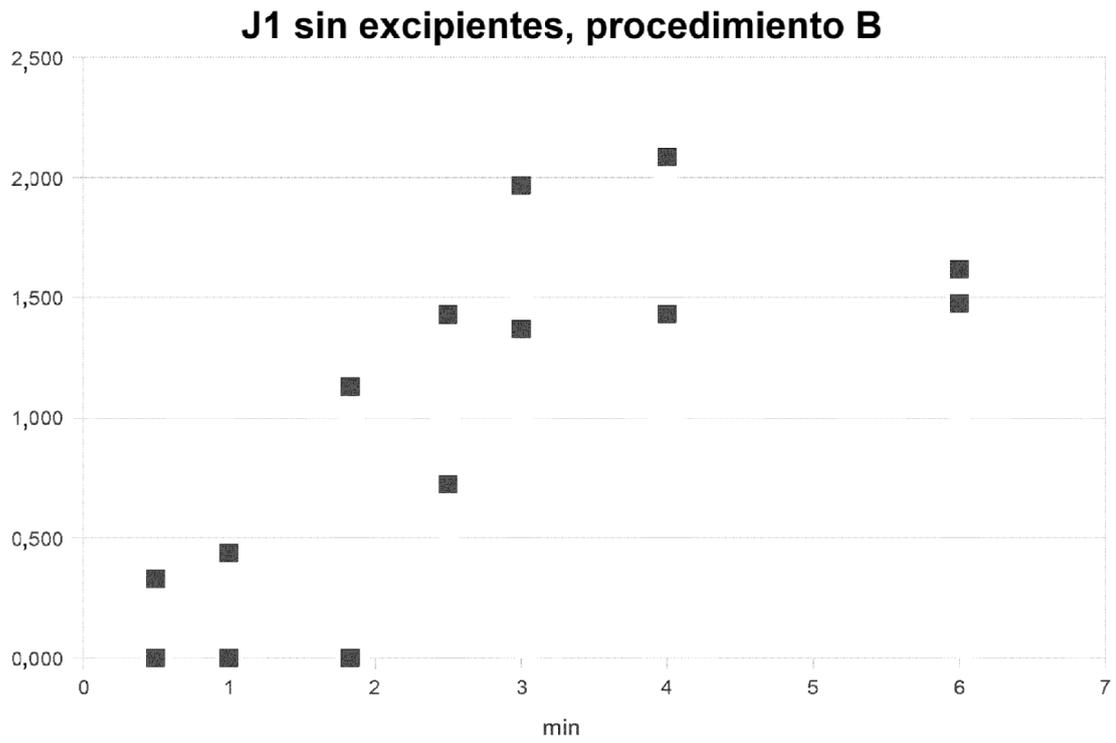


Fig. 3

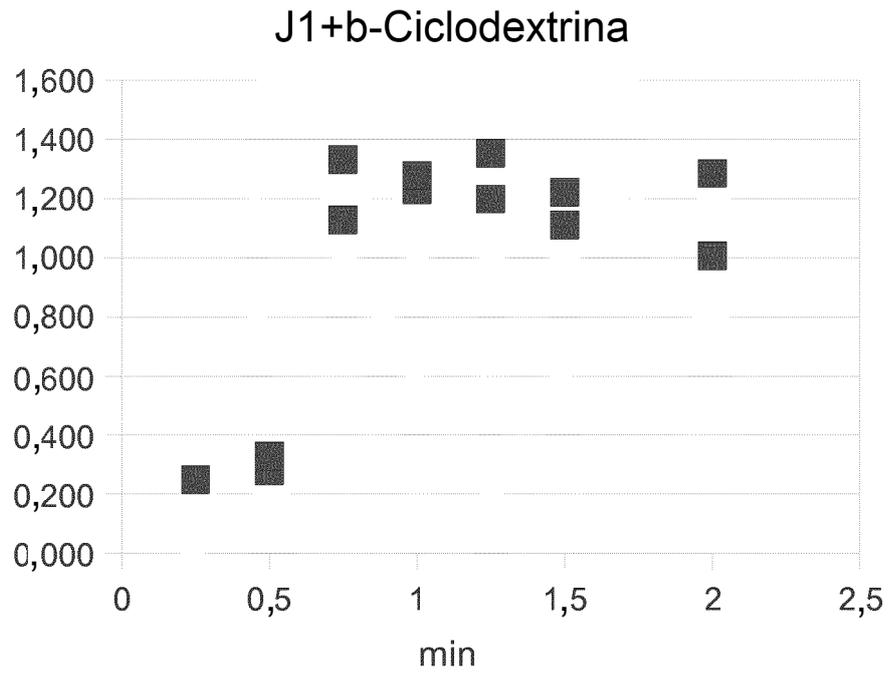


Fig. 4A

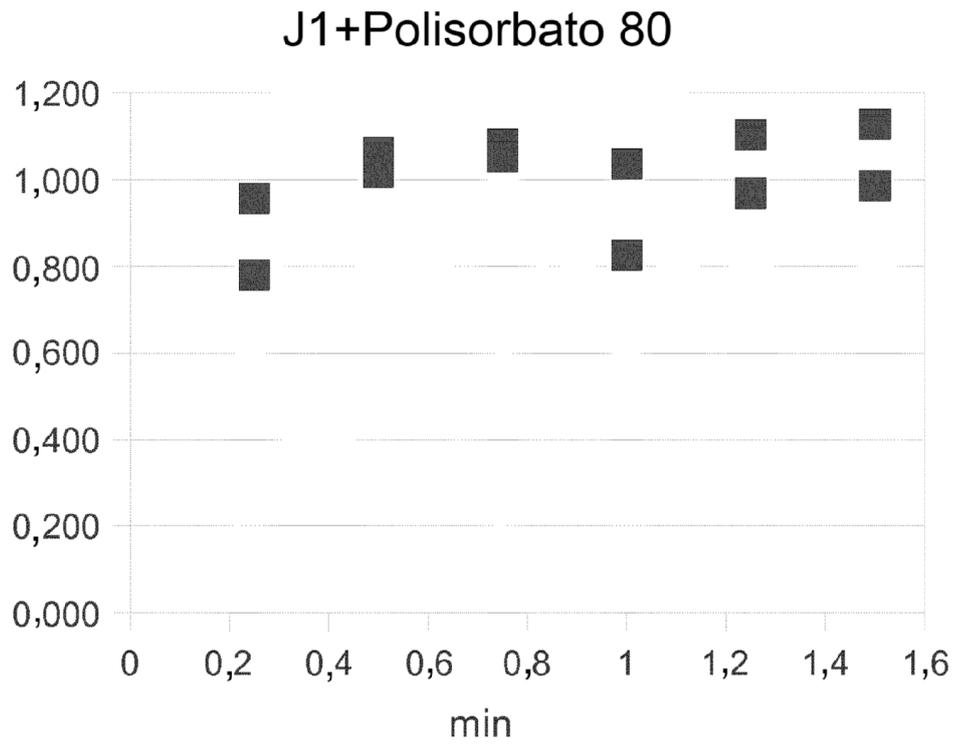


Fig. 4B

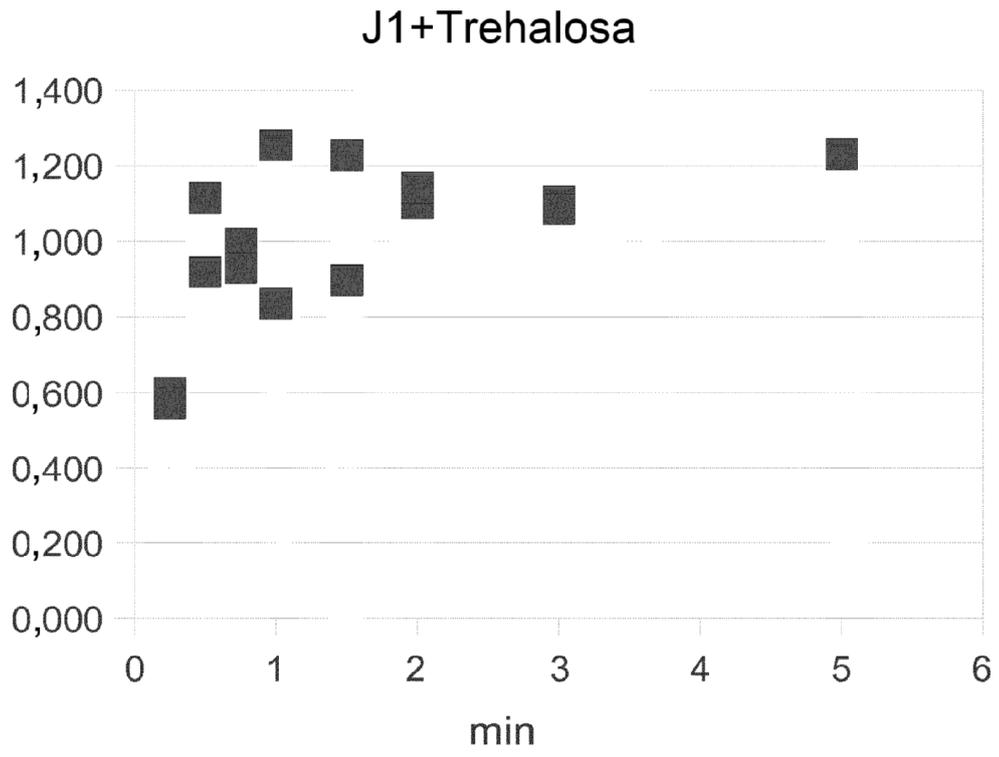


Fig. 4C

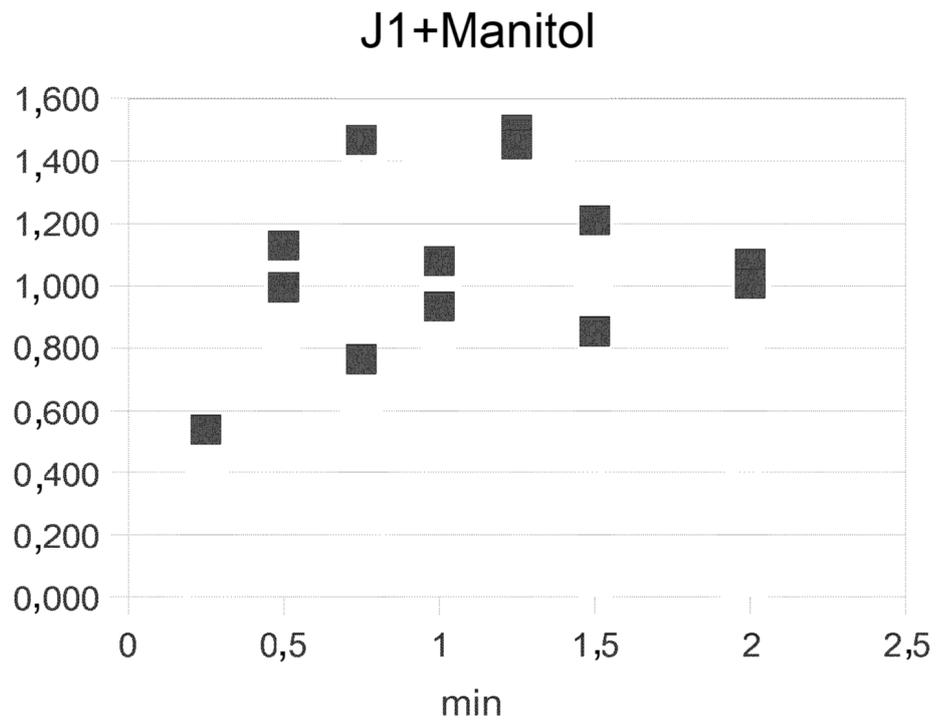


Fig. 4D

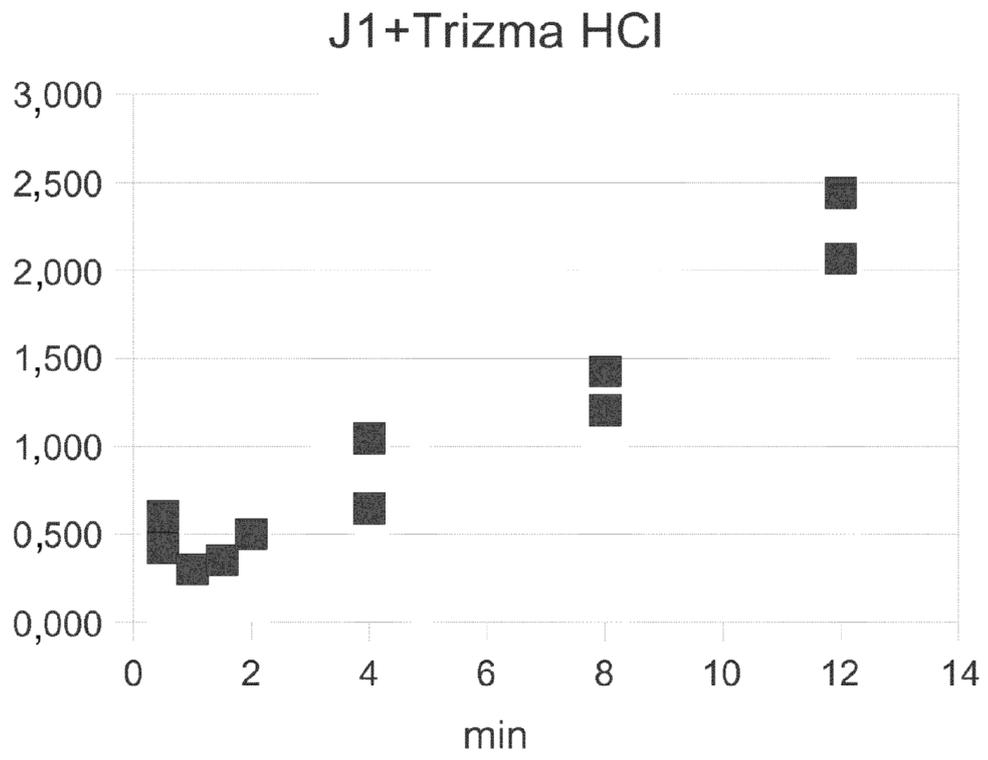


Fig. 4E

**J1 sin polisorbato 80**

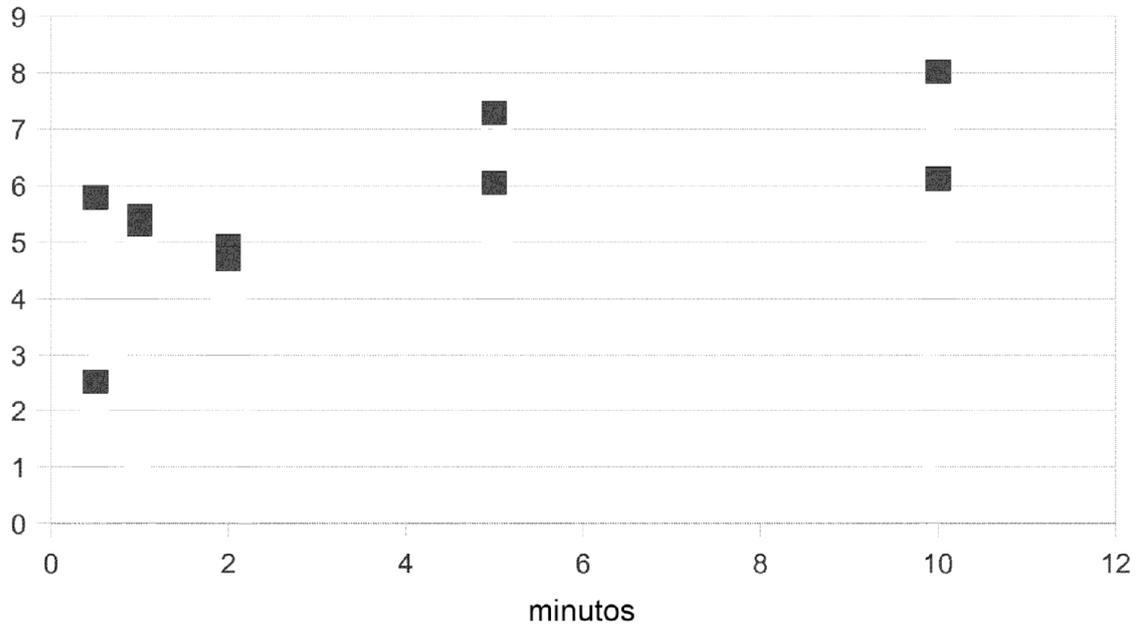


Fig. 5A

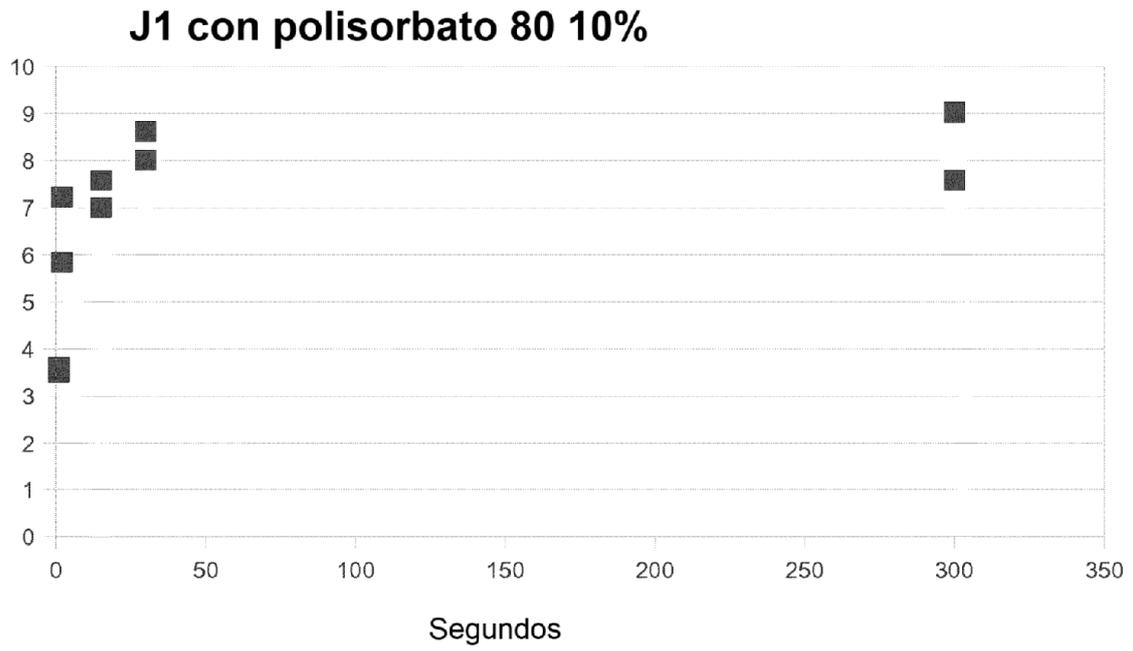


Fig. 5B

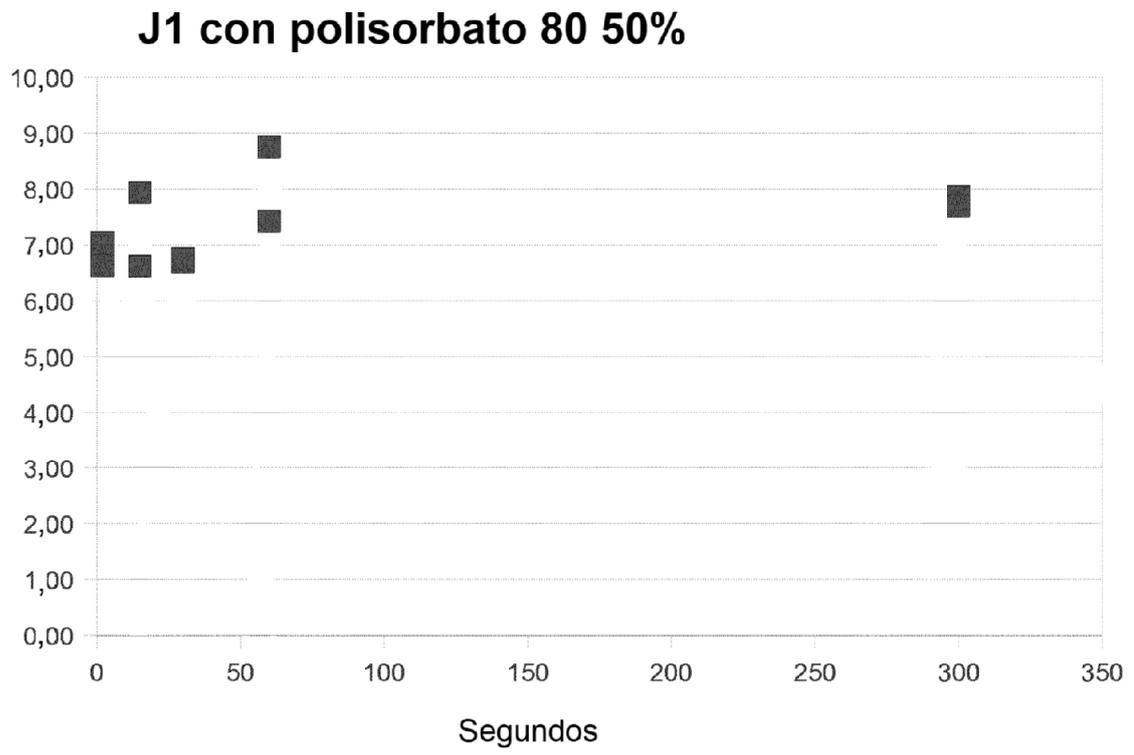


Fig. 5C

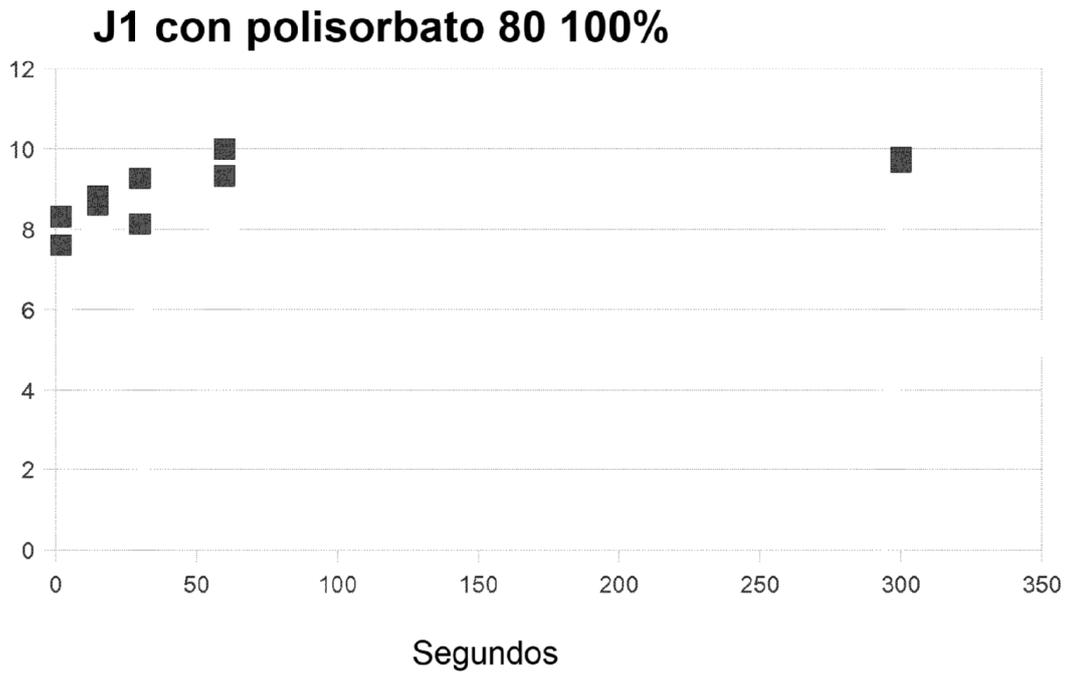


Fig. 5D

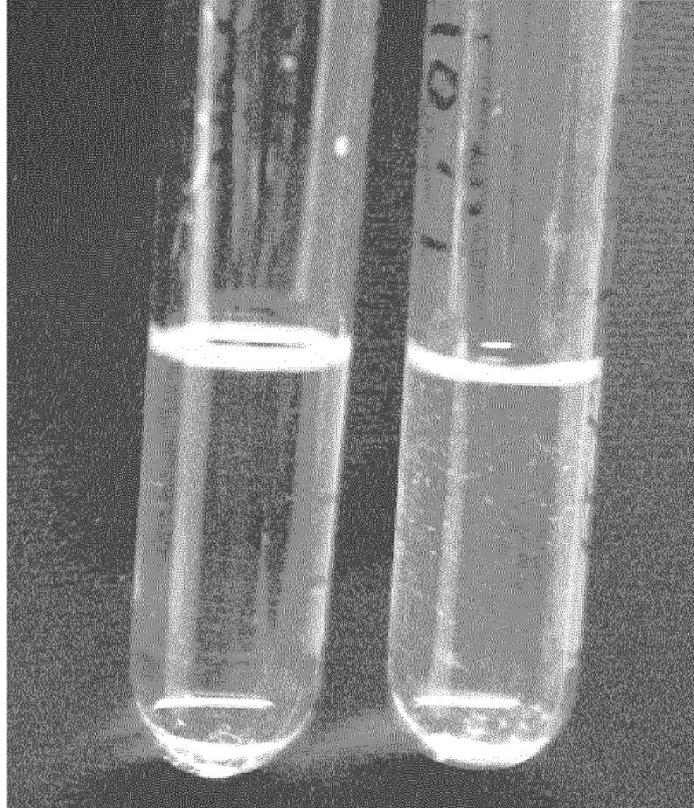
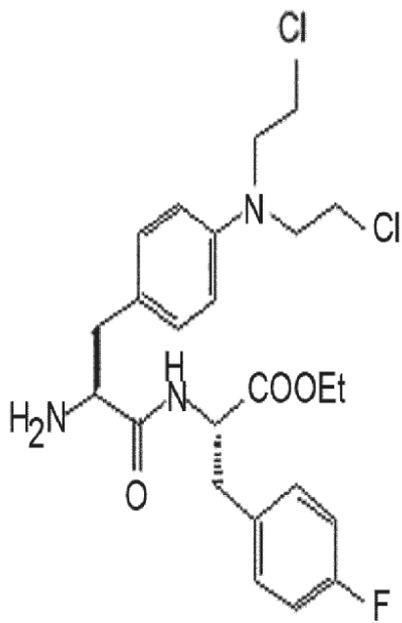
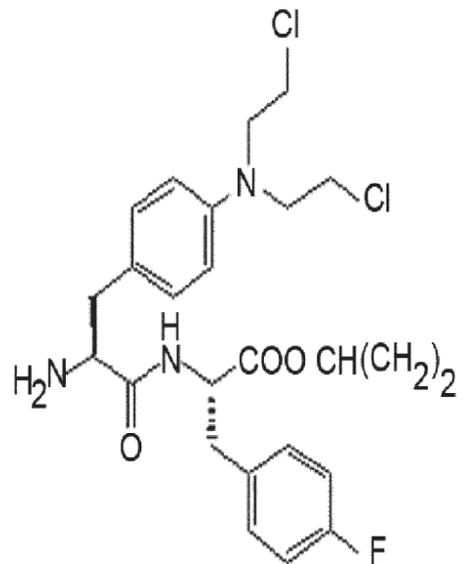


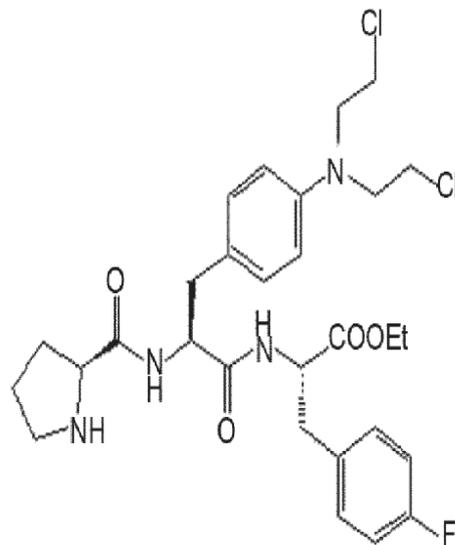
Fig. 6



**J1**



**JV28**



**J3**

Fig. 7