



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2139485 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 31/519 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
A61P 3/02 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2013.03.04
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2012.10.17
(86)	Europeisk søknadsnr	08745614.1
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.04.11
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2010.01.06
(30)	Prioritet	2007.04.11, US, 922821 P 2008.01.08, US, 19753
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
(73)	Innehaver	BioMarin Pharmaceutical Inc., 105 Digital Drive, Novato, CA 94949, USA
(72)	Oppfinner	OPPENHEIMER, Daniel, I., 4516 Hillsborough Drive, Castro Valley, CA 94546, USA DORENBAUM, Alejandro, 120 Stanford Avenue, Mill Valley, CA 94941, USA OKHAMAFE, Augustus, 5310 Crystyl Ranch Drive, Concord, CA 94521, USA FOEHR, Erik, 1554 Buchanan Street, Novato, CA 94947, -USA CASTILLO, Sianna, 400 25th Avenue, 5, San Francisco, CA 94121, USA KOSTEL, Paul, John, 2623 Cactus Avenue, Santa Rosa, CA 95405, USA
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Fremgangsmåter for administrering av tetrahydrobiopterin, assosierte preparater og metoder for måling
(56)	Anførte publikasjoner	US-A- 4 550 109 US-A1- 2006 194 808 WO-A-2004/058268 PONZONE A ET AL: "Hyperphenylalaninemia and pterin metabolism in serum and erythrocytes.", CLINICA CHIMICA ACTA; INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL CHEMISTRY 16 JUL 1993 LNKD- PUBMED:8222274, vol. 216, no. 1-2, 16 July 1993 (1993-07-16), pages 63-71, ISSN: 0009-8981

Beskrivelse

[0001] KRYSSREFERANSER TIL BESLEKTEDE SØKNADER Denne søknaden krever prioritet fra amerikanske midlertidige søknader Nr. 60/922, 821, innlevert 11. april 2007, og
5 61/019, 753, innlevert 8. januar 2008.

BAKGRUNN

Teknikkens område

[0002] Foreliggende oppfinnelse er generelt rettet mot preparater for behandling av BH4-responsive sykdommer, og preparater for påvisning og kvantifisering av biopteriner.
10

Bakgrunnsteknikk

[0003] Tetrahydrobiopterin (referert til her som BH4) er et biogent amin i den naturlige forekommende pterin familien som er en kofaktor for en rekke forskjellige enzymer, inkludert
15 fenylalaninhydroksylase (PAH), tyrosinhydroksylase, tryptofanhydroksylase og nitrogenoksydsyntase. Pterins er tilstedet i fysiologiske væsker og vev i reduserte og oksyderte former, imidlertid er bare 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin biologisk aktivt. Det er et kiralt molekyl og 6R-enantiomeren av kofaktoren er kjent for å være den biologisk aktive enantiomeren. For en detaljert gjennomgang av syntesene og lidelsene av BH4 se Blau et al., 2001 (Disorders of
20 tetrahydrobiopterin and related biogenic amines, I: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Vogelstein B, red. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 8. utg. New York: McGraw-Hill, 2001: 1275-1776).

[0004] Fiege, et al., 81:45-51 (2004) studerte farmakokinetikken av oralt administrert tetrahydrobiopterin (BH4) og foreslo en "ganske stor variabilitet av oralt administrert BH4,
25 sannsynligvis på grunn av ulik absorpsjon i tarmen og/eller til første passasje effekten.

[0005] US-A-4,550,109 beskriver lipoidale biopteriner og tetrahydrobiopteriner som er oljeløselige og kan formuleres som et oljebasert farmasøytikum anvendelig for behandling av fenylketonuri, Parkinsonisme, depresjon, senil demens, Alzheimers sykdom og beslektede biopterin mangelsykdommer.

[0006] Bruk av tetrahydrobiopterin har blitt foreslått for behandling av en rekke forskjellige sykdomstilstander, og det eksisterer et behov for alternative og forbedrede fremgangsmåter for
30 å administrere dette stoffet.

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

[0007] Foreliggende oppfinnelse angår 6R-(L-erytro)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (BH4), eller
35 et farmasøytisk akseptabelt salt derav, for bruk ved behandling av hyperfenylalaninemia, på en måte som forbedrer eller maksimerer dets orale biotilgjengelighet og/eller forbedrer eller

optimaliserer konsistensen av oral biotilgjengelighet fra én administrasjon til den neste. Slike anvendelser kan benyttes ved behandling av enhver BH4-responsiv lidelse, inkludert metabolske sykdommer, kardiovaskulære sykdommer, anemi, og nevropsykiatriske lidelser.

Anvendelsen av oppfinnelsen tillater på en fordelaktig måte bedre kontroll av kliniske symptomer, f.eks. redusert svingningen i plasma fenylalaninnivået, blodtrykket, neurotransmitter nivåer, eller andre kliniske parametere.

[0008] Som anvendt her refererer BH4 til 6R-(L-erytro)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin. Begrepet BH4 som anvendt her skal også forstås til eventuelt å bety et farmasøytisk akseptabelt salt av 6R-(L-erytro)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin, med mindre sammenhengens tilsier noe annet.

[0009] Omfanget av oppfinnelsen er begrenset av de vedlagte krav.

[0010] I et første aspekt tilveiebringer oppfinnelsen metoder for oral administrering, til en pasient som trenger det, av et rensset preparat med BH4.

[0011] I en eksempelvis utførelsesform, informeres pasienten om at absorpsjon av tetrahydrobiopterin økes når det inntas sammen med mat i forhold til når de inntas uten mat. I noen utførelsesformer informeres pasienten om at inntak kort tid etter et måltid, for eksempel et fettriikt, høykalori-måltid, resulterer i en økning av én, to, tre eller alle av følgende parametere: gjennomsnittlig plasmakonsentrasjon, C_{max}, AUC, AUC (0-t) og/eller AUC (inf). I eksempelvis utførelsesformer informeres pasienten om at administrering av BH4 med et fettriikt måltid øker C_{max} og AUC sammenlignet med administrasjon av BH4 uten mat (i en fastende tilstand). I noen utførelsesformer kan den relative økningen være minst 20 % eller 30 % eller mer.

[0012] I alternative utførelsesformer, eller i tillegg til de foregående utførelsesformene, omfatter fremgangsmåten for å administrere tetrahydrobiopterin å informere pasienten om at absorpsjon av tetrahydrobiopterin økes når det inntas som en intakt tablett sammenlignet med når det inntas etter å være løst i væske. I noen utførelsesformer informeres pasienten om at inntak av intakte tabletter resulterer i en økning i en av følgende parametere: gjennomsnittlig plasmakonsentrasjon, C_{max}, AUC, AUC (0-t) eller AUC (inf). I eksempelvis utførelsesformer informeres pasienten om at administrering av BH4 som en intakt tablett øker C_{max} og AUC sammenlignet med administrasjon av BH4 etter løsning i en væske. I noen utførelsesformer, kan den relative økningen være minst 20 % eller mer.

[0013] Ethvert av de foregående utførelsesformene kan utføres ved å tilby eller administrere tetrahydrobiopterin i en beholder inneholdende trykt etikett som informerer pasienten om endringen i absorpsjonsparametere beskrevet ovenfor.

[0014] Den foreliggende oppfinnelse omfatter trinnet å tilveiebringe, til pasienten som trenger det, en terapeutisk effektiv mengde av tetrahydrobiopterin. Den terapeutisk effektive mengden vil variere avhengig av tilstanden som skal behandles, og kan lett bestemmes av den behandelende lege basert på forbedring i ønskede kliniske symptomer.

[0015] I én eksempelvis utførelsesform involverer slike anvendelser administrering av BH4 i en løst form, hvor formuleringen er løst i en væske, inkludert men ikke begrenset til vann,

appelsinjuice og eplesoft. Således kan BH4 inntas som et flytende produkt eller pre-løst fra en fast eller halvfast doseringsform før inntak. I en ytterligere utførelsesform kan BH4 også bli løst fra en fast eller halvfast doseringsform i munnhulen før den løste løsningen svelges.

[0016] I en annen eksempelvis utførelsesform involverer slike anvendelser administrering av BH4 i en fast doseringsform, inkludert, men ikke begrenset til tabletter, kapsler, drops, pastiller, pulver og granulater, eller halvfast form, inkludert, men ikke begrenset til, en forklistret oralgele, som svelges uten løsning i en væske, inkludert, men ikke begrenset til vann, appelsinjuice og eplejuice, før svelging.

[0017] I en annen utførelsesform involverer slike metoder administrering av BH4, enten svelget som en fast eller halvfast doseringsform, eller løst i en væske, med mat, f. eks. en fettrik matvare eller et fettrikt- og/eller høykalori-måltid. Oppfinnelsen overveier videre at BH4, enten svelget eller løst, administreres på et bestemt tidspunkt, inkludert men ikke begrenset til, morgenen, dag, kveld, samme tidspunkt på dagen, med mat, f. eks. en fettrik matvare eller et fettrikt og/eller høykalori-måltid, en eller flere ganger om dagen. I en eksempelvis utførelsesform inntas BH4 én gang daglig som en fast doseringsform like etter måltider. I en foretrukket utførelsesform er den faste doseringsformen en formulert tablett eller kapsel. I flere eksempelvis utførelsesformer inntas BH4 innen omtrent 0-30 minutter, eller 5 til 20 minutter, etter å ha spise et måltid. Uansett om det er inntatt som en fast doseringsform, flytende doseringsform eller som en løst løsning, er *in vivo* eksponeringen (eller biotilgjengeligheten) av BH4 høyere når det inntas like etter måltider sammenlignet med fastende kontroller.

[0018] BH4 og maten kan inntas på samme tid, eller BH4 kan svelges etter maten. Tidsrommet mellom inntak av maten og inntak av BH4, enten svelget eller løst, kan være minst 5 minutter. For eksempel kan BH4 administreres 30 minutter, 25 minutter, 20 minutter, 15 minutter, 10 minutter, eller 5 minutter etter et måltid.

[0019] I en annen utførelsesform, for noen pasienter, f.eks. voksne, innebærer anvendelsen av oppfinnelsen administrering av en intakt tablett fremfor å løse tablett i en væske, for å forbedre biotilgjengelighet.

[0020] En fremgangsmåte for stabilisering av BH4 i pasientens tarmkanal ved å redusere intestinal pH, omtales her, f.eks. ved hjelp av protonbytter polymerer. Tilsvarende produkter omfattende BH4 og forsurende eksipiensers slike som protonbytter polymerer, er også overveiet.

[0021] En fremgangsmåte for å øke oppholdstiden i tarmen for BH4, inkluderer, men er ikke begrenset til, å redusere tarmmotiliteten ved bruk av et middel som reduserer tarmmotilitet, for eksempel en fettsyre og/eller en glyserolfettsyreester beskrives her. Slike hydrofobe agens kan øke lengden på tiden som BH4 forblir i tarmen og kan øke mengden av BH4 som blir absorbert. Lengden av tid som BH4 forblir i tarmen, når de formuleres med slikt(slike) middel (midler), kan være minst en og en halv gang, minst to ganger, minst tre ganger, minst fire ganger, eller minst fem ganger lenger enn en BH4 formulering som ikke har et slikt agens.

Egnede fettsyrer innbefatter oljesyre, stearinsyre, arachidinsyre, palmitinsyre, archidoin-syre, linolsyre, linolensyre, erucidinsyre, myristinsyre, laurinsyre, myristolinsyre, og palmitolin-syre. Også overveiet for å øke tarmoppholdstiden for BH4 er tilskyndelse av ventrikkel-retensjon ved bruk av algininsyre, og bioadhesjon ved bruk av polykarbofil. Tilsvarende

5 produkter omfattende BH4 og agens som reduserer tarmmotiliteten er overveid.
[0022] En fremgangsmåte for å modifisere frigjøringen av BH4 ved bruk av en forlenget frigjøringsformulering slik som HPMC, karbomer, etc. er beskrevet her. Tilsvarende produkter som er forlenget frigjøringsformuleringer er påtenkt.

[0023] En flytende formulering av tetrahydrobiopterin (BH4) eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav beskrives her, inkludert en vandig løsning av BH4 eller farmasøytisk akseptabelt salt derav, en antioksidant, og en pH-buffer.

10 **[0024]** En fremgangsmåte for fremstilling av en flytende formulering av tetrahydrobiopterin (BH4) eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav beskrives her, inkludert å tilveiebringe en vandig løsning inneholdende BH4 eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, tilsette en anti-
 15 oksidant og en pH-buffer til løsningen inneholdende BH4 eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, oversprøyte den vandige løsning inneholdende BH4 eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, før eller etter tilsetning av antioksidant og pH-buffer, med en inert gass eller karbondioksid, og forsegle den oversprøytete løsningen inneholdende BH4 eller et farma-
 søytisk akseptabelt salt derav, antioksidant, og pH buffer i en beholder.

20 **[0025]** En forbedret fremgangsmåte for å måle BH4 ved å benytte tandem massespektrometri og beregne mengden av redusert biopterin beskrives også her. Slike metoder kan tilveiebringe deteksjon av BH4 med en følsomhet for BH4 i området på 5 til 1000 ng/ml, med en nøyaktighet og presisjon som eksemplifisert ved en variasjonskoeffisient (CV) % på under 15 % (20 % ved den nedre grensen for kvantifisering, ("lower limit of quantitation" LLOQ)). I en
 25 eksempelvis utførelsesform omfatter en fremgangsmåte for måling av BH4 ved bruk av HPLC (RP) kombinert med tandem massespektrometri (LC/MS/MS) trinnene: (1) utsette prøver av blod, plasma, vevshomogenater eller urin for oksydasjon; (2) utsette de oksyderte prøvene for jodometri, (3) passere de oksyderte prøvene gjennom en ionebytterkolonne, (4) måle totalt og oksidert biopterin i nevnte prøver ved bruke av HPLC og tandem massespektrometri; og
 30 beregne mengden av redusert biopterin som forskjellen mellom nevnte totale biopteriner minus nevnte oksiderte form. I en utførelsesform behandles prøvene med syre-oksidasjon, hvor fremgangsmåten omfatter trinnene (1) behandle nevnte prøver med KCl, HCl eller TCA, (2) utsette nevnte syreoksidert prøver for jodometri, (3) passere nevnte oksyderte prøver gjennom en ionebytterkolonne, (4) måle totalt biopterin omfattende 6R-BH4, R-q-DHBP (som
 35 umiddelbart reduseres *in vivo* til 6R-BH4 slik at det målte reduserte biopterinet er hovedsakelig basert på 6R-BH4), DHBP og BP i nevnte prøver ved å bruke HPLC og tandem massespektrometri. I en annen utførelsesform behandles prøvene med alkalisk oksydasjon, hvor fremgangsmåten omfatter: (1) behandle nevnte prøver med KI, I eller NaOH, (2) utsette nevnte alkaliske, oksyderte prøver til surgjøring med HCl eller TCA, (3) underkaste de nevnte

oksydert prøvene for jodometri, (4) passere nevnte prøver gjennom en ionebytterkolonne, (5) måle oksydert biopterin omfattende DHBP og BP ved bruk av HPLC og tandem masse-spektrometri, og (6) beregne mengden av redusert biopterin (6R-BH4 + Rq-DHBP) som forskjellen mellom totale biopteriner fratrasket oksidert form.

[0026] En mobil fase løsning beskrives her for revers-fase HPLC separasjon av dihydro-biopterin, biopterin, og analoger derav, inkludert en vandig løsning som inkluderer metanol, natriumacetat, sitronsyre, EDTA, og 1,4-ditioerytritol. Tilsvarende er det overveid en fremgangsmåte for å separere dihydrobiopterin og biopterin, eller analoger derav, fra en blanding som inneholder både base- og dihydro-former, inkludert å utføre revers-fase HPLC ved anvendelse av en mobil fase som omfatter en vandig løsning som omfatter metanol, natriumacetat, sitronsyre, EDTA, og 1,4-ditioerytritol, på en blanding inneholdende dihydro-biopterin og biopterin, eller en analog av dihydrobiopterin og en analog av biopterin.

[0027] En fremgangsmåte for kvantifisering av biopteriner i en blanding av biopterin-arter, beskrives her som inkluderer å tilveiebringe en blanding omfattende biopterin og minst ett av dihydrobiopterin og tetrahydrobiopterin, eller analoger av biopterin og minst ett av dihydro-biopterin og tetrahydrobiopterin, separere biopterin-artene i blandingen ved revers-fase HPLC, og i tilfelle av tetrahydrobiopterin og analoger derav, utføre elektrokjemisk deteksjon ved å oksydere de tilstedeværende tetrahydrobiopterin og analoger derav ved en første elektrode til kinonoid-dihydrobiopterin-former, etterfulgt av å redusere de tilstedeværende kinonoide formene tilbake til tetrahydrobiopterin og analoger derav ved en andre elektrode, og å måle strømmen generert av reduksjonsreaksjonen for å bestemme konsentrasjonen av arter, og/eller i tilfelle av dihydrobiopterin, analoger derav, biopterin, eller analoger derav, å måle slike arter med fluorescensdeteksjon etter post-kolonne oksydasjon av dihydrobiopterin-arter til biopterin.

[0028] For de preparater og fremgangsmåter som er beskrevet her, kan foretrukne komponenter og sammensetningsutvalg derav, velges fra de forskjellige eksemplene tilveiebrakt her.

[0029] Andre trekk og fordeler ved oppfinnelsen vil fremgå fra den følgende detaljerte beskrivelse.

KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

[0030]

Figur 1 viser et pulver røtgendiffraksjonsmønster karakteristisk for krystall polymorf form B av 6R-(L-erytro)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin.

Fig. 2 er et diagram av det karakteristiske røtgendiffraksjonsmønsteret vist ved form A av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid.

Fig. 3 er et diagram av det karakteristiske røtgendiffraksjonsmønsteret vist ved form F av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid.

Figur 4 er et diagram av det karakteristiske røtgendiffraksjonsmønsteret vist ved form J av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid.

Figur 5 er et diagram av det karakteristiske røtgendiffraksjonsmønsteret vist ved form K av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid.

Fig. 6 er et diagram av det karakteristiske røtgendiffraksjonsmønsteret vist ved hydrat-form C av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid.

Figur 7 er et diagram av det karakteristiske røtgendiffraksjonsmønsteret vist ved hydrat-form D av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid.

Figur 8 er et diagram av det karakteristiske røtgendiffraksjonsmønsteret vist ved hydrat-form E av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid.

Figur 9 er et diagram av det karakteristiske røtgendiffraksjonsmønsteret vist ved hydrat-form H av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid.

Figur 10 er et diagram av det karakteristiske røtgendiffraksjonsmønsteret vist ved hydrat-form O av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid.

Figur 11 er et diagram av det karakteristiske røtgendiffraksjonsmønsteret vist ved solvat-form G av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid.

Figur 12 er et diagram av det karakteristiske røtgendiffraksjonsmønsteret vist ved solvat-form I av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid.

Figur 13 er et diagram av det karakteristiske røtgendiffraksjonsmønsteret vist ved solvat-form L av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid.

Figur 14 er et diagram av det karakteristiske røtgendiffraksjonsmønsteret vist ved solvat-form M av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid.

Figur 15 er et diagram av det karakteristiske røtgendiffraksjonsmønsteret vist ved solvatform N av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid.

Fig. 16 er et flytdiagram for måling av biopterin.

Figur 17 er et sammendrag av validering av biopterin analysen.

5 Figur 18 er en tabell som viser farmakokinetiske parametere av totalt biopteriner i plasma etter en enkelt oral administrasjon av sapropterin (BH4) til rotter.

Figur 19 viser plasma biopterin konsentrasjon og redusert-form ratio etter en enkelt dose av sapropterin (BH4) til rotter.

10

Figur 20 viser plasma biopterin konsentrasjon og redusert-form ratio etter en enkelt dose av sapropterin (BH4) til aper.

15

Figur 21 er en tabell som viser farmakodynamiske parametere av totalt biopteriner i plasma etter en enkelt dose av sapropterin (BH4) til aper.

Figur 22 viser tidsplan for hendelser for evaluering av sikkerhet.

20

Figur 23 viser den gjennomsnittlige plasmakonsentrasjonen av BH4 etter oral administrasjon av 10 mg/kg av BH4 som løste og intakte tabletter under fastende forhold og intakte tabletter under ikke-fastende forhold til friske frivillige - lineære akser.

25

Figur 24 viser den gjennomsnittlige plasmakonsentrasjonen av BH4 etter oral administrasjon av 10 mg/kg av BH4 som løste og intakte tabletter under fastende forhold og intakte tabletter under ikke-fastende forhold til friske frivillige - semi-logaritmisk akser.

30

Figur 25 viser en tabell som oppsummerer de farmakokinetiske parametere for BH4 etter oral administrasjon av 10 mg/kg av BH4 som løste og intakt tabletter under fastende forhold og intakte tabletter under ikke-fastende forhold til friske frivillige.

35

Figur 26 viser en statistisk sammenligning av farmakokinetiske parametere for BH4 etter oral administrasjon av 10 mg/kg av BH4 som løste og intakt tabletter under fastende forhold og intakte tabletter under ikke-fastende forhold til friske frivillige.

Figur 27 viser en stabilitetsstudie av BH4 formulert med 5 % mannitol i en vandig løsning både før og etter to uker lagret ved -20 °C.

Figur 28 viser en løselighetsprofil av en BH4 kapselformulering både før og etter lagring i 54 dager ved 40 °C.

Figur 29 viser en løselighetsprofil av to BH4 formuleringer - en BH4 bioadhesive tablett og BH4 bioadhesive granulater

Figur 30 viser en løselighetsprofil av ulike vedvarende-frigjøringsformuleringer av BH4.

Figur 31 viser en løselighetsprofil av ulike vedvarende-frigjøringsformuleringer av BH4.

Figur 32 viser et skjematisk diagram av flytende doseringsformuleringer av BH4.

Figur 33 viser en løselighetsprofil av ulike flytende doseringsformuleringer.

Figur 34 viser et skjematisk diagram av gassgenererende doseringsformer av BH4.

Figur 35 viser en farmakokinetisk profil av ulike BH4 formuleringer.

Figur 36 viser en stabilitetsstudie av intravenøse BH4 formuleringer med pH 4 over 35 dager.

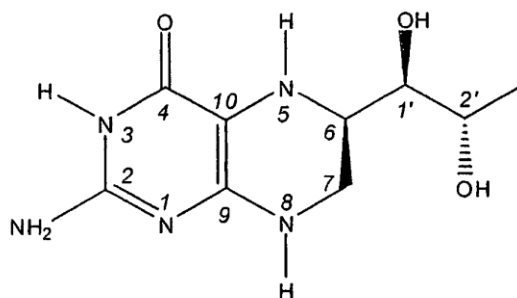
Figur 37 viser en stabilitetsstudie av ulike intravenøse BH4 formuleringer over 350 timer.

Figur 38 viser en stabilitetsstudie av intravenøse BH4 formuleringer med ulike BH4 konsentrasjoner.

BESKRIVELSE AV FORETRUKNE UTFØRELSESFORMER

[0031] Oppfinnelsen tilveiebringer tetrahydrobiopterin (BH4) eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav for anvendelse til å behandle hyperfenylalaninemi, hvor BH4 eller saltet derav administreres oralt i løpet av 0-30 minutter etter et måltid eller anvendelse av tetrahydrobiopterin (BH4) eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav til fremstilling av et medikament for å behandle hyperfenylalaninemi, hvor medikamentet er for separat oral administrering innen 0-30 minutter etter et måltid. Oppfinnelsen er basert på funnet av at oralt administrert tetrahydrobiopterin (BH4) har lav gastrointestinal absorpsjon, som er en viktig medvirkende faktor til den lave biotilgjengelighet av BH4.

[0032] Den kjemiske strukturen av 6R-(L-erythro)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (BH4) er vist nedenfor:



[0033] Tetrahydrobiopterin er en vannløselig, organisk forbindelse med lav lipidløselighet.

5 Basert på en *in silico* eksperimentell analyse ved hjelp av BioLoom programvare (versjon 1,5 fra Biobyte Corp., i Claremont, California), ble oktanol-vann fordelingskoeffisienten av BH4 bestemt til å være -1,17. Optimal penetrasjon av biologiske membraner som anslått ved oktanol/vann fordelingskoeffisienten inntreffer på rundt en log P av 2 eller 100-x ganger høyere lipidløselighet. Selv om en lav ClogP tillater dette substratet å løse seg lett under

10 fysiologiske betingelser, er evnen til substratet til å trenge igjennom bilipidlag i biologiske membraner begrenset, noe som kan begrense oral tilgjengelighet.

[0034] *In vivo* studier på rotter og aper beskrevet her viste at bare 8-11 % av BH4 absorberes i tarmen, mens majoriteten blir utskilt i avføringen når sammenlignet med intravenøs administrasjon av BH4 ved tilsvarende doser. Slik variasjon i absorpsjon av BH4 ble også vist

15 i en studie beskrevet her om virkningen av mat på biotilgjengeligheten av BH4 hos friske mennesker. Selv om administrering av BH4 i vann og appelsinjuice under fastende forhold resulterte i sammenlignbare, gjennomsnittlige plasmakonsentrasjoner og gjennomsnittsverdier for Cmax og AUC(0-t), resulterte administrering av BH4 samtidig med et fettrikt, høykalori-måltid i en signifikant økning i midlere plasmakonsentrasjon og gjennomsnittsverdier for

20 Cmax og AUC(0-t) når BH4 ble administrert i vann.

[0035] Selv om det finnes rikelig med litteratur som beskriver økt biotilgjengelighet under ikke-fastende forhold, så blir denne mat-effekten vanligvis sett ved lipofile (dvs. lipidløselig) vannløselige medikamenter og vanligvis ikke ved høyt vannløselig virkestoff slik som BH4. Den vanlige forklaringen på økningen i biotilgjengelighet under ikke-fastende forhold for

25 lipofile forbindelser er at fettrike måltider bidrar til å løse legemidlet siden "like løser like", og dette gjør det tilgjengelig for absorpsjon. En annen mulig forklaring er at fettrike måltider stimulerer utskillelsen av gallsyrer som er naturlige biotensider som hjelper til å løse og emulgerer fett vi spiser for å hjelpe i deres fordøyelse. Disse gallsyrene er også antatt å løse vannløselige forbindelser og dermed gjør dem tilgjengelig for absorpsjon. Imidlertid trenger

30 ikke BH4 solubilisering for å bli absorbert fordi dens løselighet er større enn 1000 mg/ml og forbindelsen er en av de mest løselige legemidler kjent. Derfor er forbedring av dens biotilgjengelighet ved fettrike, høy-energi måltider ikke i samsvar med slik kjent mekanisme.

[0036] Imidlertid kan administrasjon som en fast eller semi-fast doseringsform og/eller med et fettriikt måltid maksimere biotilgjengeligheten ved å øke oppholdstiden av BH4 i det sure miljøet i magen og øvre gastrointestinaltractus (GIT) hvor BH4 er kjemisk stabilt. Stabiliteten av BH4 avtar med økende pH og halveringstid i pH 6,8 buffer-løsning, som er omtrent pH i tynntarmen, er omtrent 15 minutter. Ved pH 3,1 som er innenfor området for den typiske pH i magen i normale frivillige, er stabiliteten av BH4 ved en konsentrasjon på 1 mg/ml over 3 timer. Den kjemiske stabiliteten av BH4 kan ytterligere øke når pH-verdien i magen synker under pH 3,1. Derfor tilveiebringer forlenget oppholdstid i magen intakt legemiddel til magesekkeveggen for absorpsjon, mens derimot rask tømming inn i tarmen degraderer BH4 som således ikke er tilgjengelig for å bli absorbert.

[0037] For å maksimere oral biotilgjengelighet av BH4 ved hver administrering bør imidlertid BH4 tas sammen med mat, f. eks. fettriik mat eller et fettriikt og/eller høykalori-måltid.

[0038] Som brukt her refererer betegnelsen "biotilgjengelighet" til den del av en administrert dose av et legemiddel som går inn i systemisk sirkulasjon. Hvis legemidlet ble gitt intravenøst, ville dens teoretiske biotilgjengelighet være 100 %. Hvis stoffet imidlertid ble administrert via andre veier (slik som peroralt), så ville dens biotilgjengelighet være mindre enn 100 % som et resultat av for eksempel ufullstendig absorpsjon i gastrointestinal tractus, degradering eller metabolisme før absorpsjon, og/eller hepatisk første passasje effekt.

[0039] Begrepet "fettriikt måltid" refererer generelt til et måltid på minst omtrent 700 kcal og minst omtrent 45 % fett (relativ prosentandel av kcal som er fett), eller alternativt i det minste omtrent 900 kcal og minst omtrent 50 % fett. Begrepet "fettriik mat" refererer generelt til mat omfattende minst 20 g fett, eller minst 25, 30, 35, 40, 45, eller 50 g fett, og/eller i det minste omtrent 45 % eller 50 % fett. En FDA veiledning definerer en "fettriikt måltid" som omtrent 50 % av den totale kalori-innhold av måltidet, mens et "høykalori-måltid" er omtrent 800 til 1000 kalorier. FDA anbefaler et fettriikt og høykalori-måltid som et testmåltid for studier av mat-effekt på biotilgjengelighet og ikke-fastende bioekvivalensstudier. Dette test-måltidet bør hente omtrent 150, 250, og 500-600 kalorier fra henholdsvis proteiner, karbohydrater og fett. Et eksempel på test-måltid består av to egg stekt i smør, to strimler bacon, fire gram av røstipoteter og åtte gram av helmelk. Substitusjon er mulig hvis en tilsvarende mengde kalorier fra proteiner, karbohydrater og fett har sammenlignbare måltidsvolum og -viskositet (Guidance for Industry, Food-Effect Bioavailability and Fed Bioequivalence Studies, U.S.Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), desember 2002).

[0040] I et første aspekt tilveiebringer oppfinnelsen tetrahydrobiopterin (BH4) eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav for anvendelse ved behandling av hyperfenylalaninemia hvor BH4 eller salt derav administreres oralt i løpet av 0-30 minutter etter et måltid.

[0041] I et andre aspekt tilveiebringer oppfinnelsen anvendelse av tetrahydrobiopterin (BH4) eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav til fremstilling av et medikament for behandling av

hyperfenylalaninemia hvor medikamentet administreres oralt i løpet av 0-30 minutter etter et måltid.

[0042] I noen utførelsesformer informeres pasienten om at administrering av tetrahydrobiopterin med mat har en effekt på farmakokinetikk. I en eksempelvis utførelsesform

informeres pasienten om at absorpsjon av tetrahydrobiopterin økes når det er inntatt med mat i forhold til ved inntak uten mat. I noen utførelsesformer informeres pasienten om at inntak kort tid etter et måltid, for eksempel et fettriikt, høykalori-måltid, resulterer i en økning på en, to, tre eller alle av følgende parametre: gjennomsnittlig plasmakonsentrasjon, C_{max}, AUC, AUC(0-t) og/eller AUC (inf). I eksempelvis utførelsesformer informeres pasienten om at administrering av BH₄ med et fettriikt måltid øker C_{max} og AUC sammenlignet med administrering av BH₄ uten mat (i en fastende tilstand). I noen utførelsesformer, kan den relative økningen være minst 20 % eller 30 % eller mer.

[0043] I alternative utførelsesformer, eller i tillegg til de foregående utførelsesformer, informeres pasienten om at absorpsjon av tetrahydrobiopterin øker når det inntas som en intakt tablett i forhold til når det inntas etter å ha blitt løst i væske. I noen utførelsesformer informeres pasienten om at inntak av intakte tabletter resulterer i en økning i noen av følgende parametre: gjennomsnittlig plasmakonsentrasjon, C_{max}, AUC, AUC(0-t) eller AUC (inf). I eksempelvis utførelsesformer informeres pasienten om at administrering av BH₄ som en intakt tablett øker C_{max} og AUC sammenlignet med administrering av BH₄ etter løsning i en væske. I noen utførelsesformer, kan den relative økningen være minst 20 % eller mer.

[0044] Ethvert av de foregående utførelsesformer kan utføres ved å tilveiebringe eller administrere tetrahydrobiopterin i en beholder inneholdende trykt etikett som informere pasienten om endringen i absorpsjonparametre beskrevet ovenfor.

[0045] Den foreliggende oppfinnelsen omfatter også trinnet tilveiebringelse til pasienten som trenger det en terapeutisk effektiv mengde av tetrahydrobiopterin. Den terapeutisk effektive mengden vil variere avhengig av tilstanden som skal behandles, og kan lett bestemmes av den behandlende lege basert på forbedring i ønskede kliniske symptomer.

[0046] I en eksempelvis utførelsesform involverer slike anvendelser administrering av BH₄ i en løst form, hvor formuleringen er løst i en væske, inkludert, men ikke begrenset til vann, appelsinjuice og epleaft. Således kan BH₄ inntas som et flytende produkt eller pre-løst fra en fast eller halvfast doseringsform før inntak. I en ytterligere utførelsesform kan BH₄ også bli løst i munnhulen fra en fast eller halvfast doseringsform før svelging av den løste løsningen.

[0047] Disse tilnærmingene maksimerer absorpsjonshastigheten og biotilgjengelighet ved å sikre at BH₄ er fullstendig løst i løsning eller biologisk væsker før det leveres til dets absorpsjonsområder, som hovedsakelig er magen og tarmen. Løsning av aktive farmasøytiske ingredienser eller legemiddel i løsning er en forutsetning for absorpsjon inn i den systemisk (blod og lymfatiske) sirkulasjonen. Når faste doseringsformer som tabletter og kapsler administreres oralt, går de gjennom en sekvensiell serie av trinn slik som desintegrasjon til granuler, deaggregering til pulver og løsning før absorpsjon i den systemiske sirkulasjonen.

Disse seriene av trinn forbigås ved administrering av væske, halvfast og raskt løselige faste doseringsformer. Således er virkestoffet tilgjengelig for absorpsjon tidligere, og fordi det er ingen garanti for at en fast doseringsform vil frigjøre alt virkestoffet som finnes i den før den transporteres gjennom de absorptive områdene, oppviser formuleringene hvor den aktive substanser er til stede i løst form før den når de absorptive områdene vanligvis større biotilgjengelighet.

[0048] Disse doseringsformene reduserer variabilitet i blodnivåer fordi variasjonen i doseringsform-nedbryting og -løsning *in vivo* i mennesket unngås. Hastigheten av *in vivo* nedbrytning og løsning av en solgt doseringsform av BH4 beregnet for umiddelbar frigjøring i magen avhenger av menneske-til-menneskelig variasjon i pH'en i magesaften - matet og ikke-matet (fastende) - og styrken av omrøringsintensiteten av magesekken som bestemmes av styrken av gastrisk motilitet og gastrisk tømmingshastigheter inn i tynntarmen. Fordi væske, halvfast, pastill/drops og raskt oppløselige faste doseringsformer ikke behøver å bli utsatt for nedbrytning og løsning, er deres blod nivåer mindre variable enn når BH4 gis som umiddelbart frigjørende faste doseringsformer (tabletter og kapsler).

[0049] I en annen eksempelvis utførelsesform involverer slike anvendelser administrering av BH4 i en fast doseringsform inkludert, men ikke begrenset til, tabletter, kapsler, drops, pastiller, pulver og granulater, eller halvfast form, inkludert, men ikke begrenset til, forklistret oralgele, som tygges eller svelges uten løsning i en væske, inkludert men ikke begrenset til, vann, appelsinjuice og eplejuice, før svelging.

[0050] I en annen utførelsesform involverer slike anvendelser administrering av BH4, enten svelget som en fast eller halvfast doseringsform, eller løst i en væske, med mat, for eksempel en fettrik matvare eller et fettrik- og/eller høykalori-måltid. Oppfinnelsen overveier videre at BH4, enten svelget eller løst, gis på et bestemt tidspunkt, inkludert men ikke begrenset til morgenen, dag, kveld, samme tidspunkt på dagen, med mat, for eksempel en fettrik matvare eller et fettrik og/eller høykalori-måltid, en eller flere ganger om dagen. I en eksempelvis utførelsesform inntas BH4 én gang daglig som en fast doseringsform like etter måltider. I en foretrukket utførelsesform er den faste doseringsform en formulert tablett eller kapsel. I mer eksempelvis utførelsesformer inntas BH4 innen omtrent 0-60 minutter, omtrent 0-30, eller 5-20 minutter etter inntak av et måltid. Uansett om det er inntatt som en fast doseringsform, flytende doseringsform eller som en løst løsning, er *in vivo* eksponeringen (eller biotilgjengeligheten) av BH4 høyere når det inntas like etter måltider sammenlignet med fastende kontroller.

[0051] BH4 og maten kan bli inntatt på omtrent samme tid, eller BH4 kan svelges etter maten. Tidsrommet mellom inntak av mat, f. eks. en fettrik matvare eller et fettrik og/eller høykalori-måltid og inntak av BH4 enten svelget eller løst kan være minst 5 minutter. BH4 kan administreres 60 minutter, 30 minutter, 25 minutter, 20 minutter, 15 minutter, 10 minutter, eller 5 minutter etter inntak av et måltid.

[0052] I en annen utførelsesform for noen pasienter, f.eks. voksne, innebærer anvendelsen av oppfinnelsen administrering av en intakt tablett fremfor å løse tablett i en væske, for å forbedre biotilgjengelighet.

[0053] Administrering av BH4 ifølge oppfinnelsen resulterer i gjennomsnittlige plasma-konsentrasjoner og/eller hastighet av gastrointestinal absorpsjon og/eller middelverdier for Cmax og/eller AUC(0-t) og/eller AUC (inf) som overstiger verdiene når BH4 er administrert under fastende forhold.

[0054] Administrering av en løst tablett i enten vann eller appelsinjuice eller en intakt tablett etter et fettrikt/høykalori-måltid resulterte i en økning i Cmax og AUC som varierte fra omtrent 30 % (intakt tablett) til 80 % (vann). Administrering av BH4 som en intakt tablett etter et fettrikt og høykalori-måltid resulterte i en tilnærmet 30 % økning i omfanget av absorpsjon i forhold til administrering uten mat. Administrering av BH4 som en intakt tablett resulterte i en tilnærmet 20 % økning i omfanget av absorpsjon i forhold til administrering av løste tabletter.

[0055] "Gjennomsnittlig plasmakonsentrasjon" betyr gjennomsnitt av målinger av konsentrasjon i en serie av plasmaprøvene.

[0056] "Cmax" betyr maksimal observert plasmakonsentrasjon.

[0057] "AUC" betyr arealet under plasmakonsentrasjon-tidskurven.

[0058] "AUC_{0-t}" betyr arealet under plasmakonsentrasjon-tidskurven fra tid 0 til tidspunktet for den siste målbare konsentrasjon.

[0059] "AUC_(inf)" betyr det beregnede arealet under plasmakonsentrasjon-tidskurven fra tid 0 til uendelig.

[0060] "Hastigheten av gastrointestinale absorpsjon" av BH4 beregnes fra området under plasma-total-biopterin-konsentrasjonsøkning(ΔCp)-tidskurven (ΔAUC) etter administrasjon av BH4 ved hjelp av følgende formel:

$$\text{Absorpsjonshastighet (\%)} = (\Delta\text{AUC etter p.o. dose} / \Delta\text{AUC etter i.v. dose}) \times (\text{i.v. dose} / \text{p.o. dose} \times 100)$$

[0061] Fortrinnsvis anvendes minst 99,5 % ren 6R-BH4. Ethvert salt, inkludert dihydroklorid-saltet, og enhver krystallinsk form av BH4 kan anvendes ifølge fremgangsmåtene og sammen-setningene ifølge oppfinnelsen. En rekke salter og krystallinske former er beskrevet i US patent publikasjon nr. 2006/0040946, og/eller den stabile faststoff formulering beskrevet i Int. Publikasjon nr. WO 06/55511. De forskjellige krystallinske formene kan hensiktsmessig formes til en tablett, pulver eller andre faste form for oral administrering.

[0062] En fremgangsmåte for å stabilisere BH4 ved å redusere intestinal pH ved anvendelse av protonbytter polymere beskrives her. BH4 administreres oralt daglig som en fast eller flytende doserings-form innbefattende inaktive ingredienser som øker stabiliteten av BH4 utover magesekken ved å senke pH i tarmen, og dermed bevare BH4 fra å bli raskt oksidert. Fordi BH4 er mer stabil i sure medier enn i basiske medier inngår forsurende eksipienser/inaktive

ingredienser i faste doseringsform (tabletter, kapsler, osv.) formuleringer av BH4 for å senke pH av tarmsaften og derved forbedre den kjemiske stabilitet. Det større området eller vinduet i gastrointestinal-tractus (GIT) som blir tilgjengelig for absorpsjon optimaliserer ensartetheten i absorpsjon ved å utvide det gjeldende begrensede vinduet av absorpsjon som antas å være

5 begrenset til magen og tolvfingertarmen til tarmen. Slike doseringsformer innbefatter, men er ikke begrenset til, brusetabletter, pulvere og granuler (som skal resuspenderes i væske før administrering) og surgjørende materialer. I motsetning til små-molekyl syrer, forblir voluminøse polymersyrer i GIT lengre og blir ikke absorbert i GIT, men donere sine protoner til væskene i GIT for å senke pH i miljøet. Eksempler på hjelpestoffer/inaktive ingredienser som

10 utgjør formuleringen er lav-molekylære karboksylsyre slik som maleinsyre, fumarsyre og sitronsyre eller uorganiske små-molekyler slik fosforsyre, eddiksyre og deres saltformer. Andre eksempler er farmasøytisk akseptable syrer slik som polymere karboksylsyre-klasser inkludert polymetakrylsyre, karbomerer, polykarbofil, Eudragit, syreformer av kryssbundet karmelose og glykolsyre stivelse, etc. Formuleringene inneholder også ytterligere hjelpestoffer

15 til å forbedre stabiliteten, for eksempel antioksidanter (f.eks. tioler slik cystein, N-acetyl cystein, osv; askorbinsyre; metionin, osv.) og andre hjelpestoffer kjent i handelen for å aktivere produserbarhet og forbedre kvaliteten og ytelsesegenskaper av formuleringen.

[0063] En fremgangsmåte for å øke oppholdstiden for BH4 i tarmen, inkluderer men ikke begrenset til, å redusere tarmmotiliteten ved anvendelse av et middel som er i stand til å

20 redusere tarmmotilitet av BH4, for eksempel en fettsyre og/eller en glyserol-fettsyreester. Fettsyrer kan innbefatte oljesyre, stearinsyre, arakidinsyre, palmitinsyre, arakidonsyre, linolsyre, linolensyre, erusidinsyre, myristinsyre, laurinsyre, myristolinsyre, og palmitolinsyre. Også overveid for å øke oppholdstid av BH4 i tarmen er å forårsake ventrikkelretensjon ved anvendelse av alginsyre og bioadhesjons ved anvendelse av polykarbofil. I en utførelsesform

25 administrerers doseringsformer av BH4 som orale oppdriftsformuleringer som flyter og frigjør BH4 i en definert måte i magesaften og beholdes lenger i magen fordi de er mer resistente mot tømningen av magesekken enn formuleringer som er ikke-flytende eller som løses raskt i magen. Denne utformingstilnærmingen er basert på gastroretensjon av doseringsformen ved anvendelse av en gass-utviklende eksipiens inne i doseringsformen, lav-tetthets eksipienser som

30 gjør doseringsformen flytende i GIT væsker eller en kombinasjon av en gass og lavtetthets materialer i en doseringsform for å aktivere flyteevenen av doseringsformen i væskeinnholdet i GIT. Langvarig retensjon og frigjøring av doseringsformen i magemiljøet hvor BH4 er mer stabil i de sure væskene vil forbedre både oppholdstiden av doseringsformen i magen og stabiliteten av BH4 og dermed gjøre BH4 tilgjengelig for absorpsjon i magesekken og tolv-

35 fingertarmen i en lengre periode enn standard tablett- og kapsel-doseringsformer. Formuleringer av BH4 vil omfatte en eller flere antioksidanter, eksipienser kjent innen feltet, for å muliggjøre produksjon og desintegrasjon/løsning av den faste doseringsformen og ytterligere eksipienser som genererer en gass eller blanding av gasser (f.eks. karbondioksid) ved kontakt av formuleringen med vannholdige medier og eller GIT væsker. Vannløselige antioksidanter

er foretrukket, for eksempel, askorbinsyre, metionin og tioler (cystein, N-acetyl cystein og glutation) eller antioksidanter som er konvertert til en løselig antioksidant i GIT, f.eks. askorbylpalmitat som omdannes til askorbinsyre i GIT. Eksipienser tilsatt til formuleringen inkluderer karbonater og bikarbonater som reagerer direkte med BH4 og danner karbondioksid og små- og polymere syrer beskrevet tidligere, for å reagere med karbonater og bikarbonater for å produsere ytterligere karbondioksid etter behov.

[0064] Doseringsformer av BH4 kan administreres som binder seg i en lengre tid til slimhinnene i GIT (dvs. bioadhesiv formulering), fortrinnsvis i, men på ingen måte begrenset til magesekken, hvor på grunn av surheten av de gastriske væskene, BH4 er mer stabil enn i tarmen. BH4 frigis på en kontrollert måte fra den bioadhesive doseringsformen. Den faste doseringsformen er utformet for å inneholde BH4, en eller flere antioksidanter, eksipienser kjent innen feltet for å muliggjøre fremstilling av kvalitetsdoseringsformer og kontrollere desintegrasjon/løsning av doseringsformen, og en bioadhesivt additiv slik som polykarbofil i sin frie syreform eller som en saltform. Andre polymere syrer slik som polymetakrylsyre karbomerer og cellulosederivater, f.eks. HPMC, HPC, etc. kan kombineres med eller erstatte polykarbofil. Antioksidantene er fortrinnsvis løselig, for eksempel, askorbinsyre, metionin, cystein, N-acetyl cystein og glutation eller kan bli konvertert til en løselig antioksidant slik som askorbinsyre i GIT, f.eks. askorbylpalmitat. I en utførelsesform er komponentene i formuleringen blandet sammen og fremstilt som en fast doseringsform, f.eks. tabletter eller kapsler. Den faste doseringsform kan være enterisk belagt for å levere BH4 forbi magesekken og inn i tynntarmen eller ikke-enterisk belagt utformet for å frigjøre BH4 i magesekken. I en annen utførelsesform kan komponentene i den faste doseringsformen deles inn i ulike deler og de ulike delene blandes separat før de blir behandlet for å danne flerlagsdoseringsformer. Den flerlagede doseringsformen kan inneholde bioadhesive og noen eksipienser i det ytterste laget av en tablett, viklet rundt andre lag som inneholder BH4 (dvs. aktiv region inne i et bioadhesivt hylster) eller som en wrap-around sylindrisk plugg fylt i en kapsel, karakterisert ved en eller flere andre lag er samlet under eller innenfor den bioadhesiv hylsen. Alternativt kan de bioadhesive og andre lagene i tablett eller kapselpluggene legges lagvis i en parallell to- eller flerlagskonfigurasjon. Disse utformingene tillater bioadhesivet å samhandle med GI membran eller GI membranslim for å feste doseringsformen til membranen og dermed redusere sin pasasje gjennom gastrointestinal tractus, og dermed øke oppholdstiden. Slike doseringsformer kan også være enterisk belagt. Ennå en annen utførelsesform av oppfinnelsen er å anvende polymere, inaktive ingredienser (eksipienser) med funksjonelle grupper som bindes til GIT-slim for å forsinke transitt av doseringsformen gjennom GIT. Doseringsformer av BH4 er formulert med tiolerte polymere eksipienser (polymer-SH) slik som polykarbofil-cystein, polymetakrylsyre-cystein, karboksymetylcellulose-cystein, kitosan derivater-cystein osv.. Disse tiolerte polymerene gir både bioadhesive og antioksidante egenskaper til BH4 og dermed forbedres absorpsjonen vesentlig. Andre eksipienser som inngår i disse formuleringene er antioksidanter, og ytelses- og produksjons-hjelpende eksipienser.

[0065] I nok en annen utførelsesform blir orale doseringsformer inneholdende inaktive eksipienser eller aktive ingredienser bruket til å bremse gastrisk motilitet. Å redusere transitt av BH4 doseringsform gjennom GIT tarmkanalen vil øke oppholdstiden av molekylet og således muliggjøre at en større brøkdel av den administrerte dosen blir absorbert. Vanligvis anvendes eksipienser som ansees som trygge (GRAS) eksipienser i orale formuleringer for å forsinke gastrisk tømming og/eller forsinke intestinal motilitet og de omfatter fortrinnsvis fettstoffer som fettsyrer, glycerider av fettsyrer, samt derivater av fettsyrer og glycerider eksempel Cremophor™ (polyoksykyl-castorolje-derivater), osv. Aktive eksipienser inkluderer agens som senker tarmmotilitet slik som generelle eller selektive (M_3) antimuskarine eller antikolinerge midler.

[0066] En fremgangsmåte for å modifisere frigjøring av BH4 ved anvendelse av en forlenget frigjøringsformulering slik som HPMC, karbomer, etc. er også omtalt her. Dette konseptet omfatter levering av BH4 doseringsformer til GI tractus ved å endre eller endre frigjøring av BH4 fra umiddelbar-frigjøring til langsom, forlenget, kontrollert og eller tidsbestemt frigjøring. Langsom, forlenget og kontrollert frigjøring oppnås ved hjelp eksipienser kjent innen faget og BH4 er beskyttet innenfor avgivelsessystemet fra kjemisk nedbrytning ved tilstedeværelsen av stabilitetsforsterker slike som antioksidanter. Dette kan maksimere bio-tilgjengelighet ettersom BH4 stabiliseres innenfor formuleringen og i miljøet rundt formuleringen slik at det aktive molekylet absorberes intakt over i den systemiske sirkulasjonen mens formuleringen transporteres hele lengden av GIT. Denne tilnærmingen gir et større vindu av GIT for absorpsjon og gjør dette ved å hindre nedbrytning av BH4 i det høyere pH miljøet slik at BH4 er tilgjengelig for å bli absorbert. Antioksidanter vil bli inkludert i formuleringen for å beskytte stoffet fra nedbrytning i intestinal væsker på grunn av nær nøytral pH av intestinal væsker. Langsom, forlenget og kontrollert levering vil også levere BH4 til områder i GIT med lavt oksygeninnivå. Tidsstyrt frigjøring oppnås ved bruk eksipienser kjent innen faget slik som pH-følsomme polymerer som løses bare når pH når en verdi hvor polymeren er løselig.

[0067] I en annen utførelsesform overveier oppfinnelsen enterisk belegging av BH4 doseringsformen for å fastslå hvorvidt å inkludere sure eksipienser i en formulering av BH4 faktisk øker absorpsjon av BH4 ved å senke pH i tarmen og dermed stabilisere BH4 i tarmen for å være tilgjengelig for absorpsjon. Dermed vil enterisk belegg brukes til å holde eksipiensene og legemidlene sammen på stedet hvor eksipiensene er forventet å beskytte BH4. Hvis BH4 doseringsformen ble tillatt å gå i løsning i magen, så vil kanskje ikke de sure eksipiensene tømmes sammen inn i magen, og vil kanskje ikke gi beskyttelse.

[0068] Enterisk belegg beskytter forbindelser mottakelige for syrekatalysert nedbrytning i magen fra å bli degradert av syren i magen. Enteriske beleggmaterialer hindre tabletten eller kapselen fra å friggi den aktive forbindelse i magen fordi enteriske beleggmaterialer er uløselige i syre. Så snart den enterisk belagte doseringsform når tarmen der pH verdien varierer fra pH 5-8 blir materialene løselige og frigjør den aktive substans i tarmen. I motsetning er

vedvarende frigjøringsformuleringer utformet for å frigjøre medikamenter over en så lang lengde/område av GIT som mulig. Å belegge et vedvarende frigjøringsformulering for frigjøring rett forbi magesekken kan være nødvendig bare dersom medikamentene inneholdt i den er syre-labil.

5 **[0069]** BH4 er svært følsom for oksidasjon i vandig løsning og i fysiologiske, vandige pH-løsninger (Davis, et al., Eur. J. Biochem. 173, 345-351 (1988); Kirsch, et al, J. Biol. Chem. 278, 24481-24490 (2003)). De fleste påvisninger av BH4 stabilitet er utført i nøytral til svakt alkalisk pH 7,4 løsninger for å etterligne den sannsynlige stabilitetsoppførselen av BH4 ved fysiologisk plasma pH-tilstand. Selv om europeisk patentsøknad nr. 1 757 293 A beskriver

10 væske- eller sirupformuleringer består slike formuleringer av fast-fase pulver blandinger eller granulasjoner som krever rekonstituering med vann før oralt inntak. Foreliggende aspekt av oppfinnelse overveier flytende formuleringer ikke begrenset til pulvere eller granulasjoner for konstituering. Oppfinnelsen gjelder også sammensatte flytende formuleringer som kan holde seg stabile ved omgivelsestemperatur i en tilstrekkelig tidsperiode til å tillate bearbeidelse i

15 ”fill/finish” fasiliteteter for sterile produkter for fylling på ampuller, flasker eller hetteglass som et flytende produkt eller fylles i hetteglass som skal frysetørkes til lyofiliserte produkter. **[0070]** De flytende og lyofiliserte formuleringene for rekonstituering kan også tilføres via nasal, oftalmisk og ørekanalen for terapeutiske effekter. Formuleringen av et lyofilisert produkt krever forutgående oppløsning av BH4 i en væske, fortrinnsvis vandig, og

20 behandlingen av det flytende produkt i en steril fasilitet (dvs. blanding, sterilfiltrering og fylling av sterilfiltrert væske på hetteglass før lastingen av de fylte ampullene i en frysetørker for lyofilisering). Opprettholdelse av stabiliteten av løst BH4 under steril behandling og forebygging av dets nedbryting er sentrale forutsetninger for produksjon av frysetørret produkt som tilfredsstiller spesifikkasjon for urenheter for det ferdige fylte produktet. Derfor

25 inneholder sammensetningen av det lyofiliserte produktet hensiktsmessige stabilisatorer som minimerer eller unngår BH4 nedbryting under ferdig fyllingsprosessen. Formuleringene beskrevet her ville stabilisere BH4 løsninger under steril ”fill/finish” produksjon, en prosess som tar minst seks timer, og ville også tilveiebringe kommersielt stabilt produkt. **[0071]** Formuleringene inkluderer BH4, fortrinnsvis i konsentrasjon i et område på 0,1 mg/ml

30 til 10 mg/ml. Grunnet den høye løselighet av BH4 kan formuleringer med konsentrasjoner opp til for eksempel ca. 100 mg/ml også fremstilles. Den alminnelige relative kompositoriske sammensetningen og metoder beskrevet her er egnet for å lage svært konsentrert løsninger. **[0072]** Flytende formuleringer av BH4 formuleres fortrinnsvis i pH 1-8 bufferløsninger, fortrinnsvis i pH 2-7 bufferløsninger. De pH bufferene som er valgt er bufferforbindelser som

35 kan gi betydelig bufferkapasitet ved en bestemt ønsket pH, som bedømt ved hvor nær bufferens dissosiasjonskonstant eller konstanter er til den ønskede pH i den flytende formulering.

Således kan enhver bufferforbindelse anvendes så lenge som én eller flere av forbindelsens dissosiasjonskonstanter er nær den ønskede pH av formuleringen. Eksempler på buffere som kan anvendes i pH 1-8 serien omfatter ulike syrer/baser og deres respektive konjugerte syrer/baser eller saltformer, inkludert men ikke begrenset til: saltsyre (pH 1-2), maleinsyre (pH 1 - 3), fosforsyre (pH 1-3), sitronsyre (pH 3 - 6), eddiksyre (pH 4,7 + 1,0), dinatriumhydrogenfosfat (pH 6 - 8), trometamin (TRIS, 8,3 pH + 1.0), og lignende.

[0073] Eksempel områder for BH4 flytende formuleringer er gitt i tabell 1 og 2. Formulerte eller blandede løsninger er eventuelt oversprøytet med en inert gass (f.eks. argon eller nitrogen) eller karbondioksid i sammenblandingstanken, og primærbeholdere er fortrinnsvis forsegle i et teppe av inert gass eller karbondioksid for å fjerne oksygen fra beholderens frivolum. Formuleringen kan skaleres opp til ethvert volum ved å multiplisere komponentmengdene med en passende oppskaleringsfaktor.

Tabell 1 Generelle eksempler på preparat området for en lav pH (f.eks. pH 4,0) formulering

Komponent	Mengde (mg)	% Vekt/Volum	Funksjon
BH4	0,10 - 100	0,01 – 10,00	Aktiv substans
L-Cystein	0,00 – 50,00	0,00 – 5,00	Antioksidant
Askorbinsyre	0,00 – 500,00	0,00 – 50,00	Antioksidant
Natrium-metabisulfitt	0,00 – 300,00	0,00 – 30,00	Antioksidant
Sitronsyre	0,26 – 19,87	0,03 – 1,99	Bufferagens
Natriumsitrat, dihydrat	2,57 – 192,75	0,26 – 19,27	Bufferagens
Vann til injeksjon	1,00 ml	1,00 ml	Fortynningsmiddel

Tabell 2 Generelle eksempler på preparat området for en nøytral pH (f.eks. pH 7,0) formulering

Komponent	Mengde (mg)	% Vekt/Volum	Funksjon
BH4	0,1-00	0,01-00	Aktiv substans
L-Cystein	0,00-50,00	0,00-5,00	Antioksidant
Askorbinsyre	0,00-500,00	0,00-50,00	Antioksidant
Natrium-metabisulfitt	0,00-300,00	0,00-30,00	Antioksidant
Natrium-monobasisk-fosfat, monohydrat	0,50–11,02	0,05–1,02	Bufferagens
Natrium-dibasisk-fosfat	0,44–17,80	0,04-1,78	Bufferagens
Vann til injeksjon	1,00 ml	1,00 ml	Fortynningsmiddel

[0074] Antioksidanter benyttet for flytende formuleringer er fortrinnsvis valgt fra en eller flere av tiolbaserte (f.eks. L-cystein), askorbinsyre og sulfittbaserte (f.eks. natrium-metabisulfitt) forbindelser. Løsninger er fortrinnsvis oversprøytet med inerte gasser eller karbondioksid for å fordrive oksygen fra BH4 løsningene og deretter hermetisk forsegle i ampuller eller hermetisk lukkede hetteglass og flasker med metalliske drikkevarer øl-type kork i et teppe av inerte gasser (f.eks. argon, nitrogen) eller ikke-inert gass, så som karbondioksid, for å forhindre de oversprøytete gassene i beholderens frivolum fra å rømmer. Orale flytende formuleringer inneholder fortrinnsvis i tillegg søtstoffer og smaksstoffer for å bedre smaken av formuleringene.

[0075] I en utførelsesform, som en flytende doseringsform, stabiliseres BH4 av antioksidanter og/eller ved oversprøytning med ikke-oksiderende, fortrinnsvis steriliserte gasser som for eksempel inerte gasser (f.eks. nitrogen, argon, helium, etc.) og/eller en ikke-inert gass, så som karbondioksid for å fjerne molekylært oksygen fra formuleringen. Produktet er fortrinnsvis tappet under et teppe av inerte gasser for å minimere eller hindre molekylært oksygen fra å gjennompløses i formuleringen. Væsken fylles i en beholder (f.eks. medisinglass, ampuller, etc.) og er hermetisk forsegle for å forhindre oksygen kommer inn i beholderen. I en annen utførelsesform, som en steril fast doseringsform for parenteral administrasjon, er en løsning av BH4 lyofilisert og rekonstituert i klinikken før administrering. I nok en annen utførelsesform er sterilt pulver legemiddelsubstansen av BH4 direkte pakket i sterile beholdere (f.eks. hetteglass, poser, flasker eller ampuller) i et sterilt tørt pulver tappeanlegget. Således er et annet aspekt av oppfinnelsen en tørr pulver formulering av tetrahydrobiopterin (BH4) eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav for konstitusjon i en vandig løsning, inkludert en tørr pulverblanding av BH4 eller farmasøytisk akseptabelt salt derav, en antioksidant, og en pH-buffer.

Orale flytende formuleringspreparater

[0076] Orale flytende formuleringer omfatter i tillegg til komponentene anvendt i de generelle flytende og intravenøse formuleringer, søtstoffer og smaksmidler. Sötstoffer og smaker blir tilsatt i mengder tilstrekkelig til å gi akseptabel søthet og smak. Orale flytende formuleringer inneholder en eller flere stabilisatorer. Eventuelt inneholder de antimikrobielle konserveringsmidler. De er fortrinnsvis bufret ved lav pH f.eks. pH 1-4, og buffermidlene er valgt for å passe smaksmiddelet og dermed forsterke de organoleptiske egenskapene til orale flytende formulering. Eksempler på foretrukne buffere (syre og konjugerte baser) er: sitronsyre, vinsyre, epleysyre i kombinasjon med deres konjugerte baser eller saltformer.

[0077] Eksempler på søtstoffer er sukker (f.eks. sukrose, glukose, sorbitol, mannitol, fruktose, osv.), intense ikke-sukker søtstoffer (f.eks. aspartam, acesulfam K, cyclamat, sakkarin, sukralose, glycyrrhizin, alitam, neotam, neohesperidin DC, taumatin, monellin og lignende).

Primære Beholder Emballasje til BH4 flytende formuleringer

[0078] Primæremballasjebeholdere for BH4 flytende formuleringer er fortrinnsvis ugjennomtrengelig for oksygen, karbondioksid, nitrogen og inerte gasser. Etter fylling av oversprøytet flytende formuleringer av BH4 inn i primærbeholderen, fortrinnsvis under et teppe av nitrogen, blir beholderne fortrinnsvis hermetisk forseglest for å holde oversprøytingsgassen i væsken og beholderens frivolum og hindre tap av oversprøytingsgass og inntrengning av oksygen inn i beholderen.

[0079] De foretrukne primærbeholderne er hermetisk forseglede ampuller samt flasker og ampuller forseglest hermetisk med metallisk kork slik som de som anvendes ved forsegling av brus og øl drikkeflasker. Under bruk blir ampullene skåret åpne og brukt i løpet av noen få timer, f.eks. omtrent 12 timer. Ampuller kan brukes for intravenøs og sterile produkter for injeksjoner. Sterile injiserbare væsker og lyofiliserte produkter kan også være pakket i gummiprop- forseglede ampuller som er sikret med krympet aluminiumshette. Antioksidanter i preparatene beskytter flytende og lyofilisert produkter fra det umerkkelige sakte tapet av oversprøytet gass eller oksygen-inntrengning inn i hetteglasset gjennom holdbarheten av produktet.

[0080] BH4 flytende formuleringer fylt i flasker eller ampuller for oral bruk er fortrinnsvis hermetisk sikret med drikkevare metallisk kork eller en gummiprop sikret med krympet aluminiumsforsegling. Kragene på flaskene eller hettekorkene kan ha riller for å ta imot en skrukork. Når den hermetiske forseglingen er fjernet, erstattes den med en skrukork med eller uten en dråpeteller. Tilstedeværelsen av antioksidanter i formuleringen muliggjør at den skrukorkede formuleringen er stabil for bruk i for eksempel minst to uker etter at den hermetisk forsegling er brutt.

I. Syntese av tetrahydrobiopterin

[0081] En rekke metoder er kjent innen faget for syntese av tetrahydrobiopteriner, forstadier, derivater og analoger. U.S. patent nr. 5.698.408, 2.601.215, 3.505.329, 4.540.783, 4.550.109, 4.587.340, 4.595.752, 4.649.197, 4.665.182, 4.701.455, 4.713.454, 4.937.342, 5.037.981, 5.198.547, 5.350.851, 5.401.844, 5.698.408, kanadiske søknad 2420374 CA, europeiske søknader nr. EP 079 574, EP 191 335 og Suntory's japanske patentpublikasjoner JP 4-082888, JP 59-021685 og JP 9-157270, så vel som Sugimoto og Matsuura, Bull. Chem. Soc. Japan, 48 (12): 3767-3768 (1975), Sugimoto og Matsuura. Bull. Chem. Soc. 52 (1) :181-183 (1979), Matsuura et al., Chem.Lett. Japan, 735-738 (1984), Matsuura et al. Heterocycles, vol. 23, nr. 12, 3115 til 3120, 1985 og Whiteley et al. Anal Biochem. 137 (2) :394-6 (1984) hver beskriver fremgangsmåter for fremstilling dihydrobiopteriner, BH4 og derivater derav som kan være brukt som preparater for den foreliggende oppfinnelse.

[0082] Int'l publikasjon nr. WO2005049614, US patent nr. 4.540.783, japansk patent nr. 59-021685, Schircks et al. *Helv. Chim. Acta*, 60: 211 (1977), Sugimoto et al, *Bull.Chem. Soc. Jp*, 52 (1): 181 (1979), Sugimoto et al, *Bull. Chem. Soc. Jp*, 48 (12): 3767 (1975), Visontini et al., *Helv. Chim. Acta*, 52:1225 (1969), og Matsuura et al., *Chem. Lett.*, s. 735 (1984), beskriver fremgangsmåter for å syntetisere BH4.

II. Krystallinske former av 6R-tetrahydrobiopterin-hydrokloridsalt

[0083] (6R)-L-erythro-tetrahydrobiopterin-dihydroklorid eksisterer i ulike krystallinske former, inkludert Polymorf former og solvater, hvorav noen er mer stabile enn andre.

Krystall Polymorf former av (6R) L-tetrahydrobiopterin-dihydrokloridsaltet

Polymorf Form B

[0084] Krystall polymorfen som har blitt funnet å være den mest stabile er referert til her som "form B" eller alternativt som "polymorf B". Resultater oppnådd ved undersøkelse og utvikling av (6R)-L-erythro-tetrahydrobiopterin-dihydroklorid utvikling avdekket at det er flere kjente krystallinske faststoffer som er fremstillet, men ingen har anerkjent polymorfisme og dens effekt på stabiliteten av BH4 krystallene.

[0085] Polymorf B er en svakt hygroskopisk anhydrat med den høyest termodynamiske stabiliteten over omtrent 20 °C. Videre kan form B lett behandles og håndteres på grunn av sin termiske stabilitet, muligheten for fremstilling under målrettede forhold, dens egnede morfologi og partikkelstørrelse. Smeltepunkt er i nærheten av 260 °C ($\Delta H_f > 140$ J/g), men intet klart smeltepunkt kan påvises som følge av dekomponering før og under smelting. Disse fremragende egenskapene gjør polymorf form B spesielt anvendbar for farmasøytiske applikasjoner, som er fremstillet ved hevede temperaturer. Polymorf B kan oppnås som et fint pulver med en partikkelstørrelse som kan variere fra 0,2 μm til 500 μm .

[0086] Form B oppviser et røntgenpulverdiffraksjonsmønster, uttrykt i d-verdier (Å) ved: 8,7 (vs), 6,9 (w), 5,90 (vw), 5,63 (m), 5,07 (m), 4,76 (m) , 4,40 (m), 4,15 (w), 4,00 (s), 3,95 (m), 3,52 (m), 3,44 (w), 3,32 (m), 3,23 (s), 3,17 (w), 3,11 (vs) , 3,06 (w), 2,99 (w), 2,96 (w), 2,94 (m), 2,87 (w), 2,84 (s), 2,82 (m), 2,69 (w), 2,59 (w), 2,44 (w) . Figur 1 er et diagram av det karakteristiske røntgendiffraksjonsmønsteret vist ved formen B av (6R)-L-erythro-tetrahydrobiopterin-dihydroklorid.

[0087] Som anvendt her betyr følgende forkortelsene i parentes: (vs) = svært sterk intensitet, (s) = sterk intensitet, (m) = middels intensitet, (w) = svak intensitet, og (vw) = svært svak intensitet. Et karakteristisk røntgenpulverdiffraksjonsmønster er vist i Figur 1.

[0088] Det har blitt funnet at andre polymorfer av BH4 har en tilfredsstillende kjemisk og fysisk stabilitet for en sikker håndtering under fremstilling og formulering samt gi en høy

lagringsstabilitet i sin rene form eller i formuleringer. I tillegg har det blitt funnet at Form B og andre polymorfer av BH4 kan fremstilles i meget store mengder (f.eks. 100 kilo skala) og lagret over en lengre tidsperiode.

[0089] Alle krystallformer (polymorfer, hydrater og solvater), inklusiv av krystallform B, kan anvendes ved fremstilling av den mest stabile polymorf B. Polymorf B kan oppnås ved faselikevekt av suspensjoner av amorfe eller andre former enn Polymorf form B, slik som polymorf A, i egnede polare og ikke-vandige løsningsmidler. Således refererer de farmasøytiske preparater beskrevet her til et preparat av den Polymorf form B av (6R)-L-erytro-tetra-hydrobiopterindihydroklorid.

[0090] Andre former for BH4 kan konverteres til form B ved å dispergere den andre formen av BH4 i et løsningsmiddel ved romtemperatur, røring av suspensjonen ved omgivelsestemperaturer i en tidsperiode tilstrekkelig til å produsere den Polymorf form B, deretter isolere krystallinsk form B og fjerne løsningsmidlet fra den isolerte form B. Omgivelsestemperatur som anvendt her, bety temperaturer i et område fra 0 °C til 60 °C, fortrinnsvis 15 °C til 40 °C. Den anvendte temperaturen kan bli endret i løpet av behandling og røring ved å redusere temperaturen trinnvis eller kontinuerlig. Egnede løsningsmidler for omdanning av andre former til form B inkluderer, men er ikke begrenset til, metanol, etanol, isopropanol, andre C3-og C4-alkoholer, eddiksyre, acetonitril, tetrahydrofuran, metyl-t-butyleter, 1,4 - dioksan, etylacetat, isopropyl-acetat, andre C3-C6-acetater, metyletylketon og andre metyl-C3-C5-alkyl-ketoner. Tiden til å fullføre faselikevekt kan være opp til 30 timer og fortrinnsvis opptil 20 timer eller mindre enn 20 timer.

[0091] Polymorf B kan også oppnås ved krystallisasjon fra løsningsmiddelblandinger inneholdende opp til omtrent 5 % vann, spesielt fra blandinger av etanol, eddiksyre og vann. Det har blitt funnet at den Polymorf form B av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid kan fremstilles ved oppløsning, eventuelt ved forhøyede temperaturer, fortrinnsvis av en fast lavere energiform enn form B eller fra form B av (6R)-L -erytro-tetrahydrobiopterin-dihydroklorid i en løsningsmiddelblanding omfattende etanol, eddiksyre og vann, tilsetning av kim til løsningen, kjøling av den oppnådde suspensjon og isolering av de dannede krystallene.

Oppløsning kan utføres ved romtemperatur eller opp til 70 °C, fortrinnsvis opp til 50 °C. Det kan brukes den endelige løsningsmiddelblandingen for oppløsning eller utgangsmaterialet kan først løses opp i vann, og de andre løsningsmidlene kan så legges til begge eller det ene etter det andre løsningsmidlet. Sammensetningen av løsningsmiddelblandingen kan omfatte et volumforhold vann:eddiksyre:tetrahydrofuran på 1:3:2 til 1:9:4 og fortrinnsvis 1:5:4.

Løsningen blir fortrinnsvis omrørt. Kjøling kan bety temperaturer ned til -40 °C til 0 °C, fortrinnsvis ned til 10 °C til 30 °C. Egnede kim er polymorf form B fra en annen batch eller krystaller med en lignende eller identisk morfologi. Etter isolering, kan den krystallinske form B vaskes med et ikke-løsningsmiddel slik som aceton eller tetrahydrofuran og tørkes på vanlig måte.

[0092] Polymorf B kan også oppnås ved krystallisasjon fra vandige løsninger ved tilsetning av ikke-løsningsmidler slik som metanol, etanol og eddiksyre. Krystallisasjonen og isolasjonsprosedyren kan med fordel utføres ved romtemperatur uten avkjøling av oppløsningen. Denne prosessen er derfor godt egnet til å utføres i industriell skala.

[0093] I en utførelsesform av sammensetningsmetodene og fremgangsmåter beskrevet her, fremstilles et preparat som inkluderer Polymorf form B av (6R)-L-erythro-tetrahydrobiopterindihydroklorid ved løsning av en fast form forskjellig fra form B eller av form B av (6R)-L-erythro-tetrahydrobiopterindihydroklorid i vann ved omgivelsestemperatur, og tilsetning av et ikke-løsningsmiddel i en mengde tilstrekkelig til å danne en suspensjon, eventuelt omrøring av suspensjonen i en viss tid, og deretter isolering av de dannede krystaller. Sammensetningen er ytterligere modifisert til et farmasøytisk preparat som beskrevet nedenfor.

[0094] Konsentrasjonen av (6R)-L-erythro-tetrahydrobiopterindihydroklorid i den vandige løsningen kan være 10-80 vektprosent, mer foretrukket 20-60 vektprosent, ved referanse til løsningen. Foretrukne ikke-løsningsmidler (dvs. løsningsmidler nyttige for fremstilling av suspensjoner av BH4) er metanol, etanol og eddiksyre. Ikke-løsningsmidlet kan tilsettes til den vandige løsning. Mer foretrukket tilsettes den vandige løsningen til ikke-løsningsmidlet. Omrøringstiden etter dannelse av suspensjonen kan være opptil 30 timer, og fortrinnsvis opp til 20 timer eller mindre enn 20 timer. Isolering ved filtrering og tørking blir gjennomført på kjent måte som beskrevet ovenfor.

[0095] Polymorf form B er en meget stabil krystallinsk form, som lett kan frafiltreres, tørkes og males til partikkelstørrelser ønsket for farmasøytiske formuleringer. Disse fremragende egenskaper gjør polymorf form B spesielt anvendbar for farmasøytisk anvendelse.

Polymorf Form A

[0096] Det har blitt funnet at en annen krystall polymorf av (6R)-L-erythro-tetrahydrobiopterindihydroklorid er en stabil foretrukket form av BH4 for bruk i et farmasøytisk preparat beskrevet her, som refereres til her som "form A" eller "polymorf A". Polymorf A er svakt hygroskopisk og adsorberer vann til et innhold på omtrent 3 vektprosent, som kontinuerlig frigis mellom 50 °C og 200 °C, ved oppvarming med en hastighet på 10 °C/minutt. Polymorf A er et hygroskopisk anhydrat, som er en metastabil form med hensyn til å form B, men det er stabilt i flere måneder ved omgivelsesbetingelser hvis de oppbevares i en tett lukket beholder. Form A er spesielt egnet som mellomprodukt og utgangsmateriale for å produsere stabile polymorfe former. Polymorf form A kan fremstilles som et fast pulver med ønsket middels partikkel-størrelsesområde som typisk strekker seg fra 1 µm til 500 µm.

[0097] Polymorf A som oppviser et karakteristisk røntgenpulverdiffraksjonsmønster med karakteristiske topper uttrykt i d-verdier (Å) av: 15,5 (vs.), 12,0 (m), 6,7 (m), 6,5 (m), 6,3 (w), 6,1 (w), 5,96 (w), 5,49 (m), 4,89 (m), 3,79 (m), 3,70 (s), 3,48 (m), 3,45 (m), 3,33 (s), 3,26 (s), 3,22 (m), 3,18 (m), 3,08 (m), 3,02 (w), 2,95 (w), 2,87 (m), 2,79 (w), 2,70 (w). Figur 2 er et

diagram av det karakteristiske røntgendiffraksjonsmønsteret vist ved formen A av (6R)-L-erythro-tetrahydrobiopterindihydroklorid.

[0098] Polymorf A viser et karakteristisk Ramanspekter topper, uttrykt i bølgenummer (cm-1) på: 2934 (w), 2880 (w), 1692 (s), 1683 (m), 1577 (w), 1462 (m), 1360 (w), 1237 (w), 1108 (w), 1005 (vw), 881 (vw), 813 (vw), 717 (m), 687 (m), 673 (m), 659 (m), 550 (w), 530 (w), 492 (m), 371 (m), 258 (w), 207 (w), 101 (s), 87 (s) cm-1.

[0099] Polymorf form A kan oppnås ved frysetørrking av eller vannfjerning fra løsninger av (6R)-L-erythro-tetrahydrobiopterindihydroklorid i vann. Polymorf form A av (6R)-L-erythro-tetrahydrobiopterindihydroklorid kan fremstilles ved å løse (6R)-L-erythro-tetrahydrobiopterindihydroklorid ved omgivelsestemperatur i vann, (1) avkjøling av løsningen til lave temperaturer for størkning av løsningen, og fjerning av vann under redusert trykk, eller (2) fjerning av vann fra den vandige løsningen.

[0100] Den krystallinske form A kan isoleres ved filtrering og deretter tørkes for å fordampe absorbert vann fra produktet. Tørkeforhold og fremgangsmåter er kjent og tørking av det isolerte produktet eller vannfjerning i henhold til variant (2) beskrevet her, kan utføres ved anvendelse av forhøyede temperaturer, for eksempel opp til 80 °C, fortrinnsvis i området fra 30 °C til 80 °C, under vakuum eller forhøyede temperaturer og vakuum. Før isolering av et bunnfall erholdt i variant (2), kan suspensjonen omrøres i en viss tid for faselikevekt. Konsentrasjonen av (6R)-L-erythro-tetrahydrobiopterindihydroklorid i den vandige løsning kan være 5 til 40 vektprosent, med henvisning til løsningen.

[0101] En rask avkjøling foretrekkes for å oppnå faste løsninger som utgangsmateriale. Et redusert trykk er anvendt inntil løsningsmidlet er fullstendig fjernet. Frysetørrking er en teknologi velkjent i faget. Tiden for å fullføre fjerning av løsningsmiddel er avhengig av det anvendte vakuumet, som kan være fra 0,01 til 1 mbar, det anvendte løsningsmidlet og frysetemperaturen

[0102] Polymorf form A er stabil ved romtemperatur eller lavere enn romtemperatur under hovedsakelig vannfrie forhold, som er demonstrert med faseekvilibreringstester av suspensjoner i tetrahydrofuran eller tertiær-butylmetyleter omrørt i henholdsvis fem dager og 18 timer under nitrogen ved romtemperatur. Filtrering og lufttørrking ved romtemperatur gir uendret polymorf Form A.

Polymorf Form F

[0103] Det har blitt funnet at en annen krystall polymorf av (6R)-L-erythro-tetrahydrobiopterindihydroklorid er en stabil foretrukket form av BH4 for bruk i et farmasøytisk preparat beskrevet her, som refereres til her som "form F," eller "polymorf F". Polymorf F er svakt hygroskopisk og adsorberer vann til et innhold på omtrent 3 vektprosent, som kontinuerlig frigis mellom 50 °C og 200 °C, ved oppvarming med en hastighet på 10 °C/minutt. Polymorf F er en metastabil form, og et hygroskopisk anhydrat, som er mer stabil enn form A ved lavere

omgivelsestemperatur og mindre stabile enn form B ved høyere temperaturer og form F er særlig egnet som mellomprodukt og utgangsmateriale for å produsere stabile polymorfe former. Polymorf form F kan fremstilles som et fast pulver med ønsket middels partikkelstørrelsesområde som typisk strekker seg fra 1 μm til 500 μm .

[0104] Polymorf F viser et karakteristisk røntgenpulverdiffraksjonsmønster med karakteristiske topper uttrykt i d-verdier (Å) på: 17,1 (vs), 12,1 (w), 8,6 (w), 7,0 (w), 6,5 (w), 6,4 (w), 5,92 (w), 5,72 (w), 5,11 (w), 4,92 (m), 4,86 (w), 4,68 (m), 4,41 (w), 4,12 (w), 3,88 (w), 3,83 (w), 3,70 (m), 3,64 (w), 3,55 (m), 3,49 (s), 3,46 (vs), 3,39 (s), 3,33 (m), 3,31 (m), 3,27 (m), 3,21 (m), 3,19 (m), 3,09 (m), 3,02 (m), og 2,96 (m). Figur 3 er et diagram av det karakteristiske røntgendiffraksjonsmønsteret vist ved form F av (6R)-L-erytro-tetrahydro-

biopterindihydroklorid.

[0105] Polymorf F kan oppnås ved faselikevekt av suspensjoner av polymorf form A i egnede polare og ikke-vandige løsningsmidler som knapt oppløser nevnte lavere energiformer, spesielt alkoholer slik som metanol, etanol, propanol og isopropanol. Polymorf form F av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid kan også fremstilles ved å dispergere partikler av fast form A av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid i et ikke-vandig løsningsmiddel som knapt løser (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydrokloridet ved lavere enn romtemperatur, omrøring av suspensjonen ved nevnte temperaturer i en tidsperiode tilstrekkelig til å produsere polymorf form F, deretter isolere krystallinsk form F og fjerning av løsningsmidlet fra den isolerte formen F. Fjerning av løsningsmiddel og tørking kan utføres under luft, tørr luft eller en tørr beskyttelse gass slik som nitrogen eller edelgasser og ved, eller lavere enn romtemperatur for eksempel ned til 0 °C. Temperaturen under faselikevekt er foretrukket fra 5 til 15 °C og mest foretrukket omtrent 10 °C.

Polymorf Form J

[0106] Det har blitt funnet at en annen krystall polymorf av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid er en stabil foretrukket form av BH4 for bruk i et farmasøytisk preparat beskrevet her, som refereres til her som "form J," eller "polymorf J". Polymorf J er svakt hygroskopisk og absorberer vann når håndteres ved luftfuktigheten. Polymorf J er en metastabil form, og et hygroskopisk anhydrat, og det kan bli transformert tilbake til form E beskrevet nedenfor, hvorfra det oppnås ved eksponering for høy relativ luftfuktighet slik som over 75 % relativ fuktighet. Form J er spesielt egnet som mellomprodukt og utgangsmateriale for å produsere stabile polymorfe former. Polymorf form J kan fremstilles som et fast pulver med ønsket middels partikkelstørrelsesområde som typisk strekker seg fra 1 μm til 500 μm .

[0107] Form J viser et karakteristisk røntgenpulverdiffraksjonsmønster med karakteristiske topper uttrykt i d-verdier (Å) til: 14,6 (m), 6,6 (w), 6,4 (w), 5,47 (w), 4,84 (w), 3,29 (vs), og 3,21 (vs). Figur 4 er et diagram av det karakteristiske røntgendiffraksjonsmønsteret vist ved formen J av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid.

[0108] Polymorf J kan oppnås ved dehydratisering av formen E ved moderate temperaturer under vakuum. Spesielt kan den Polymorf form J av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterin-dihydroklorid fremstilles ved å ta form E og å fjerne vannet fra form E ved å behandle form E i envakuumtørker for å oppnå form J ved moderate temperaturer, noe som kan bety en

5 temperatur i området fra 25 til 70 °C, og mest fortrinnsvis 30 til 50 °C.

Polymorf Form K

[0109] Det er funnet at en annen krystall polymorf av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid er en stabil foretrukket form av BH4 for bruk i et farmasøytisk preparat beskrevet

10 her, som refereres til her som "form K", eller "polymorf K." Polymorf K er svakt hygroskopisk og adsorberer vann til et innhold på omtrent 2,0 vektprosent, som kontinuerlig frigis mellom 50 °C og 100 °C, ved oppvarming med en hastighet på 10 °C/minutt. Polymorf K er en metastabil form, og et hygroskopisk anhydrat, som er mindre stabil enn form B ved høyere temperaturer og Form K er spesielt egnet som mellomprodukt og utgangsmateriale for å

15 produsere stabile polymorfe former, spesiell form B. Polymorf form K kan fremstilles som et fast pulver med ønsket middels partikkelstørrelsesområde som typisk strekker seg fra 1 µm til 500 µm.

[0110] Form K viser et karakteristisk røntgenpulverdiffraksjonsmønster med karakteristiske topper uttrykt i d-verdier (Å) på: 14,0 (s), 9,4 (w), 6,6 (w), 6,4 (w), 6,3 (w), 6,1 (w), 6,0 (w),

20 5,66 (w), 5,33 (w), 5,13 (vw), 4,73 (m), 4,64 (m), 4,48 (w), 4,32 (vw), 4,22 (w), 4,08 (w), 3,88 (w), 3,79 (w), 3,54 (m), 3,49 (vs), 3,39 (m), 3,33 (vs), 3,13 (s), 3,10 (m), 3,05 (m), 3,01 (m), 2,99 (m), og 2,90 (m). Figur 5 er et diagram av det karakteristiske røntgendiffraksjonsmønsteret vist ved form K av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid.

[0111] Polymorf K kan oppnås ved krystallisering fra blandinger av polare løsningsmidler

25 som inneholder små mengder vann, og i nærvær av små mengder av askorbinsyre. Løsningsmidler for løsningsmiddelblandingen kan velges fra eddiksyre og en alkohol slik som metanol, etanol, n-eller isopropanol. Spesielt kan den Polymorf form K av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid fremstilles ved oppløsning av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid i en blanding av eddiksyre og en alkohol eller tetrahydrofuran inneholdende små

30 mengder vann og en liten mengde askorbinsyre ved forhøyede temperaturer, senking av temperaturen til lavere enn romtemperatur for å krystallisere nevnte dihydroklorid, isolere bunnfallet og tørking av det isolerte bunnfall ved forhøyet temperatur eventuelt under vakuum. Egnede alkoholer er for eksempel metanol, etanol, propanol og isopropanol, hvorved etanol er foretrukket. Forholdet mellom eddiksyre til alkohol eller tetrahydrofuran kan være fra 2:1 1 til

35 1: 2 og fortrinnsvis omtrent 1:1. Oppløsning av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid kan utføres i nærvær av et høyere vanninnhold og mer av anti-løsningsmiddelblanding kan tilsettes for å gi fullstendig utfelling. Mengden av vann i det endelige preparatet kan være fra 0,5 til 5 prosent i vekt og mengden av askorbinsyre kan være fra 0,01 til 0,5 prosent etter

vekt, begge ved henvisning til løsningsmiddelblandingen. Temperaturen for oppløsning kan være i området fra 30 til 100 og fortrinnsvis 35 til 70 °C og tørketemperatur kan være i området fra 30 til 50 °C. Bunnfallet kan vaskes med en alkohol slik som etanol etter isolering, f.eks. filtrering. Polymorf K kan enkelt omdannes til den mest stabile form B ved faselikevekt i f.eks. isopropanol og eventuelt seeding med Form B krystaller ved mer enn romtemperatur, for eksempel temperaturer fra 30 til 40 °C.

Hydratformer av (6R) L-tetrahydrobiopterindihydrokloridsalt

[0112] Som nærmere beskrevet nedenfor har det blitt funnet at (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid eksisterer som en rekke av krystallinsk hydrater, som skal bli beskrevet og definert her som former C, D, E, H og O. Disse hydratformene er anvendelige som en stabil form av BH4 for de farmasøytiske preparatene beskrevet her og i fremstillingen av preparater som inkluderer stabile krystall polymorfer av BH4.

Hydrat form C

[0113] Det har blitt funnet at en hydrat krystallform av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid er en stabil foretrukket form av BH4 for bruk i et farmasøytisk preparat beskrevet her, som refereres til her som "form C," eller "hydrat C". Hydrat form C er svakt hygroskopisk og har et vanninnhold på omtrent 5,5 vektprosent, noe som indikerer at form C er et monohydrat. Hydrat C har et smeltepunkt i nærheten av 94 °C (ΔH_f er omtrent 31 J/g) og Hydrat form C er spesielt egnet som mellomprodukt og utgangsmateriale for å produsere stabile polymorfe former. Polymorf form C kan fremstilles som et fast pulver med ønsket middels partikkelstørrelsesområde som typisk strekker seg fra 1 µm til 500 µm.

[0114] Form C viser et karakteristisk røntgenpulverdiffraksjonsmønster med karakteristiske topper uttrykt i d-verdier (Å) på: 18,2 (m), 15,4 (h), 13,9 (vs), 10,4 (h), 9,6 (h), 9,1 (w), 8,8 (m), 8,2 (w), 8,0 (w), 6,8 (m), 6,5 (w), 6,05 (m), 5,77 (w), 5,64 (w), 5,44 (w), 5,19 (w), 4,89 (w), 4,76 (w), 4,70 (w), 4,41 (w), 4,25 (m), 4,00 (m), 3,88 (m), 3,80 (m), 3,59 (s), 3,50 (m), 3,44 (m), 3,37 (m), 3,26 (s), 3,19 (vs), 3,17 (s), 3,11 (m), 3,06 (m), 3,02 (m), 2,97 (vs), 2,93 (m), 2,89 (m), 2,83 (m), og 2,43 (m). Figur 6 er et diagram av det karakteristiske røntgen-diffraksjonsmønsteret vist ved Hydrat form C av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid.

[0115] Hydrat form C kan oppnås ved faselikevekt ved omgivelsestemperatur av en polymorf form slik som polymorf B suspensjon i et ikke-løsningsmiddel som inneholder vann i en mengde på fortrinnsvis omtrent 5 vektprosent, ved referanse til løsningsmidlet. Hydrat form C av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid kan fremstilles ved å suspendere (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid i et ikke-løsningsmiddel slik som, heptan, C1-C4-alkoholer slik som metanol, etanol, 1- eller 2-propanol, acetater, slik som etylacetat, aceto-

nitril, eddiksyre eller etere slik som terahydrofuran, dioksan, tertier-butyl-metyleter, eller binære eller ternære blandinger av slike ikke-løsningsmidler, til hvilke tilstrekkelig vann tilsettes til å danne et monohydrat, og omrøring av suspensjonen ved, eller lavere enn omgivelsestemperatur (f.eks. 0-30 °C) i en tid som er tilstrekkelig til å danne et monohydrat.

5 Tilstrekkelig vann kan bety 1 til 10 og fortrinnsvis 3 to 8 vektprosent av vann, med henvisning til mengden av løsningsmidlet. De faste stoffene kan filtreres fra og tørkes i luft ved omtrent romtemperatur. Det faste stoffet kan absorbere noe vann, og har derfor et høyere vanninnhold enn den teoretiske verdi på 5,5 vektprosent. Hydrat form C er ustabil med hensyn til formene D og B, og omdannes lett til polymorf form B ved temperaturer på omtrent 40 °C i luft og
10 lavere relativ fuktighet. Form C kan omdannes til den mer stabile hydrat D ved suspensjonslikevekt ved romtemperatur.

Hydrat form D

[0116] Det har blitt funnet at en annen, hydrat krystallform av (6R)-L-erytro-tetrahydro-biopterindihydroklorid er en stabil foretrukket form av BH4 for bruk i et farmasøytisk preparat
15 beskrevet her, som refereres til her som "form D", eller "hydrat D". Hydrat form D er svakt hygroskopisk og kan ha et vanninnhold på omtrent 5,0 til 7,0 vektprosent, hvilket tilsier at form D er et monohydrat. Hydrat D har et smeltepunkt i nærheten av 153 °C (ΔH_f er omtrent 111 J/g) og har mye høyere stabilitet enn form C og er til og med stabilt når det utsettes for luftfuktigheten ved omgivelsestemperatur. Hydrat form D kan derfor enten brukes til å
20 forberede formuleringer eller som mellomprodukt og utgangsmateriale for å produsere stabile polymorfe former. Polymorf form D kan fremstilles som et fast pulver med ønsket middels partikkelstørrelses-område som typisk strekker seg fra 1 µm til 500 µm.

[0117] Form D oppviser et karakteristisk røntgenpulverdiffraksjonsmønster med karakteristiske topper uttrykt i d-verdier (Å) til: 8,6 (s), 6,8 (w), 5,56 (m), 4,99 (m), 4,67 (s),
25 4,32 (m), 3,93 (vs), 3,88 (w), 3,64 (w), 3,41 (w), 3,25 (w), 3,17 (m), 3,05 (s), 2,94 (w), 2,92 (w), 2,88 (m), 2,85 (w), 2,80 (w), 2,79 (m), 2,68 (w), 2,65 (w), 2,52 (vw), 2,35 (w), 2,34 (w), 2,30 (w), og 2,29 (w). Figur 7 er et diagram av det karakteristiske røntgendiffraksjonsmønsteret vist ved Hydrat form D av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid.

[0118] Hydrat form D kan oppnås ved omtrent romtemperatur ved å tilsette konsentrerte
30 vandige løsninger av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid til et overskudd av et ikke-løsningsmiddel slik som heksan, heptan, diklormetan, 1- eller 2-propanol, aceton, etylacetat, acetonitril, eddiksyre eller etere slik som terahydrofuran, dioksan, tertier-butyl-metyleter, eller blandinger av slike ikke-løsningsmidler, og omrøring av suspensjonen ved omgivelsestemperatur. Det krystallinske faste stoffet kan filtreres fra og deretter tørkes under
35 tørr nitrogen ved romtemperatur. Et foretrukket ikke-løsningsmiddel er isopropanol. Tilsetningen av den vandige løsningen kan utføres dråpevis for å unngå en plutselig utfelling. Hydrat form D av (6R) - L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid kan fremstilles ved

omtrent romtemperatur ved å tilsette en konsentrert vandig løsning av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid til et overskudd av et ikke-løsningsmiddel og omrøring av suspensjonen ved omgivelsestemperatur. Overskudd av ikke-løsningsmiddel kan bety at forholdet av vandig til ikke-løsningsmiddel er fra 1:10 til 1:1000. Form D inneholder et lite
 5 overskudd av vann, relatert til monohydratet, og det antas at det er absorbert vann grunnet den svakt hygroscopiske naturen til dette krystallinske hydratet. Hydrat form D anses som den mest stabile av kjente hydrater ved omgivelsestemperatur og en relativ fuktighet på mindre enn 70 %. Hydrat form D kan anvendes til formuleringer fremstilt under forhold hvor dette hydratet er stabilt. Omgivelsestemperatur kan bety 20-30 °C.

10 Hydrat form E

[0119] Det er blitt funnet at en annen hydrat krystallform av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid er en stabil foretrukket form av BH4 for bruk i et farmasøytisk preparat beskrevet her, som refereres til her som "form E, "eller" hydrat E". Hydrat form E har et vann-
 15 innhold på omtrent 10 til 14 vektprosent, noe som antyder at form E er et dihydrat. Hydratet E dannes ved temperaturer under romtemperatur. Hydrat form E er spesielt egnet som mellomprodukt og utgangsmateriale for å produsere stabile polymorfe former. Det er spesielt egnet for å produsere vann-fri form J ved tørking under nitrogen eller eventuelt under vakuum. Form E er ikke-hygroscopisk og stabil under ganske høy relativ fuktighet, dvs. ved relativ fuktighet
 20 over omtrent 60 % og opp til omtrent 85 %. Polymorf form E kan fremstilles som et fast pulver med ønsket middels partikkelstørrelsesområde som typisk strekker seg fra 1 µm til 500 µm.

[0120] Form E viser et karakteristisk røntgenpulverdiffraksjonsmønster med karakteristiske topper uttrykt i d-verdier (Å) til: 15,4 (s), 6,6 (w), 6,5 (w), 5,95 (vw), 5,61 (vw), 5,48 (w), 5,24
 25 (w), 4,87 (w), 4,50 (vw), 4,27 (w), 3,94 (w), 3,78 (w), 3,69 (m), 3,60 (w), 3,33 (s), 3,26 (vs), 3,16 (w), 3,08 (m), 2,98 (w), 2,95 (m), 2,91 (w), 2,87 (m), 2,79 (w), 2,74 (w), 2,69 (w), og 2,62 (w). Figur 8 er et diagram av det karakteristiske røntgendiffraksjonsmønsteret vist ved Hydrat form E av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid.

[0121] Hydrat form E kan oppnås ved å tilsette konsentrerte vandige løsninger av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid til et overskudd av et ikke-løsningsmiddel nedkjølt til
 30 temperaturer fra omtrent 10 til -10 °C, og fortrinnsvis mellom 0 til 10 °C og omrøring av suspensjonen ved nevnte temperaturer. Det krystallinske faste stoffet kan filtreres fra og deretter tørkes under tørr nitrogen ved romtemperatur. Ikke-løsningsmidler er for eksempel slik som heksan, heptan, diklormetan, 1- eller 2-propanol, aceton, etylacetat, acetonitril, eddiksyre eller etere slik som tetrahydrofuran, dioksan, tertiær-butylmetyleter, eller blandinger
 35 av slike ikke-løsningsmidler. Et foretrukket ikke-løsningsmiddel er isopropanol. Tilsetningen av den vandige løsning kan utføres dråpevis å unngå en plutselig utfelling. Hydrat form E av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid kan fremstilles ved å tilsette en konsentrert

vandig løsning av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid til et overskudd av et ikke-løsningsmiddel, som er avkjølt til temperaturer fra omtrent 10 til -10 °C, og omrøring av suspensjonen ved romtemperatur. Overskudd av ikke-løsningsmiddel kan bety et forhold av vandig til ikke-løsningsmiddel fra 1:10 til 1:1000. Et foretrukket ikke-løsningsmiddel er tetrahydrofuran. En annen fremstillingsmåte omfatter å utsette polymorf form B til en luft-atmosfære med en relativ fuktighet på 70 til 90 %, fortrinnsvis omtrent 80 %. Hydrat form E anses å være et dihydrat, der noe ekstra vann kan absorberes. Polymorf form E kan omdannes til polymorf J ved tørking under vakuum ved moderate temperaturer, noe som kan bety mellom 20 °C og 50 °C ved trykk mellom 0 og 100 mbar. Form E er spesielt egnet for formuleringer i halvfast form på grunn av sin stabilitet ved høy relativ fuktighet.

Hydrat form H

[0122] Det har blitt funnet at en annen, hydrat krystallform av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid er en stabil foretrukket form av BH4 for bruk i et farmasøytisk preparat beskrevet her, som refereres til her som "form H", eller "hydrat H". Hydrat form H har et vanninnhold på omtrent 5,0 til 7,0 vektprosent, hvilket tilsier at form H er et hygroskopisk monohydrat. Hydrat form H dannes ved temperaturer under romtemperatur. Hydrat form H er spesielt egnet som mellomprodukt og utgangsmateriale for å produsere stabile polymorfe former. Polymorf form H kan fremstilles som et fast pulver med ønsket middels partikkelstørrelsesområde som typisk strekker seg fra 1 µm til 500 µm.

[0123] Form H viser et karakteristisk røntgenpulverdiffraksjonsmønster med karakteristiske topper uttrykt i d-verdier (Å) ved: 8,6 (vs), 10,3 (w), 8,0 (w), 6,6 (w), -39 (w), 6,07 (w), 4,81 (w), 4,30 (w), 3,87 (m), 3,60 (m), 3,27 (m), 3,21 (m), 3,13 (w), 3,05 (w), 2,96 (M), 2,89 (m), 2,82 (w), og 2,67 (m). Figur 9 er et diagram av det karakteristiske røntgendiffraksjonsmønsteret vist ved Hydrat form H av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid.

[0124] Hydrat form H kan oppnås ved å løse (6R) - L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid ved omgivelsestemperatur i en blanding av eddiksyre og vann, og tilsette deretter et ikke-løsningsmiddel for å utfelle et krystallinsk, fast stoff, kjøling av den oppnådde suspensjon, og omrøring av avkjølte suspensjon i en viss tid. Det krystallinske faste stoffet filtreres fra og deretter tørkes under vakuum ved omgivelsestemperatur. Ikke-løsningsmidler er for eksempel slik som heksan, heptan, diklormetan, 1- eller 2-propanol, aceton, etylacetat, acetonitril, eddiksyre eller etere slik som tetrahydrofuran, dioksan, tertiar-butyl-metyleter, eller blandinger av slike ikke-løsningsmidler. Et foretrukket ikke-løsningsmiddel er tetrahydrofuran. Hydrat form H av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid kan fremstilles ved omgivelsestemperatur ved å løse (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid i en blanding av eddiksyre og en mindre mengde av vann enn det som av eddiksyre, tilsette et ikke-løsningsmiddel og kjøle den oppnådde suspensjonen til temperaturer i området fra -10 til 10 °C, og fortrinnsvis -5 til 5 °C, og omrøring av suspensjonen ved nevnte temperatur i en viss tid. Viss

tid kan bety 1 til 20 timer. Vektforholdet av eddiksyre til vann kan være fra 2:1 til 25:1 og fortrinnsvis 5:1-15:1. Vektforholdet av eddiksyre/vann til ikke-løsningsmidlet kan være fra 1:2 til 1:5. Hydrat form H synes å være et monohydrat med et lite overskudd av vann absorbert grunnet den hygroskopiske naturen.

5 Hydrat form O

[0125] Det har blitt funnet at en annen hydrat krystallform av (6R)-L-erytro-tetrahydro-biopterindihydroklorid er en stabil foretrukket form av BH4 for bruk i et farmasøytisk preparat beskrevet her, som refereres til her som "form O", eller "hydrat O". Hydrat form O dannes ved temperaturer i nærheten av romtemperatur. Hydrat form O er spesielt egnet som mellom-
10 produkt og utgangsmateriale for å produsere stabile polymorfe former. Polymorf form O kan fremstilles som et fast pulver med ønsket middels partikkelstørrelsesområde som typisk strekker seg fra 1 µm til 500 µm.

[0126] Form O viser et karakteristisk røntgenpulverdiffraksjonsmønster med karakteristiske topper uttrykt i d-verdier (Å) ved: 15,9 (w), 14,0 (w), 12,0 (w), 8,8 (m), 7,0 (w), 6,5 (w), 6,3
15 (m), 6,00 (w), 5,75 (w), 5,65 (m), 5,06 (m), 4,98 (m), 4,92 (m), 4,84 (w), 4,77 (w), 4,42 (w), 4,33 (w), 4,00 (m), 3,88 (m), 3,78 (w), 3,69 (s), 3,64 (s), 3,52 (vs), 3,49 (S), 3,46 (s), 3,42 (s), 3,32 (m), 3,27 (m), 3,23 (s), 3,18 (s), 3,15 (vs), 3,12 (m), 3,04 (vs), 2,95 (m), 2,81 (s), 2,72 (m), 2,67 (m), og 2,61 (m). Figur 10 er et diagram av det karakteristiske røntgendiffraksjonsmønster vist ved Hydrat form O av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid.

[0127] Hydrat form O kan fremstilles ved å utsette polymorf form F for en nitrogenatmosfære inneholdende vanddamp med en resulterende relativ fuktighet på rundt 52 % i omtrent 24 timer. Det faktum at form F, som er et svakt hygroskopisk anhydrat, kan brukes til å fremstille Form O ved 52 % relativ fuktighet antyder at form O er et hydrat, som er mer stabil enn form F ved omgivelsestemperatur- og -fuktighetsforhold.

25 Solvatformer av (6R) L-tetrahydrobiopterindihydrokloridsaltet

[0128] Som nærmere beskrevet nedenfor, har det blitt funnet at (6R)-L-erytro-tetrahydro-biopterindihydroklorid eksisterer som en rekke krystallinske solvatformer, som beskrives og defineres her som former G, I, L, M og N. Disse solvatformene er anvendelige som en stabil
30 form av BH4 for farmasøytisk preparater beskrevet her og i fremstillingen av preparater som inkluderer stabile krystall polymorfer av BH4.

Solvatform G

[0129] Det har blitt funnet at en etanolsolvat krystallform av (6R)-L-erytro-tetrahydro-biopterindihydroklorid er en stabil foretrukket form av BH4 for bruk i et farmasøytisk preparat
35 beskrevet her, som refereres til her som "form G," eller "hydrat G". Etanolsolvatform G har et

etanol-innhold på om lag 8,0 til 12,5 vektprosent, noe som antyder at form G er et hygro-skopisk monoetanol-solvat. Solvatformen G dannes ved temperaturer under romtemperatur. Form G er spesielt egnet som mellomprodukt og utgangsmateriale for å produsere stabile polymorfe former. Polymorf form G kan fremstilles som et fast pulver med en ønsket middels partikkelstørrelsesområde som typisk strekker seg fra 1 μm til 500 μm .

[0130] Form G viser et karakteristisk røntgenpulverdiffraksjonsmønster med karakteristiske topper uttrykt i d-verdier (Å) ved: 14,5 (vs), 10,9 (w), 9,8 (w), 7,0 (w), 6,3 (w), 5,74 (w), 5,24 (vw), 5,04 (vw), 4,79 (w), 4,41 (w), 4,02 (w), 3,86 (w), 3,77 (w), 3,69 (w), 3,63 (m), 3,57 (m), 3,49 (m), 3,41 (m), 3,26 (m), 3,17 (m), 3,07 (m), 2,97 (m), 2,95 (m), 2,87 (w), og 2,61 (w).

Figur 11 er et diagram av det karakteristiske røntgendiffraksjonsmønsteret vist ved solvatform G av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid.

[00131] Etanol-solvatform G kan oppnås ved krystallisasjon av L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid løst i vann og tilsetning av et stort overskudd av etanol, omrøring av den oppnådde suspensjonen ved, eller lavere enn omgivelsestemperatur og tørking av det isolerte faste stoffet under luft eller nitrogen ved omtrent romtemperatur. Her betyr et stort overskudd av etanol en resulterende blanding av etanol og vann med mindre enn 10 % vann, fortrinnsvis omtrent 3 til 6 %. Etanolat form G av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid kan fremstilles ved omtrent romtemperatur til temperaturer på 75 °C ved oppløsning av (6R)-L-erytro-tetrahydro-biopterindihydroklorid i vann eller i en blanding av vann og etanol, avkjøling av en oppvarmet løsning til romtemperatur og ned til 5 til 10 °C, og eventuelt tilsetning av etanol for å fullføre utfellingen, omrøring av den oppnådde suspensjonen ved temperaturer på 20 til 5 °C, filtrering av det hvite, krystallinske faste stoffet og tørking av det faste stoffet under luft eller en beskyttende gass slik som nitrogen ved temperaturer rundt romtemperatur. Prosessen kan utføres i en første variant ved oppløsning av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid ved omtrent romtemperatur i en mindre mengde av vann og deretter tilsetning av et overskudd av etanol og deretter omrøring av den oppnådde suspensjonen i en tid som er tilstrekkelig for faselikevekt. I en andre variant kan (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid suspenderes i etanol, eventuelt tilsettes en mindre mengde av vann, og oppvarming av suspensjonen og oppløst (6R)-L-erytro-tetrahydro-biopterindihydroklorid, nedkjøling av løsningen til temperaturer på omtrent 5 til 15 °C, og tilsetning av ytterligere etanol til suspensjonen og deretter omrøring av den oppnådde suspensjonen i en tid som er tilstrekkelig for faselikevekt.

Solvatform I

[0132] Det har blitt funnet at en eddiksyre solvat krystallform av (6R)-L-erytro-tetrahydro-biopterindihydroklorid er en stabil foretrukket form av BH4 for bruk i et farmasøytisk preparat beskrevet her, som refereres til her som "form I" eller "hydrat I". Eddiksyre solvatform I har et eddiksyreinhold på omtrent 12,7 vektprosent, noe som antyder at form I er et hygrokopisk

eddiksyremonosolvat. Solvatformen I dannes ved temperaturer under romtemperatur. Eddiksyresolvatform I er spesielt egnet som mellomprodukt og utgangsmateriale for å produsere stabile polymorfe former. Polymorf form I kan fremstilles som et fast pulver med ønsket middels partikkelstørrelsesområde som typisk strekker seg fra 1 µm til 500 µm..

5 **[0133]** Form I oppviser et karakteristisk røntgenpulverdiffraksjonsmønster med karakteristiske topper uttrykt i d-verdier (Å) ved: 14,5 (m), 14,0 (w), 11,0 (w), 7,0 (vw), 6,9 (vw), 6,2 (vw), 5,30 (w), 4,79 (w), 4,44 (w), 4,29 (w), 4,20 (vw), 4,02 (w), 3,84 (w), 3,80 (w), 3,67 (vs), 3,61 (m), 3,56 (w), 3,44 (m), 3,27 (w), 3,19 (w), 3,11 (s), 3,00 (m), 2,94 (w), 2,87 (w), og 2,80 (w). Figur 12 er et diagram av det karakteristiske røntgendiffraksjonsmønsteret vist ved solvatform I av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid.

10 **[0134]** Eddiksyre solvatform I kan oppnås ved oppløsning av L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid i en blanding av eddiksyre og vann ved forhøyet temperatur, tilsetning av ytterligere eddiksyre til løsningen, avkjøling til en temperatur på omtrent 10 °C, deretter oppvarming av den dannede suspensjonen til omtrent 15 °C, og deretter omrøring av den
15 oppnådde suspensjonen i en tid som er tilstrekkelig for faselikevekt, som kan vare opp til 3 dager. Det krystallinske faste stoffet blir deretter filtrert fra og tørket under luft eller en beskyttelsesgass slik som nitrogen ved temperaturer rundt romtemperatur.

Solvatform L

20 **[0135]** Det er funnet at en blandet etanolsolvat/hydrat krystallform av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid er en stabil foretrukket form av BH4 for bruk i et farmasøytisk preparat beskrevet her, som refereres til her som "form L" eller "hydrat L". Form L kan inneholde 4 %, men opp til 13 % etanol og 0 % til omtrent 6 % vann. Form L kan omdannes til form G når den behandles i etanol ved temperaturer fra omtrent 0 °C til 20 °C. I tillegg kan
25 form L omdannes til form B når den behandles i et organisk løsningsmiddel ved omgivelsestemperatur (10 °C til 60 °C). Polymorf form L kan fremstilles som et fast pulver med ønsket middels partikkelstørrelsesområde som typisk strekker seg fra 1 µm til 500 µm.

[0136] Form L viser et karakteristisk røntgenpulverdiffraksjonsmønster med karakteristiske topper uttrykt i d-verdier (Å) på: 14,1 (vs), 10,4 (w), 9,5 (w), 9,0 (vw), 6,9 (w), 6,5 (w), 6,1
30 (w), 5,75 (w), 5,61 (w), 5,08 (w), 4,71 (w), 3,86 (w), 3,78 (w), 3,46 (m), 3,36 (m), 3,06 (w), 2,90 (w), og 2,82 (w). Figur 13 er et diagram av det karakteristiske røntgendiffraksjonsmønsteret vist ved solvatform L av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid.

[0137] Form L kan oppnås ved å suspendere hydrat form E ved romtemperatur i etanol og omrøring av suspensjonen ved temperaturer fra 0 til 10 °C, fortrinnsvis omtrent 5 °C, i en tid
35 som er tilstrekkelig for faselikevekt, som kan være 10 til 20 timer. Det krystallinske faste stoffet blir så filtrert fra og tørket fortrinnsvis under redusert trykk ved 30 °C eller under nitrogen. Analyse ved TG-FTIR antyder at formen L kan inneholde variable mengder av

etanol og vann, dvs., det kan eksistere som en polymorf (anhydrat), som et blandet etanol-solvat/hydrat, eller som et hydrat.

Solvatform M

[0138] Det har blitt funnet at en etanolsolvat krystallform av (6R)-L-erytro-tetrahydro-biopterindihydroklorid er en stabil foretrukket form av BH4 for bruk i et farmasøytisk preparat beskrevet her, som refereres til her som "form M", eller "hydrat M". Form M kan inneholde 4 %, men opp til 13 % etanol og 0 % til cirka 6 % av vann, noe som antyder at form M er et svakt hygroskopisk etanolsolvat. Solvatformen M dannes ved romtemperatur. Form M er spesielt egnet som mellomprodukt og utgangsmateriale for å produsere stabile polymorfe former, siden form M kan omdannes til Form G når den behandles i etanol ved temperaturer mellom omtrent -10° til 15 °C, og til form B når den behandles i organiske løsningsmidler slik som etanol, C3 og C4 alkoholer, eller sykliske etere slike som THF og dioksan. Polymorf form M kan fremstilles som et fast pulver med ønsket middels partikkelstørrelsesområde som typisk strekker seg fra 1 µm til 500 µm.

[0139] Form M oppviser et karakteristisk røntgenpulverdiffraksjonsmønster med karakteristiske topper uttrykt i d-verdier (Å) til: 18,9 (s), 6,4 (m), 6,06 (w), 5,66 (w), 5,28 (w), 4,50 (w), 4,23 (w), og 3,22 (vs). Figur 14 er et diagram av det karakteristiske røntgen-diffraksjonsmønsteret vist ved solvatform M av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid.

[0140] Etanolsolvat form M kan oppnås ved løsning av L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid i etanol og fordampning av løsningen under nitrogen ved omgivelsestemperatur, dvs. mellom 10 °C og 40 °C. Form M kan også oppnås ved tørking av form G under en svak strøm av tørr nitrogen ved en hastighet på omtrent 20 til 100 ml/min. Avhengig av omfanget av tørking under nitrogen kan den resterende mengden etanol være variabel, dvs. fra omtrent 3 % til 13 %.

Solvatform N

[0141] Det har blitt funnet at en annen solvat krystallform av (6R)-L-erytro-tetrahydro-biopterindihydroklorid er en stabil foretrukket form av BH4 for bruk i et farmasøytisk preparat beskrevet her, som refereres til her som "form N," eller "hydrat N". Form N kan inneholde totalt opptil 10 % av isopropanol og vann, noe som antyder at form N er et svakt hygroskopisk isopropanolsolvat. Form N kan oppnås gjennom vask av form D med isopropanol og påfølgende tørking i vakuum ved omtrent 30 °C. Form N er spesielt egnet som mellomprodukt og utgangsmateriale for å produsere stabile polymorfe former. Polymorf form N kan fremstilles som et fast pulver med ønsket middels partikkelstørrelsesområde som typisk strekker seg fra 1 µm til 500 µm.

[0142] Form N oppviser et karakteristisk røntgen-pulverdiffraksjonsmønster med karakteristiske topper uttrykt i d-verdier (Å) til: 19,5 (m), 9,9 (w), 6,7 (w), 5,15 (w), 4,83 (w), 3,91 (w), 3,56 (m), 3,33 (vs), 3,15 (w), 2,89 (w), 2,81 (w), 2,56 (w), og 2,36 (w). Figur 15 er et diagram av det karakteristiske røntgendiffraksjonsmønsteret vist ved solvatform N av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid.

[0143] Isopropanolen formen N kan oppnås ved oppløsning av L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid i 4,0 ml av en blanding av isopropanol og vann (blandingsvolumforhold for eksempel 4:1). Til denne løsningen tilsettes det langsomt isopropanol (IPA, f.eks. omkring 4,0 ml) og den resulterende suspensjon avkjøles til 0 °C og omrøres i flere timer (f.eks. omtrent 10 til 18 timer) ved denne temperaturen. Suspensjonen filtreres og det faste residuum vaskes med isopropanol ved romtemperatur. Det oppnådde krystallinske materialet tørkes deretter ved omgivelsestemperatur (f.eks. omtrent 20 til 30 °C) og redusert trykk (omkring 2 til 10 mbar) i flere timer (f.eks. omtrent 5 til 20 timer). TG-FTIR viser et vekttap på 9,0 % mellom 25-200 °C, noe som skyldes både isopropanol og vann. Dette resultatet antyder at formen N kan eksistere enten i form av et isopropanolsolvat, eller i form av blandet isopropanolsolvat/hydrat, eller som en ikke-solvatiserte form med en liten mengde vann.

[0144] For fremstilling av de polymorfe formene, kan det benyttes krystallasjonsteknikker velkjente innen faget, slik som omrøring av en suspensjon (faselikevekt i), utfelling, omkrystallisering, fordampning, løsningsmiddel som vannsorpsjon metoder eller spalting av solvater. Fortynnet, mettet eller overmettet løsninger kan anvendes for krystallisering, med eller uten kimdannelse med egnede kimdannelsesmidler. Temperaturer opp til 100 °C kan anvendes for å danne løsninger. Avkjøling for å initiere krystallisering og utfelling ned til -100 °C, og fortrinnsvis ned til -30 °C kan anvendes. Meta-stabile polymorfer eller pseudo-polymorfe former kan anvendes for å fremstille løsninger eller suspensjoner for fremstilling av mer stabile former og for å oppnå høyere konsentrasjoner i løsningene.

[0145] Det ble overraskende funnet at hydrat form D er den mest stabile formen under hydratene og former B og D er spesielt egnet til å bli brukt i farmasøytiske formuleringer. Former B og D viser noen fordeler som en målrettet produksjon, god håndtering på grunn av praktisk krystall størrelse og morfologi, meget god stabilitet under produksjonsforhold for ulike typer formulering, lagringsstabilitet, høyere løselighet, og høy biotilgjengelighet. Følgelig er en utførelsesform av sammensetningene og fremgangsmåtene beskrevet her er farmasøytisk preparat som inkluderer polymorf form B og/eller hydrat form D av (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid og en farmasøytisk akseptabel bærer eller fortynningsmiddel.

III. Farmasøytiske Formuleringer

[0146] De formuleringen som er beskrevet her administreres fortrinnsvis som orale formuleringer. Orale formuleringer er fortrinnsvis faste formuleringer slik som kapsler,

tabletter, piller og pastiller, eller flytende formuleringer som vandige suspensjoner, eliksirer og siruper. Den ulike form av BH4 beskrevet her kan brukes direkte som pulver (mikroniserte partikler), granuler, suspensjoner eller løsninger, eller den kan kombineres sammen med andre farmasøytisk akseptable ingredienser ved å blande komponentene og eventuelt findele dem, og deretter å fylle kapsler, fremstilt for eksempel fra hard eller myk gelatin, komprimerte

tabletter, piller eller pastiller, eller suspendere eller løse dem i bærere for suspensjoner, eliksirer og sirup. Beleggene kan påføres etter komprimering for å danne tabletter.

[0147] Farmasøytisk akseptable ingredienser er velkjent for de forskjellige typer av formulering og kan for eksempel være bindemidler som for eksempel naturlige eller syntetiske polymerer, eksipienser, smøremidler, overflateaktive midler, søtstoffer og smaksstoffer, belegg materialer, konserveringsmidler, fargestoffer, fortykningsmidler, adjuvanter antimikrobielle agens, antioksidanter og bærere for de ulike formuleringstyper. Uttrykket "farmasøytisk eller farmakologisk akseptable" refererer til molekyllære enheter og preparater som er godkjent av US Food and Drug Administration eller tilsvarende utenlandsk regulatoriske myndigheter for administrasjon til mennesker. Som anvendt her inkluderer "farmasøytisk akseptabel bærer" ethvert og alle løsningsmidler, spredning media, belegg, antibakterielle og antifungale midler, isotoniske og absorpsjons-forsinkende midler og lignende. Bruken av slike medier og midler for farmasøytisk aktive substanser er velkjent innen faget. Medmindre noen konvensjonelle medier eller middel er uforenlig med de terapeutiske preparatene, er dens anvendelse i terapeutiske preparater overveid. Supplerende aktive ingredienser kan også bli innlemmet i preparatene.

[0148] Utgangsmengden av (6R)-L-erythro-tetrahydrobiopterin anvendt for å fremstille formuleringen kan, for eksempel, være i området fra omtrent 30 vekt% til omtrent 40 vekt% av formuleringen, eller i området fra omtrent 32 vekt% til omtrent 35 vekt%, eller om lag 33 vekt-%. Spesifikkke mengder BH4 i en formulering som er omtalt omfatter 80 mg, 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, og 500 mg.

[0149] Bindemidler bidrar til å opprettholde et fast formulering. I noen tilfeller brukes vannfri bindemidler for å bevare den vannfrie tilstanden av polymorfe former. I noen tilfeller kan bindemidlet virke som et tørkemiddel. Eksempelvis bindemidler innbefatter vannfritt dibasisk kalsiumfosfat og dets monohydrat. Andre ikke-begrensede eksempler på bindemidler som er nyttige i et preparat som beskrevet her inkluderer gummitragant, akasia, stivelse, gelatin, og biologiske nedbrytbare polymerer slik som homo- eller ko-polyestere av dikarboksylysyrer, alkylenglykoler, polyalkylenglykoler og/eller alifatiske hydroksylkarboksylysyrer; homo- eller ko-polyamider av dikarboksylysyrer, alkylendiaminer, og/eller alifatiske aminokarboksylysyrer; tilsvarende polyester-polyamid-kopolymerer, polyanhydrid, polyortoestere, polyfosfazen og polykarbonater. De biologiske nedbrytbare polymerene kan være lineære, forgrenede eller kryssbundet. Spesifikkke eksempler er polyglykolsyre, polymelkesyre og poly-D,L-lactid/-glykolid. Andre eksempler på polymerer er vannløselige polymerer som polyoksalkylen, (polyoksaetylen, polyoksapropylen og blandede polymerer derav, polyakrylamider og

hydroksylalkylerte polyakrylamider, polymaleinsyre og estere eller amider derav, polyakrylsyre og estere eller amider derav, polyvinylalkohol og estere eller etere derav, polyvinylimidazol, polyvinylpyrrolidon, og naturlige polymerer som kitosan.

[0150] Oppløsningsmidler hjelper til ved rask oppløsning av faste formuleringer ved å absorbere vann og utvide seg. Eksempler på oppløsningsmidler innbefatter polyvinylpyrrolidon (PVP, f.eks. solgt under navnet POVIDON), en kryssbundet form av povidon (CPVP f.eks. solgt under navnet CROSPVIDON), en kryssbundet form av natriumkarboksymetylcellulose (NaCMC, f.eks. solgt under navn AC-DI-SOL), andre modifiserte celluloser, og modifisert stivelse. Tabletter formulert med CPVP viser mye raskere oppløsning enn tabletter formulert med PVP.

[0151] Antioksidanter kan inkluderes og bidrar til å stabilisere tetrahydrobiopterin produktet, spesielt etter løsning. Vandige løsninger av API med lav pH er mer stabile enn løsninger med nøytral eller høy pH. Antioksidanter er inkludert i en formulering som er beskrevet her for å hindre forringelse fra oksidering. Antioksidanter kan generelt klassifiseres i 3 grupper.

[0152] Den første gruppe er kjent som sann antioksidanter, og hemmer oksidasjon ved å reagere med frie radikaler og blokkere kjedereaksjonen. Eksempler innbefatter fenoliske antioksidanter, inkludert butylterhydroksyanisol (BHA), butylterhydroksytoluen (BHT), tert-butylhydrokinon (TBHQ), 4-hydroksymetyl-2,6-di-tert-butylfenol (HMBP), og 2,4,5-trihydroksybutyrofenon (THBP); alkygallater, inkludert propylgallat, gallesyre, nordihydroguaiaretinsyre, og tokoferoler, inkludert alfa-tokoferol.

[0153] Den andre gruppen bestående av reduksjonsmidler, har lavere redox potensialer enn legemidlet som de er ment å beskytte, og oksideres derfor lettere. Reduksjonsmidler kan også virke ved å reagere med frie radikaler. Eksempler inkluderer askorbinsyre, tioglykolsyre (TGA), askorbylpalmitat, sulfitter, inkludert kalium- og natriumsalter av svovelsyring (f.eks. kaliumsulfitt, natriumsulfitt, natrium-metabisulfitt, og natriumbisulfitt), og tioglyserol.

[0154] Den tredje gruppe består av antioksidantsynergister som vanligvis har en beskjeden antioksidant effekt selv, men som sannsynligvis forbedrer virkningen av antioksidanter i den første eller andre gruppe ved omsetning med tunge metallioner som katalyserer oksidasjon. Eksempler på slike antioksidantsynergister og kelateringsmidler inkluderer sitronsyre, eplesyre, editinsyre og dens salter, lecitin, og vinsyre.

[0155] Eksempelvis sure antioksidanter omfatter askorbinsyre, fettsyreestere av askorbinsyre som askorbylpalmitat og askorbylstearat, og salter av askorbinsyre så som natrium-, kalsium-, eller kaliumaskorbat. Syrefri antioksidanter kan også anvendes i de stabile tablettformuleringene. Ikke-begrensede eksempler på ikke-sure antioksidanter omfatter beta-karoten, alfa-tokoferol. Sure additiver kan tilsettes for å forbedre stabiliteten av tablettformuleringen, herunder sitronsyre eller eplesyre. Småmolekylære antioksidanter omfatter, men er ikke begrenset til tioler, f.eks. cystein, N-acetylcystein, glutathion osv. eller tiolpolymerer (polymer-SH), f.eks. polykarbofilcystein polymetakrylsyre-SH, karboksymetylcellulose-cystein, osv. eller små-

molekylære antioksidanter slik som askorbinsyre, metionin, askorbylpalmitat, osv. Disse antioksidanter gir stabilitet til doseringsformen under transporten gjennom GIT, spesielt ettersom pH i GIT øker med avstanden fra magesekken.

[0156] I en utførelsesform er en kombinasjon av minst to reduksjonsmiddel-antioksidanter foretrukket. I en annen utførelsesform er en kombinasjon av minst to reduksjonsmiddel-antioksidanter sammen med en syre antioksidantsynergist og/eller kelateringsmiddel foretrukket.

[0157] Smøremidler forbedrer stabilitet, hardhet og ensartethet av faste formuleringer. Eksempelvis smøremidler innbefatter stearyl fumarat og magnesiumstearat. Andre ikke-begrensede eksempler på smøremidler innbefatter naturlige eller syntetiske oljer, fett, voks eller fettsyresalter slik som magnesiumstearat.

[0158] Eventuelt kan stabile formuleringer ifølge oppfinnelsen også omfatte andre tilsetningsstoffer så som mannitol, hydroksylpropylcellulose, mikrokrySTALLinsk cellulose, eller andre ikke-reduserende sukker slik som sukrose, trehalose, melezitose, planteose og raffinose.

Reduserende sukker kan reagere med BH₄. Andre ikke-begrensede eksempler på nyttige eksipienser i et preparat som er beskrevet her inkluderer fosfater som dikalsiumfosfat.

[0159] Overflateaktivemidler for bruk i et preparat som er beskrevet her kan være anioniske, anioniske, amfoteriske eller nøytrale. Ikke-begrensede eksempler på overflateaktivemidler som er nyttige i en sammensetning som beskrevet her inkluderer lecitin, fosfolipider, oktylsulfat, decylsulfat, dodecylsulfat, tetradecylsulfat, heksadecylsulfat og oktadecylsulfat, Na-oleat eller Na-kaprat, 1-acylaminoetan-2-sulfonsyrer, slik som 1-oktanoylaminoetan-2-sulfonsyre, 1-dekanoylaminoetan-2-sulfonsyre, 1-dodekanoylaminoetan-2-sulfonsyre, 1-tetradekanoylaminoetan-2-sulfonsyre, 1-heksadekanoylaminoetan-2-sulfonsyre, og 1-oktadekanoylaminoetan-2-sulfonsyre, og taurokolinsyre og taurodeoksykolinsyre, gallsyrer og deres salter, slik som kolinsyre, deoksykolinsyre og natriumglycokolater, natriumkaprat eller natriumlaurat, natriumoleat, natriumlaurylsulfat, natriumcetylsulfat, sulfonert lakserolje og natriumdioktylsulfosuccinat, kokamidopropylbetain og laurylbetain, fettalkoholer, kolesteroler, glyserolmono-eller-distearat, glyserolmono-eller -dioleate og glyserolmono-eller -dipalmitat, og polyoksyetylenstearat.

[0160] Ikke-begrensede eksempler på søtstoffer som er nyttige i et preparat som er beskrevet her inkluderer sukrose, fruktose, laktose eller aspartam. Ikke-begrensede eksempler på smaksmidler for bruk i et preparat som er beskrevet her inkluderer peppermynte, vintergrønnolje eller fruktsmaker som kirsebær eller appelsinsmak. Ikke-begrensede eksempler på drasjeringsmaterialer for bruk i et preparat som er beskrevet her inkluderer gelatin, voks, skjellakk, sukker eller andre biologiske nedbrytbare polymerer. Ikke-begrensede eksempler på konserveringsmidler for anvendelse i et preparat beskrevet her inkluderer metyl- eller propylparabener, sorbinsyre, klorbutanol, fenol og timerosal.

[0161] BH₄ form kan også bli formulert som brusetablett eller pulver som løses i et vandig miljø for å gi en drikkeløsning. Sakte-frigjørende formuleringer kan også fremstilles for å

oppnå en kontrollert frigjøring av det aktive middel ved kontakt med kroppsvæsker i gastrointestinal tractus, og for å gi et vesentlig konstant og effektivt nivå av det aktive middel i blodplasma. Krystallformen kan, for dette formål, være innesluttet i en polymer matriks av en biologisk nedbrytbar polymer, en vannløselig polymer eller en blanding av begge, og eventuelt
 5 egnede overflateaktive stoffer. Innesluttet kan, i denne sammenhengen, bety inkorporering av mikropartikler i en matrise av polymerer. Kontrollert frigjøringsformuleringer kan også oppnås ved innkapsling av dispergerte mikropartikler eller emulgerte mikrodråper via kjente dispergerings- eller emulgeringsteknologi.

[0162] BH4 anvendt i et preparat som beskrevet her er fortrinnsvis formulert som et dihydrokloridsalt, imidlertid er det overveid at andre saltformer av BH4 besitter den ønskede biologiske aktivitet, og følgelig kan andre saltformer av BH4 anvendes. Spesielt er BH4 salter med uorganiske eller organiske syrer foretrukket. Ikke-begrensede eksempler på alternative BH4 salt former omfatter BH4 salter av eddiksyre, sitronsyre, oksalsyre, vinsyre, fumarsyre, og mandelsyre.

[0163] Farmasøytisk akseptable baseaddisjonssalter kan dannes med metaller eller aminer, slik som alkali-og jordalkalimetaller eller organiske aminer. Farmasøytisk akseptable salter av forbindelsene kan også fremstilles med et farmasøytisk akseptabelt kation. Egnede farmasøytisk akseptable kationer er velkjente for fagfolk innen teknikken og omfatter alkalier, alkalisk jord, ammonium-og kvaternære ammonium-kationer. Karbonater eller hydrogenkarbonater er også mulig. Eksempler på metaller som brukes som kationer er natrium, kalium, magnesium, ammonium, kalsium, eller jern og lignende. Eksempler på egnede aminer inkluderer isopropylamin, trimetylamin, histidin, N,N'dibenzyletylenediamin, klorprokain, kolin, dietanolamin, disykloheksylamin, etylendiamin, N-metylglukamin, og prokain.

[0164] Farmasøytisk akseptable syreaddisjonssalter innbefatter uorganiske eller organiske syresalter. Eksempler på egnede syresalter inkluderer hydroklorider, acetater, citrater, salicylater, nitrater, fosfater. Andre egnede farmasøytisk akseptable salter er velkjent for fagfolk innen teknikken og inkluderer for eksempel, eddiksyre, sitronsyre, oksalsyre, vinsyre, eller mandelsyre, saltsyre, hydrobromsyre, svovelsyre eller fosforsyre; med organisk karboksyl-, sulfon-, sulfo- eller fosforyler eller N-substituert sulfaminsyre, for eksempel
 25 eddiksyre, propionsyre, glykolsyre, ravsyre, maleinsyre, hydroksymaleinsyre, metylmaleinsyre, fumarsyre, eplesyre, vinsyre, melkesyre, oksalsyre, glukonsyre, glukarinsyre, glukuronsyre, sitronsyre, benzoesyre, kanelisyre, mandelsyre, salisylsyre, 4-aminosalisylsyre, 2-fenoksybenzoesyre, 2-acetoksybenzoesyre, emboninsyre, nikotinsyre eller isonikotinsyre, og med aminosyrer, slik som de 20 alfa-aminosyrene involvert i syntesen av proteiner i naturen, for
 35 eksempel glutaminsyre eller asparaginsyre, og også med fenyleddiksyre, metansulfonsyre, etansulfonsyre, 2-hydroksyetansulfonsyre, etan-1,2-disulfonsyre, benzensulfonsyre, 4-metylbenzenesulfonsyre, 2-naftalensulfonsyre, 1,5-naftalendisulfonsyre, 2- eller 3-fosfoglycerat, glukose-6-fosfat, N-sykloheksylsulfaminsyre (med dannelse av syklamater), eller med andre sure organiske forbindelser, som for eksempel askorbinsyre.

[0165] Eksempelvis stabile orale formuleringer inneholder en eller flere av de følgende ytterligere bestanddeler som forbedrer stabiliteten eller andre egenskaper av formuleringen: bindemiddel, desintegreringsmiddel, sur antioksidant, eller smøremiddel eller kombinasjoner derav. Eksempelvis stabile tablettformuleringene inkluderer et bindemiddel og desintegrasjonsmiddel, eventuelt med en sur antioksidant, og eventuelt videre omfatter et smøremiddel. Eksempelvis konsentrasjoner av bindemidlet er mellom omtrent 1 vekt% til omtrent 5 vekt%, eller mellom omtrent 1,5 og 3 vekt%, et eksempelvis vektforhold av bindemiddel til BH4 er i området fra omtrent 1:10 til omtrent 1:20. Eksempelvis konsentrasjoner på disintegrasjon agenten er mellom omtrent 1 vekt% til omtrent 20 vekt%, en eksempelvis vektforhold av desintegrasjonsmiddel BH4 er i området fra omtrent 01:05 til omtrent 01:10. Eksempelvis konsentrasjoner av antioksidant er mellom omtrent 1 vekt% og omtrent 3 vekt%, et eksempelvis vektforhold av antioksidant til BH4 er i området fra omtrent 01:05 til 1:30. I ett eksempel, er askorbinsyre antioksidanten og brukes i et forhold til BH4 på mindre enn 1:01, 1:2 f.eks. eller mindre, eller 01:10 eller mindre. Eksempelvis konsentrasjoner av smøremiddel i en stabil tablettformulering av foreliggende oppfinnelse er mellom omtrent 0,1 vekt% og omtrent 2 vekt%, en eksempelvis vektforhold av smøremiddel til BH4 er i området fra omtrent 01:25 til 1:65.

[0166] Den stabile fast stoff formulering kan eventuelt inkludere andre terapeutiske midler egnet for tilstanden som skal behandles, f.eks. folater, inkludert folat-forstadier, folinsyrer, eller folat derivater, og/eller arginin, og/eller vitaminer, slik som vitamin C og/eller vitamin B2 (riboflavin) og/eller vitamin B 12, og/eller nevrotransmitter-forstadier slik som L-dopa eller karbidopa, og/eller 5-hydroksytryptofan.

[0167] Eksempelvis folater inkludert folat forstadier, folinsyrer, eller folat derivater, er beskrevet i US patentene nr. 6.011.040 og 6.544.994, og inkluderer folsyre (pteroylmonoglutamat), dihydrofolinsyre, tetrahydrofolinsyre, 5-metyltetrahydrofolinsyre, 5,10-metylene-tetrahydrofolinsyre, 5,10-methenyltetrahydrofolinsyre, 5,10-formiminotetrahydro-folsyre, 5-formyltetrahydrofolinsyre (leukovorin), 10-formyltetrahydrofolinsyre, 10-metyltetrahydrofolinsyre, ett eller flere av folylpolyglutamater, forbindelser hvor pyrazinringen i den pterine enheten av folsyre eller av folylpolyglutamater er redusert til å gi dihydrofolater eller tetrahydrofolater, eller derivater av alle de foregående forbindelser hvor N-5 eller N-10 posisjoner bærer en karbon-enheter med ulike nivåer av oksidasjon, eller farmasøytisk kompatible salter derav, eller en kombinasjon av to eller flere derav. Eksempelvis tetrahydrofolater inkluderer 5-formyl-(6S)-tetrahydrofolsyre, 5-metyl-(6S)-tetrahydrofolsyre, 5,10-metylen-(6R)-tetrahydrofolsyre, 5,10-methenyl-(6R)-tetrahydrofolsyre, 10-formyl-(6R)-tetrahydrofolsyre, 5-formimino-(6S)-tetrahydrofolsyre eller (6S)-tetrahydrofolsyre, og farmasøytisk akseptable salter derav. Eksempelvis salter omfatter natrium, kalium, kalsium eller ammonium salter.

[0168] Eksempelvis relative vektforhold av BH4 til folater til arginin kan være fra omtrent 1:10:10 til omtrent 10:01:01.

[0169] De stabile formuleringene ifølge oppfinnelsen kan være anordnet, for eksempel som tabletter eller piller eller kapsler i HDPE flasker forsynt med en desikkant kapsel eller pose, eller i folie-på-folie blisterpakning, eller i blisterpakning omfattende gjennomsiktig polymerfilm, hvis kommersielt ønskelig.

5 IV. Behandling av BH4-Responsive sykdommer

Hyperfenylalaninemia, Nevropsykologiske eller nevropsykiatriske lidelser

[0170] Forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan anvendes for behandling av tilstander forbundet med forhøyede fenylalaninnivåer eller reduserte tyrosin eller tryptofan nivåer, som for
 10 eksempel kan forårsakes av redusert fenylalaninhydroksylase, tyrosinhydroksylase, eller tryptofanhydroksylase aktivitet. Forhold knyttet til forhøyede fenylalaninnivåer inkluderer spesifikt fenylketonuri, både mild og klassisk, og hyperfenylalaninemia som beskrevet her, og eksempelvis pasientgrupper inkluderer undergrupper av pasienter som er beskrevet her, så vel som enhver annen pasient som viser fenylalaninnivået over normalen.

15 [0171] Forhold knyttet til reduserte tyrosin eller tryptofan nivåer, inkluderer neurotransmittermangel, nevrologiske og psykiatriske sykdommer som Parkinsons, dystoni, spinocerebellar degenerasjon, smerte, tretthet, depresjon, andre affektive lidelser og schizofreni. NO-overproduksjon av nNOS har vært implisert i slag, migrene hodepine, Alzheimers sykdom, og med toleranse til, og avhengighet av, morfin. BH4 kan gis for noen av disse forholdene. Andre
 20 eksempelvis nevropsykiatriske lidelser hvor BH4 kan administreres omfatter Parkinsons sykdom, Alzheimers sykdom, schizofreni, schizofreniform psykose, schizoaffektiv forstyrrelse, kort psykotisk lidelse, vrangforestillingslidelse, delte psykotisk lidelse, psykotisk lidelse på grunn av en generell medisinsk tilstand, substans-indusert psykotisk lidelse, andre psykotiske lidelser, tardive dyskinesier, Machado-Joseph sykdom, spinocerebellær
 25 degenerasjon, spinocerebellær ataksi, dystoni, kronisk utmattelsessyndrom, akutt eller kronisk depresjon, kronisk stress syndrom, fibromyalgi, migrene, ADHD "attention deficit hyperactivity disorder", bipolar sykdom, og autisme.

[0172] De stabile formuleringene kan også anvendes for behandling av pasienter som lider av BH4-mangel, f.eks. på grunn av en feil i dens syntesevei, inkludert men ikke begrenset til
 30 doparesponsiv dystoni (DRD), sepiapterinreduktase (SR)-mangel, eller dihydropteridine-reduktase (DHPR) mangel.

[0173] Egnede individer for behandling med de stabile formuleringene ifølge oppfinnelsen omfatter individer med forhøyet plasma Phe konsentrasjon i fravær av det terapeutiske, f.eks. høyere enn 1800 $\mu\text{M/l}$, eller høyere enn 1,600 μM , høyere enn 1400 μM , høyere enn 1200
 35 μM , høyere enn 1000 μM , høyere enn 800 μM , eller høyere enn 600 μM , høyere enn 420 μM , høyere enn 300 μM , høyere enn 200 μM , eller høyere enn 180 μM . Mild PKU er generelt klassifisert som plasma Phe konsentrasjoner opp til 600 $\mu\text{M/l}$, moderat PKU som plasma Phe

konsentrasjoner på mellom 600 $\mu\text{M/l}$ til omtrent 1200 $\mu\text{M/l}$ og klassisk eller alvorlig PKU som plasma Phe konsentrasjoner som er høyere enn 1200 $\mu\text{M/l}$. Fortrinnsvis senker behandling med de stabile formuleringene alene eller med protein-diett plasma fenylalanin konsentrasjonen av individet til lavere enn 600 μM , eller lavere enn 500 μM , eller 360 $\mu\text{M} \pm$ 15 μM eller lavere, eller lavere enn 200 μM , eller lavere enn 100 μM . Andre egnede individer omfatter individer diagnostisert med en redusert fenylalaninhydroksylase (PAH) aktivitet, atypisk eller ondartet fenylketonuri tilknyttet BH4 mangel, hyperfenylalaninemia assosiert med leversykdom, og hyperfenylalaninemia assosiert med malaria. Redusert PAH aktivitet kan resultere fra en mutasjon i PAH enzymet, for eksempel en mutasjon i det katalytiske domenet av PAH eller én eller flere mutasjoner valgt fra gruppen bestående av F39L, L48S, I65T, R68S, A104D, S110C, D129G, E178G, V190A, P211T, R241C, R261Q, A300S, L308F, A313T, K320N, A373T, V388M E390G, A395P, P407S, og Y414C, eller individer som er gravide kvinner, kvinner i fruktbar alder som planlegger å bli gravide, eller barn mellom 0 og 3 år, eller 0-2, 0-1,5 eller 0-1, eller individer diagnostisert som ikke-responder i løpet av 24 timer etter en enkelt-dose BH4 belastningstest eller en flerdosestudie belastningstest, slik som en 4-doser eller 7-dagers belastningstest. Eksempelvis pasientgrupper og eksempelvis BH4 belastningstester er beskrevet i Int'l. Publikasjon nr. WO 2005/049000.

[0174] U.S. patenter nr. 4.752.573, 4.758.571, 4.774.244, 4.920.122, 5.753.656; 5.922.713; 5.874.433; 5.945.452; 6.274.581; 6.410.535; 6.441.038, 6.544.994 og US-patent publikasjoner US 20020187958, US 20020106645, US 2002/0076782, US 20030032616 hver beskriver fremgangsmåter for å administrere BH4 preparater for ikke-PKU behandlinger. Hver av disse patentene gir en generelle undervisning i fremgangsmåter for å administrere BH4 preparater kjent for fagfolk innen teknikken, som kan være tilpasset til behandlingen som beskrevet her.

[0175] Mens individuelle behov varierer er bestemmelse av optimal områder av effektive mengder av hver komponent fagmessig. Typiske doser av BH4 omfatter omtrent 1 til omtrent 20 mg/kg kroppsvekt per dag, som vanligvis vil utgjøre omtrent 5 (1 mg/kg x 5 kg kroppsvekt) til 3000 mg/dag (30mg/kg x 100 kg kroppsvekt). Mens kontinuerlig daglig administrering overveies, kan det for HPA være ønskelig å stanse BH4-terapien når symptomene på Phe nivåene er redusert til under et visst terskelnivå. Selvsagt kan behandlingen gjenopptas i tilfelle at Phe nivået stiger igjen. Passende doser kan fastslås ved bruk av etablerte analyser for bestemmelse blodnivåer av Phe sammen med relevante doseresponsdata.

[0176] I eksempelvis utførelsesformer, er det overveiet at metodene ifølge foreliggende oppfinnelse vil gi til en pasient med behov derav, en daglig dose på mellom omtrent 10 mg/kg til omtrent 20 mg/kg av BH4. Selvfølgelig kan en fagperson på området justere denne dose opp eller ned avhengig av effekten som blir oppnådd ved administrasjonen. Den daglige dosen kan bli administrert i en enkelt dose eller kan administreres i flere doser med praktisk fordelte intervaller. I eksempelvis utførelsesformer, kan den daglige dose være 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 16 mg/kg, 17 mg/kg, 18 mg/kg, 19 mg/kg, 20 mg/kg,

22 mg/kg, 24 mg/kg, 26 mg/kg, 28 mg/kg, 30 mg/kg, 32 mg/kg, 34 mg/kg, 36 mg/kg, 38 mg/kg, 40 mg/kg, 42 mg/kg, 44 mg/kg, 46 mg/kg, 48 mg/kg, 50 mg/kg, eller fler mg/kg.

Lav dose regimer

[0177] I en lav-dose terapeutisk metode ifølge oppfinnelsen, er lave doser, f.eks. doser på 0,1 til 5 mg/kg per dag påtenkt, inkludert doser på 0,1 til 2 mg/kg, eller 0,1 til 3 mg/kg, eller 1 mg/kg til 5 mg/kg. Dosere mindre enn 5 mg/kg per dag er foretrukket. Ifølge oppfinnelsen forventes slike doser å gi forbedringer med relevante studieendepunkter og BH₄-derivater forventes å ha forbedrede biologiske egenskaper i forhold til naturlig BH₄ ved slike doser. I særdeleshet overveier oppfinnelsen at ethvert av l',2'-diacyl-(6R, S)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopteriner eller lipoidet tetrahydrobiopteriner beskrevet her utviser forbedrede biologiske egenskaper ved lave doser.

[0178] Oppfinnelsen overveier også spesielt anvendelsen av BH₄, eller et forstadium eller derivat derav til behandling av BH₄-responsive sykdommer i en dose i området fra 0,1 til 5 mg/kg kroppsvekt/dag, via enhver tilførselsvei inkludert men ikke begrenset til oral administrasjon, i én daglig dose eller multiple (f.eks. 2, 3 eller 4) oppdelte doser per dag, for en varighet på minst 1, 2, 3 eller 4 uker eller lenger, eller 1, 2, 3, 4, 5, 6 måneder eller lenger. Eksempelvis doser inkluderer mindre enn 5 mg/kg/dag, 4,5 mg/kg/dag eller mindre, 4 mg/kg/dag eller mindre, 3,5 mg/kg/dag eller mindre, 3 mg/kg/dag eller mindre, 2,5 mg/kg/dag eller mindre, 2 mg/kg/dag eller mindre, 1,5 mg/kg/dag eller mindre, 1 mg/kg/dag eller mindre, eller 0,5 mg/kg/dag eller mindre. Ekvivalente doser per kroppsoverflate er også påtenkt.

[0179] For den person med gjennomsnittlig vekt/kroppsoverflate (f.eks. 70 kg) overveier oppfinnelsen også en total daglig dose på mindre enn 400 mg. Eksempler på slike totale daglige doser inkluderer 360 mg/dag, 350 mg/dag, 300 mg/dag, 280 mg/dag, 210 mg/dag, 180 mg/dag, 175 mg/dag, 150 mg/dag, eller 140 mg/dag. For eksempel er 350 mg/dag eller 175 mg/dag lett administrerbart med en oral doseringsformulering på 175 mg en eller to ganger per dag. Andre eksempelvis totale daglige doser inkluderer 320 mg/dag eller mindre, 160 mg/dag eller mindre, eller 80 mg/dag eller mindre. Slike doser er lett administrerbare med en oral doseringsformulering på 80 eller 160 mg. Andre eksempelvis totale daglige doser på 45, 90, 135, 180, 225, 270, 315 eller 360 mg/dag eller mindre er lett administrerbare med en oral doseringsformulering på 45 eller 90 mg. Ennå andre eksempelvis totale daglige doser inkluderer 60, 120, 180, 240, 300, eller 360 mg/dag, som lett administreres med en oral doseringsformulering på 60 eller 120 mg. Andre eksempelvis totale daglige doser inkluderer 70, 140, 210, 280, eller 350 mg/dag, lett administrerbare med en oral doseringsformulering på 70 eller 140 mg. Eksempelvis totale daglige doser inkluderer også 55, 110, 165, 220, 275 eller 330 mg/dag, lett administrerbart med en oral doseringsformulering av 55 mg. Andre eksempelvis totale daglige doser inkluderer 65, 130, 195, 260, eller 325 mg/dag, eller 75, 150, 225, 300 eller 375 mg/dag, f. eks. i doseringsformuleringer på 65 mg eller 75 mg.

[0180] Det er underforstått at den passende dose av en sammensetning ifølge foreliggende oppfinnelse vil avhenge av alder, helse og vekt av mottakeren, formen for samtidig behandling, hvis noen, hyppigheten av behandling og arten av den ønskede effekt (dvs. mengden reduksjon i plasma Phe konsentrasjon ønsket). Frekvensen av dosering er også
5 avhengig av farmakodynamiske effekter på Phe nivåer, hvis effekten varer i 24 timer fra en enkelt dose. Imidlertid kan den mest foretrukne dosering tilpasses det enkelte individer, som forstås og kan bestemmes av en av fagpersonen uten unødig eksperimentering. Dette omfatter typisk justering av en standard dose, f.eks. å redusere dosen hvis pasienten har en lav kroppsvekt.

[0181] Hyppigheten av BH4 dosering vil avhenge av farmakokinetiske parametere til midlet og administrasjonsveiene. Den optimale farmasøytisk formuleringen vil bestemmes av en fagperson avhengig av administreringsmåten og den ønskede dosering. Se for eksempel Remingtons Pharmaceutical Sciences, 18. Utg. (1990, Mack Publ. Co, Easton PA 18042) ss. 1435-1712. Slike formuleringer kan påvirke den fysiske tilstand, stabilitet, hastighet av *in vivo* frigjøring og hastighet av *in vivo* clearance av administrerte midler. Avhengig av
15 tilførselsvei kan en passende dose beregnes i henhold til kroppsvekt, kroppsoverflater eller organstørrelse. Videreutvikling av beregningene nødvendig for å bestemme den riktige behandlingsdose gjøres rutinemessig av en fagperson på området uten unødig eksperimentering, spesielt i lys av den doseringsinformasjonen og analysene beskrevet her så vel som de farmakokinetiske data observert i dyr eller humane kliniske studier.

[0182] Det endelige doseringsregimet vil bli bestemt av den behandlende lege som tar hensyn til faktorer som modifierer virkningen av legemidler, f.eks. legemidlets spesifikk aktivitet, alvorlighetsgrad av skaden og mottageligheten til pasienten, alderen, tilstand, kroppsvekt, kjønn og diett av pasienten, alvorligheten av eventuelle infeksjoner, tidspunkt for
25 administrasjon og andre kliniske faktorer. Ettersom studier utføres, vil ytterligere informasjon dukke opp vedrørende riktig doseringsnivåer og varighet av behandling for spesifikke sykdommer og tilstander.

V. Kombinasjonsbehandling

[0183] Visse anvendelser av oppfinnelsen involverer den kombinerte anvendelsen av de stabile formuleringene ifølge oppfinnelsen og en eller flere andre terapeutiske midler.
30

[0184] I slik kombinasjonsbehandling kan administrasjon av de stabile formuleringene ifølge oppfinnelsen være sammenfallende med, eller gå forut for eller etterfølger administrering av det andre terapeutiske middel, f. eks. ved intervaller som strekker seg fra minutter til timer, så lenge begge midler er i stand til å utøve sin terapeutiske effekt ved overlappende tidsperioder.
35 Således overveier oppfinnelsen anvendelse av de stabile formuleringene ifølge oppfinnelsen med et andre terapeutisk middel. Oppfinnelsen overveier også bruk av et andre terapeutisk

middel i fremstilling av et medikament for administrasjon med det stabile tetrahydrobiopterinet, forstadier, derivater eller analoge formuleringer ifølge oppfinnelsen.

[0185] Tetrahydrobiopterin-terapi kan kombineres med proteinbegrensning av kosten for å bevirke et terapeutisk resultat hos pasienter med forskjellige former for HPA. For eksempel kan man administrere til individet BH4-preparatet og et medisinsk lav-fenylalanin-proteinpreparat i en kombinert mengde som er effektiv til å gi det ønskede terapeutiske resultat (dvs. en senkning av plasma Phe konsentrasjon og/eller evne til å tolerere større mengder av Phe/proteininntak uten å produsere en samtidig økning av plasma Phe konsentrasjoner). Denne prosessen kan innebære administrering av BH4-preparatet og det terapeutiske kostproteinpreparatet samtidig. Dette kan oppnås ved administrering av en enkelt sammensetning eller farmakologisk proteinformulering som inkluderer hele proteinbehovet i kosten og som også omfatter BH4 i nevnte proteinformulering. Alternativt tas kostproteinet (supplement eller normalt proteinmåltid) på omtrent samme tid som en farmakologisk formulering (tablett, injeksjon eller drikke) av BH4.

[0186] I noen utførelsesformer er den proteinbegrensede dietten en som er supplert med aminosyrer, slik som tyrosin, valin, isoleucin og leucin. Pasienten kan koadministreres med et lav-Phe proteintilskudd, som kan omfatte L-tyrosin, L-glutamin, L-carnitin ved en konsentrasjon på 20 mg/100 g supplement, L-aurin ved en konsentrasjon på 40 mg/100 g supplement og selen. Supplementet kan videre omfatte de anbefalte daglige doser av mineraler, f. eks, kalsium, fosfor og magnesium. Supplementet kan videre omfatte den anbefalte daglige dosen av en eller flere aminosyrer valgt fra gruppen bestående av L-leucin, L-prolin, L-lysinacetat, L-valin, L-isoleucin, L-arginin, L-alanin, glycin, L-asparaginmonohydrat, L-tryptofan, L-serin, L-treonin, L-histidin, L-metionin, L-glutaminsyre, og L-asparaginsyre. I tillegg kan supplementet styrkes med den anbefalte daglige dose av vitaminer A, D og E. Eventuelt omfatter supplement et fettinnhold som tilveiebringer minst 40 % av energien av supplementet. Slike kosttilskudd kan tilveiebringes i form av et pulver supplement eller i form av en proteinplate. I visse utførelsesformer omfatter proteinbegrenset diett et proteintilskudd og BH4 er tilveiebragt i samme sammensetning som proteintilskuddet.

[0187] I andre alternativer kan BH4-behandling gå forut for eller etterfølge kost-protein-terapien ved intervaller som strekker seg fra minutter til timer. I utførelsesformer hvor proteinet og BH4-preparatene administreres separat, ville man generelt sørge for at en betydelig tidsperiode ikke løper mellom tidspunktet for hver levering, slik at BH4 fortsatt vil være i stand til å utøve en fordelaktig effekt på pasienten. I slike tilfeller er det påtenkt at man ville administrere BH4 innen omtrent 2-6 timer (før eller etter) proteininntaket, for eksempel med en forsinkelse på bare omtrent 1 time eller mindre. I visse utførelsesformer er det overveiet at BH4-terapien vil være en kontinuerlig terapi hvor en daglig dose av BH4 administreres til pasienten på ubestemt tid. I andre situasjoner, f.eks. hos gravide kvinner som bare har mildere former for PKU og HPA, kan det være at BH4-terapien bare fortsettes så lenge kvinnen er gravid og/eller ammer.

[0188] Videre, i tillegg til behandling basert utelukkende på levering av BH4 og protein regulering av kosten, påtenker anvendelsene ifølge foreliggende oppfinnelse også kombinasjonsbehandling med et tredje preparat som spesifikt retter seg mot en eller flere av symptomene på HPA. For eksempel er det kjent at underskuddet av tyrosin forårsaket av HPA resulterer i en mangel på nevrotransmitterne dopamin og serotonin. Dermed forventes det, i sammenheng med den foreliggende oppfinnelse, at BH4 og proteintilskudd baserte metoder videre vil kunne kombineres med administrering av L-dopa, karbidopa og 5-hydroksytryptophan nevrotransmittere for å korrigere defekter som følge av reduserte mengder tyrosin i kostholdet.

[0189] I tillegg har genterapi med både PAH (Christensen et al., Mol.Gent. And Metabol. 76: 313-318, 2002; Christensen et al, Gene Therapy, 7:1971-1978, 2000) og fenylalanin ammoniumlyase (PAL Liu et al, Arts. Cells. Blood. Subs and Immob. Biotech. 30 (4) 243-257, 2002) har vært overveid av fagpersoner. Slike genterapi-teknikker kunne anvendes i kombinasjon med de kombinerte BH4/kostproteinbegrensningsbaserte-terapien ifølge oppfinnelsen. I ytterligere kombinasjonsterapier forventes det at fenylase kan tilveiebringes som et injiserbart enzym for å ødelegge lavere Phe konsentrasjoner i pasienten. Fordi administrering av fenylase ikke ville generere tyrosin (i motsetning administrering av PAH), vil en slik behandling fortsatt resultere i at tyrosin være en essensiell aminosyre for slike pasienter. Derfor kan kosttilskudd med tyrosin være ønskelig for pasienter som får fenylase i kombinasjon med BH4-terapi.

[0190] BH4 kan ko-administreres ved nevropsykologiske eller nevropsykiatriske lidelser i henhold til fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen med en eller flere andre nevropsykiatrisk aktive midler, inkludert antidepressiva, nevrotransmitter forstadier som tryptofan, tyrosin, serotonin, midler som aktiverer noradrenerge systemer, slik som lofepramin, desipramin, reboxetin, tyrosin, midler som virker fortrinnsvis på serotonin, kombinert hemmere av både noradrenalin- og serotonin-opptak, slik som venlafaksin, duloksetin eller milnacipran eller medikamenter som er kombinerte hemmere av både dopamin og noradrenalin gjenopptak slik som bupropion.

[0191] I en beslektet utførelsesform administreres BH4 med andre terapeutiske midler som vanligvis anvendes for å behandle diabetes, vaskulær sykdom, hyperlipidemi. Midler som anvendes til å behandle diabetes, inkludere men ikke begrenset til midler som forbedrer insulinfølsomheten som PPAR gamma ligander (thiazolidindioner, glitazoner, troglitazoner, rosiglitazon (Avandia), pioglitazon), stimulatorer av insulinsekresjon som sulfonylurea-preparater (gliquidon, tolbutamid, glimepride, klorpropamid, glipizid, glyburid, acetoheksamid) og meglitinider (meglitinid, repaglinid, nateglinid) og midler som reduserer leverens produksjon av glukose som metformin. Middel som anvendes til å behandle vaskulær sykdom, omfatter men er ikke begrenset til endotelinreseptorantagonister som vanligvis anvendes til behandling av hypertensjon og andre endotelialdysfunksjon-relaterte lidelser, for eksempel bosentan, darusentan, enrasentan, tezosentan, atrasentan, ambrisentan, sitaxsentan,

glatt-muskelavslappende midler som PDE5-hemmere (indirekte-fungerende) og minoxidil (direkte-fungerende); angiotensin converting enzyme (ACE)-hemmere som kaptopril, enalapril, lisinopril, fosinopril, perindopril, quinapril, trandolapril, benazepril, ramipril, angiotensin-II-reseptorblokkere som irbesartan, losartan, valsartan, eprosartan, olmesartan, kandesartan, telmisartan, betablokkere som atenolol, metoprolol, nadolol, bisoprolol, pindolol, acebutolol, betaxolol, propranolol, diuretika slik som hydroklortiazid, furosemid, torsemid, metolazon; kalsiumkanalblokkere som amlodipin, felodipin, nisoldipin, nifedipin, verapamil, diltiazem, alpha-reseptorblokkere doxazosin, terazosin, alfuzosin, tamsulosin, og sentrale alfa-agonister som klonidin. Midler som anvendes til å behandle hyperlipidemi, inkluderer men er ikke begrenset til midler som senker LDL slike som statiner (atorvastatin, fluvastatin, lovastatin, pravastatin, rosuvastatin-kalsium, simvastatin) og nikotinsyre, kolesterylester-transfer-protein-hemmere (som torcetrapib), midler som stimulerer PPAR-alpha som fibrater, gemfibrozil, fenofibrat, bezafibrat, ciprofibrate, midler som binder og hindre reabsorpsjon av gallesyrer og redusere kolesterolnivået som gallesyrekompleksdannere kolestyramin og kolestipol, og kolesterolabsorpsjonshemmere.

[0192] BH4 kan også administreres med en faktor eller kombinasjon av faktorer som forbedrer eller normaliserer produksjonen av vasodilatoren nitrogenoksid (NO) alene eller i kombinasjon med et terapeutisk middel. I en utførelsesform forbedrer slik(e) faktor(er) aktiviteten eller uttrykket *de novo* biosyntesen av BH4 og er valgt fra gruppen bestående av guanosin-trifosfatsyklohydrolase I (GTPCHI), 6-pyruvoyltetrahydropterinsyntase (PTP) og sepiapterin-reduktase. I en foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen økes BH4 syntese ved å øke ekspresjon av GTPCHI uttrykk ved bruk av en eller flere syklisk-adenosinmonofosfat (cAMP)-analoger eller agonister inkludert forskolin, 8-brom-cAMP eller andre midler som virker ved å øke cAMP-mediert celledisignalisering, for eksempel, cytokiner og vekstfaktorer inkludert interleukin-1, interferon-gamma (IFN- γ), tumor nekrosefaktor alfa (TNF- α), C-reaktivt protein, HMG-CoA- reductases (statiner som atorvastatin) nervevekstfaktor (NGF), epidermalvekstfaktor (EGF), hormoner inkludert adrenomedullin og østradiolbenzoat, og andre forbindelser slik som NADPH og NADPH-analoger, koffein, cyklosporin-A- metyl-xantiner inkludert 3-isobutyl-1-metyl-xantin, teofyllin, reserpin, hydrogenperoksyd.

[0193] En utførelse av oppfinnelsen angår derfor å øke GTPCHI ved å hemme nedbrytningen av 3'5'-sykliske nukleotider med hemmere av de elleve phosphodiesterases familiene (PDE1-11) inkludert PDE1, PDE3, PDE5. PDE-inhibitorer inkluderer ifølge foreliggende oppfinnelse Viagra/sildanefil, cialis/tadalafil vardenafil/levitra, udenafil, 8-metoksymetyl-IBMX, UK-90234, deksametason, hesperetin, hesperedin, irsogladin, vinpocetin, cilostamid, rolipram, etyl-beta-karbolin-3-karboksylat (beta-CCE), tetrahydro-beta-carbolin-derivater, 3-O-metyl-quercetin og lignende.

[0194] En annen utførelsesform av oppfinnelsen vedrører å øke nivåene av BH4 ved å øke nivåene av BH4-syntetisere enzymer etter genterapi eller endotel-målrettet levering av polynukleotider til synteseapparatet for BH4. Ennå en annen utførelsesform av oppfinnelsen

vedrører å øke nivåene av BH4 med tilskudd av BH4-syntetiserende enzymer GTPCHI, PTP, SR, PCD, DHPR og DHFR. Det er overveiet at BH4-syntetisere enzymer omfatter alle naturlige og unaturlige former av enzymene inkludert mutanter av proteinene.

[0195] En annen utførelsesform av oppfinnelsen vedrører å øke BH4 nivåer ved å lede substratet 7,8-dihydroneopterintrifosfat mot BH4-syntetiserende enzym PTP istedenfor alkalisk fosfatase (AP) ved å hemme AP-aktivitet. Midler eller forbindelser som hemmer aktiviteten av AP inkluderer fosfatanaloger, levamisole, og L-Phe. En annen utførelsesform av oppfinnelsen vedrører midler eller forbindelser som hemmer alkalisk fosfatase inkludert "small inhibitory RNA" (siRNA), antisens RNA, dsDNA, små molekyler, nøytraliserende antistoffer, enkeltkjedede, kimære, humaniserte og antistofffragmenter å inhibere syntesen av alkalisk fosfatase.

[0196] En annen utførelsesform av oppfinnelsen inkluderer midler eller forbindelser som øker aktiviteten av nødvendig katalysatorer eller kofaktorer for syntese av enzymer til de novo synteseveien av BH4 syntese.

[0197] En annen utførelsesform av oppfinnelsen inkluderer midler eller forbindelser som hindrer nedbrytning av enzymer som er nødvendig for syntese av BH4. Ennå en annen utførelsesform av oppfinnelsen inkluderer midler eller forbindelser som hindrer nedbrytning av katalysatorer som er nødvendig for syntese av BH4 og dens syntetiske enzymer inkludert GTPCHI, PTP og SR.

[0198] En annen utførelsesform av oppfinnelsen vedrører å øke nivåene av BH4 ved å øke reduksjonen av BH2 via bevaringsveien. *In vivo* blir BH4 oksidert til BH2. BH2 som eksisterer som den kinoide formen (qBH2) og som 7,8-dihydropterin som reduseres til BH4 av henholdsvis DHPR og DHFR. En utførelsesform av oppfinnelsen vedrører å øke regenerering eller bevaring av BH4 fra BH2 ved å modulere aktiviteten og syntesen av enzymene PCD, DHPR og DHFR ved bruk av midler eller forbindelser som veien NADPH, tioler, perklorkvikksølvbenzoat, hydrogenperoksid og lignende.

[0199] En annen utførelsesform av oppfinnelsen vedrører midler som stabiliserer BH4 ved å redusere oksidasjon av BH4 ved anvendelse av midler eller forbindelser slik som antioksidanter inkludert askorbinsyre (vitamin C), alfa-tokoferol (vitamin E), tokoferoler (f.eks. vitamin A), selen, beta-karotener, karotenoider, flavoner, flavonoider, folater, flavoner, flavanoner, isoflavoner, katekiner, antocyanidiner og chalkoner.

[0200] I en ytterligere utførelsesform kan (en) slik(e) faktor(er) øke aktiviteten eller ekspresjonen av nitrogenoksydsyntase og derved forbedre dannelsen av NO.

[0201] I nok en annen utførelsesform overveier oppfinnelsen faktorer som hemmer GTPCH feedback regulatorprotein, GFRP. En utførelsesform av oppfinnelsen vedrører midler eller forbindelser som hemmer bindingen av BH4 til GTPCHI/GFRP komplekset, og forhindrer derved feedback-hemming fra BH4. Midler eller forbindelsene ifølge denne oppfinnelse omfatter konkurrerende inhibitorer som alternative former av BH4 med endrede affiniteter for

de komplekse, strukturelle analoger etc. Enda en annen utførelsesform av oppfinnelsen inkluderer midler eller forbindelser som øker bindingen av L-fenylalanin til CTPCH1/GFRP for å indusere syntese av BH4. En annen utførelsesform av oppfinnelsen innbefatter midler eller forbindelser som øker nivåene av L-Phe som forstadier for L-Fenylalanin, som tjener til å

5 inhibere feedback-hemming av GTPCH1 fra GFRP og BH4.
[0202] Ennå en annen utførelsesform av oppfinnelsen vedrører midler eller forbindelser som modulerer aktiviteten eller syntesen av GFRP. En utførelsesform av oppfinnelsen inkluderer midler eller forbindelser som hemmer aktiviteten til GFRP. En annen utførelsesform av oppfinnelsen inkluderer bruken av siRNA, små molekyler, antistoffer, antistoff-fragmenter og

10 lignende til å inhibere syntesen av GFRP.

VI. Biopterinanalyser

[0203] Konsentrasjonen av total biopterin og oksidert biopterin i plasma, blod og annet vev fastsettes basert på metoden til Fukushima et al. (Anal. Biochem. 102:176 (1980)). Biopterin har fire forskjellige former, inkludert to former for redusert biopterin, R-tetrahydrobiopterin

15 (BH4) og kinonoid R-dihydrobiopterin (q-BH2) og to former for oksidert biopterin, dihydrobiopterin (BH2) og biopterin (B). Av disse fire formene, har bare reduserte former for biopterin coenzymatic aktivitet. Redusert biopterin omdannes til B ved jodylering under sure forhold, mens under alkaliske forhold blir det konvertert til pterin. Oksidert biopterin omdannes til B ved jodylering under sure og alkaliske forhold. Ved å utnytte denne

20 egenskapen bestemmes mengden av total biopterin ved jodylering under sure forhold, og den av oksidert biopterin bestemmes ved jodylering under alkaliske forhold, slik at mengden av redusert biopterin beregnes ut fra forskjellen i mengde derav. Når brukt som et koenzym er BH4 konvertert til q-BH2. Q-BH2 konverteres umiddelbart til BH4 ved dihydropterin-reduktase eller hvis ikke redusert, er det oksidert til BH2 eller DHPT. Fordi det er vanskelig

25 for biopterin å eksistere i form av q-BH2 *in vivo*, kan det reduserte biopterinet godt være forskjøvet til BH4.

[0204] Innsamlede plasma og fullblodsprøver underkastes umiddelbart oksydasjon med sur oksiderende løsning (0.6N HCl-løsning i vann som inneholder 0,6 % kaliumjodid (KI), 0,3 % jod (I2) og 0,6 N trikloreddiksyre (TCA)) og alkalisk oksiderende løsning (0,7 N natriumhydroksyd (NaOH)). Bestemmelse av B utføres ved hjelp av HPLC og radioaktiviteten måles

30 ved hjelp av en væskescintillasjonsteller.

[0205] Måling av BH4 ved anvendelse av reversfase HPLC (RP) koblet til tandem-massespektrometri (LC/MS/MS): Den kombinerte bruk av revers-fase høy-ytelse væskeskromatografi (RP) og tandem massespektrometri (LC/MS/MS) ble vist å være selektiv for BH4 i humant

35 plasma, med følsomheten for BH4 i området fra 5 til 1000 ng/ml. Metoden er forbundet med omtrent 50 % omdannelse av BH4 på grunn av oksidasjon under innsamling og lagring. Prøvene er stabile i mer enn tre måneder i dikaliumsalt av etylendiamintetraeddiksyre

(K₂EDTA) plasma. Utbyttet fra forbehandlingstrinnet er omtrent 75 %. Nøyaktigheten og presisjonen av metoden ble bestemt å ha variasjonskoeffisient (CV) % lavere enn 15 % (20 % ved den nedre grensen for kvantifisering, "lower limit of quantitation" LLOQ).

[0206] Kombinert bruk av HPLC og tandem massespektrometri ble vist å være en forbedring over HPLC alene for bestemmelse av BH4 testobjektet på grunn av: (1) den økte selektiviteten for legemiddel-BH4 (mens HPLC måler totalt biopterin), (2) bredere kvalitativ rekkevidde, (3) etablert konvertering rasjon, (4) omfattende karakterisering og velprøvd anvendelse på mennesker, og (5) ny og nyttig måling i ulike arter og matrikser.

[0207] Den forbedrede fremgangsmåten omfatter følgende trinn. Prøver av blod, plasma, vevs-homogenater eller urin blir utsatt for sur eller alkalisk oksydasjon. Ved sur oksidasjon, (1) prøvene behandles med kaliumklorid (KCl), saltsyre (HCl) eller TCA i en time, (2) de surgjorte oksyderte prøvene blir deretter gjenstand for jodometri, (3) prøvene kjøres gjennom en ionebytterkolonne, (4) totalt biopterin omfattende BH4, q-BH2 (som umiddelbart reduseres *in vivo* til BH4 slik at det målte reduserte biopterin er hovedsakelig basert på BH4), BH2, og B måles ved hjelp av HPLC og tandem massespektrometri. Ved alkalisk oksidering, (1) prøvene behandles med KI, I2 eller NaOH i en time, (2) de alkaliske oksyderte prøvene blir deretter gjenstand for surgjøring med HCl eller TCA, (3) gjenstand for jodometri, (4) prøvene kjøres gjennom en ionebytterkolonne, (5) oksidert biopterin omfattende BH2 og B måles, (6) forskjellige arter måles ved hjelp av HPLC og tandem massespektrometri, og (7) mengden av redusert biopterin (BH4 + q-BH2) beregnes som differansen mellom totale biopteriner minus oksidert form.

[0208] Flytskjema for biopterinmåling og analysevalideringssammendrag er tilveiebragt i Figurene 16 og 17.

Optimalisert Assay

[0209] En HPLC-metode med Elektrokjemisk Detection (ECD) og fluorescens (FL) deteksjon er fordelaktig fordi det gir måling av hver av de adskilte biopterin forbindelsene (BH4, BH2 og B) så vel som analoger.

[0210] BH4 er en kofaktor for enzymsystemet nitrogenoksidsyntase (NOS) som produserer nitrogenoksid (NO). Produksjonen av NO er viktig for å opprettholde vaskulær homeostase. Når intracellulære nivåer av BH4 er begrenset, er NO-produksjon redusert (på grunn av redusert NOS aktivitet) og fører til dannelse av de skadelige frie radikaler superokside (O₂⁻). Overflødig O₂⁻ kan føre til endotelial dysfunksjon og kan bidra til oksidasjon av BH4 til BH2. En lav andel av BH4 til BH2 kan fremme endotelial skade, mens et høyt BH4 til BH2 forhold kan fremme endotelial helse. Derfor kan karakterisering av BH4 til BH2 ratio tjene som en indikator for endotelisk helse.

[0211] Konsentrasjonene av forskjellige biopteriner (BH4, BH2 og B) eller analoger bestemmes ved først å bruke revers-fase HPLC for separasjon, etterfulgt av ECD og FL deteksjon.

[0212] BH4, som er et redoks-følsomt, ikke-fluorescerende molekyl, måles ved anvendelse av ECD. BH4 (og analoger derav) måles ved bruk av ECD hvor BH4 (eller analog) oksideres ved elektrode 1 til en kinonoid dihydrobiopterin-form (f.eks. qBH2), et kortvarig dihydrobiopterin mellomprodukt, som deretter reduseres tilbake til BH4 (eller analog) på elektrode 2.

Detektoren bruker deretter strøm generert av denne reduksjonsreaksjon for å bestemme konsentrasjonen av BH4 eller analog derav (endogen qBH2 er ubetydelig).

[0213] BH2, B, og analoger derav kan måles i samme injeksjon ved fluorescensdeteksjon. Post-ECD oksidasjon av BH2 eller en analog derav ved anvendelse av en kondisjonerings vaktcelle ved det optimale potensialet oksiderer BH2 eller en analog derav til B eller den tilsvarende biopterin-analogen. Dette er ønskelig fordi BH2 ikke er aktivt fluorescerende eller lett målbar og må omdannes til B, som er lett målbar med fluorescens. Endogene BH2, når de er konvertert til B, og endogen B skiller seg fra hverandre som to separate, fluorescerende toppe, på grunn av ulike retensjonstider på HPLC-kolonne for hvert molekyl.

[0214] Alt i alt kan metodene brukes til å måle typene BH4, BH2, og B, og analoger derav. Biopterinene måles fortrinnsvis med en 2 % MeOH-holdig mobil fase, som beskrevet her. Biopterin analoger, slik som valin-biopterin-derivater, kan være bedre egnet til høyere metanol innholdet i den mobile fasen, for eksempel en 10 % MeOH-holdig mobil fase.

[0215] Dermed kan en fremgangsmåte for å detektere biopteriner i en blanding av biopterin-typer omfatter (a) å separere biopterintypene i blandingen ved revers-fase HPLC, og i tilfelle av BH4 og analoger derav, (b1) å utfører elektrokjemisk deteksjon ved å oksydere BH4 og analoger derav til stede ved en første elektrode til kinonoid dihydrobiopterin-former, etterfulgt av å redusere de kinonoide formene tilbake til BH4 og analoger derav til stede ved en andre elektrode, og måle strøm generert av reduksjonsreaksjonen for å bestemme konsentrasjon av typene, og/eller (b2) i tilfelle av BH2, analoger derav, biopterin, eller analoger derav, å måle slike typer ved fluorescensdeteksjon etter post-kolonne oksidasjon av BH2 typer til biopterin. Fortrinnsvis er den mobile fase én beskrevet her.

[0216] I en utførelsesform omfatter den foretrukne mobilfasen natriumacetat, sitronsyre, EDTA, og 1,4-ditioerytritol (DTE) med metanol. Foretrukne konsentrasjoner er 50 mM natriumacetat, 5 mM sitronsyre, 48 µM EDTA og 160 µM DTE med 2 % metanol.

VII. Eksempler

[0217] De følgende eksempler er inkludert for å demonstrere foretrukne utførelsesformer av oppfinnelsen. Det skal forstås av fagpersoner at teknikkene beskrevet i eksemplene som følger representerer teknikker som ble oppdaget av oppfinneren at fungere godt ved praktisering av oppfinnelsen, og således kan anses å utgjøre foretrukne måter for å praktisere den. Imidlertid

bør fagpersonene, i lys av den foreliggende beskrivelse, forstå at mange endringer kan gjøres i de spesifikke utførelsesformer som er beskrevet og fremdeles oppnå et lignende eller tilsvarende resultat uten å avvike fra ånd og omfang av oppfinnelsen.

5 EKSEMPEL 1

Konsentrasjonstidskurv for biopterin i plasma etter en enkelt oral dose til rotter

[0218] Hensikten med denne studien var å vurdere farmakokinetikken til BH4 etter en enkelt oral administrasjon til rotter. Enkelt doser av BH4 (10 og 100 mg/kg) ble administrert oralt til hann Sprague Dawley rotter (6 uker gamle) i fastende tilstand.

10 Resultater

[0219] De maksimale totale biopterinkonsentrasjoner i plasma 2 timer og 1 t etter dosering var henholdsvis 108 ng/ml (dvs. omtrent 3x endogent nivå) og 1227 ng/ml (dvs. omtrent 30x det endogene nivået) (Figur 18). Deretter hadde biopterin en halveringstid ($t_{1/2}$) på omtrent 1,1 t, kom tilbake til det endogene nivået 9 timer etter dosering for 10 mg/kg dosen, og 24 timer

15 etter dosering for 100 mg/kg dosen (Figur 18).

[0220] Biotilgjengeligheten (F) etter en 10 og 100 mg/kg oral administrasjon var henholdsvis 6,8 % og 11,8 %, basert på området under plasmakonsentrasjonstidskurven (ΔAUC) oppnådd ved å subtrahere det endogene nivået i løpet av en 10 mg/kg, intravenøs administrering.

Graden av GI absorpsjon var 8,8 % når målt ved hjelp av radioaktive markører i urin. Et

20 estimat av den faktiske verdien vil være omtrent 10 % oral biotilgjengelighet basert på disse dataene.

[0221] Ratioen mellom redusert biopterin til total biopteriner i plasma (dvs. redusert-form ratio) var relativt statisk (73 % -96 %) (Figur 19).

EKSEMPEL 2

25 Konsentrasjonstidskurv for biopterin i plasma etter enkel oral dose til apekatter

[0222] Hensikten med denne studien var å vurdere farmakokinetikken av sapropterin etter en enkelt oral administrasjon i krabbemakaker. En enkelt dose av sapropterin (10 mg/kg) ble administrert oralt til hunn-krabbemakaker (3/gruppe) under fastende forhold.

Resultater

30 [0223] Den totale plasma biopterinkonsentrasjonen (ΔC) nådde sin maksimale verdi 3 timer etter dosering (344 ng/ml, omtrent 20x endogene nivåer) (Figur 20). Plasma halveringstid av biopterin var omtrent 1,4 timer, kom tilbake til det endogene nivået innen 24 timer etter dosering. Ratioen mellom redusert biopterin til totalt biopteriner var nesten konstant i løpet av

testperioden. Biotilgjengeligheten (F) etter en 10 mg/kg oral administrasjon til hunnaper var omtrent 9 %, målt som ΔAUC perorale/iv ratioer (figur 21).

EKSEMPEL 3

Relativ biotilgjengelighet av tetrahydrobiopterin (BH4) administrert etter oppløsning av tablett(er) i vann eller administrert som intakt(e) tablett(er), og effekten av mat på absorpsjon hos friske forsøkspersoner

Mål

[0224] De primære mål med studien var: (1) å evaluere den relative biotilgjengeligheten av tetrahydrobiopterin (BH4, sapropterindihydroklorid) når administrert etter oppløsning av tablett(en) i vann eller administrert som intakt(e) tablett(er), (2) å sammenligne effekten av mat på biotilgjengeligheten av BH4 hos friske forsøkspersoner. Det sekundære målet med studien var å vurdere sikkerhet og toleranse av enkle orale doser av BH4 hos friske forsøkspersoner.

Metodikk

[0225] Denne studien var en åpen, randomisert, tre-behandlinger, seks-sekvenser, tre-perioder crossover studie hvor 30 personer skulle fullføre tre enkeltdose-doseringsperioder og ble randomisert til en av seks sekvensgrupper (gruppe 1, 2 , 3, 4, 5, og 6):

Gruppe 1: a, b, c

Gruppe 2: b, c, a

Gruppe 3: c, a, b

Gruppe 4: a, c, b

Gruppe 5: b, a, c

Gruppe 6: c, b, a

hvor alle doseringsgruppene fikk BH4 10 mg/kg oralt som følger:

a: administrert etter oppløsning av tablett(en) i vann gitt fastende i fastende tilstand

b: administrert som intakt(e) tablett(er) gitt fastende i fastende tilstand

c: administrert som intakt(e) tablett(er) gitt 30 minutter etter å ha begynt å innta et høykalori, fettriikt måltid i ikke-fastende tilstand

[0226] Hver forsøksperson fikk en enkelt dose på 10mg/kg av BH4 i løpet av hver behandlingsperiode. En utvaskingsperiode på minst sju dager skilt hver dose administrering. En post-studie evaluering ble utført 5-7 dager etter utskrivning etter den tredje behandlings-

perioden. Blodprøver til farmakokinetisk (PK) analyse ble tatt på planlagte innsamlingstider i løpet av hver studieperiode: innen 30 minutter før dosering og 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 5,0, 6,0, 8,0, 10,0, 12,0, 18,0, og 24,0 timer etter dosering.

Dose og metode for administrasjon

5 [0227] BH4 tablettene ble administrert som 10 mg/kg doser pr behandlingsperiode. Tablettene ble administrert ved a) oppløsning i vann gitt i en fastende tilstand, b) som intakte tabletter gitt i en fastende tilstand, eller c) som intakte tabletter gitt i en ikke-fastende tilstand.

[0228] Hver dose av studie legemiddel ble fremstilt og administrert i væskeform (løsning) blandet med vann. Vannet var vann fra springen med omgivelsestemperatur. Doserings-
10 løsninger ble utarbeidet innenfor 15 minutter av planlagt dosetid. Oppløsning av tablettene i væske tok omtrent 1 til 3 minutter. Tablettene ble brutt opp eller knust i doseringsbegeret før oppløsning for å forbedre løsningshastighet.

[0229] Ved den angitte morgen-doseringstiden ble BH4 administrert oralt som det antall tabletter som tilsvarer en 10 mg/kg-dose løst i 120 ml vann eller appelsinsaft. Hver
15 forsøksperson ble observert tett mens hele 120 ml dosen ble konsumert innen 15 minutter etter tilberedning. Umiddelbart etter at dosen var blitt konsumert, ble doseringsbegeret skyllet med 60 ml vann og forsøkspersonen konsumerte skyllevannet. En andre 60 ml skyllevann ble tilsatt til doseringsbegeret og deretter konsumerte forsøkspersonen den andre skyllingen. Hele doseringsfremgangsmåten ble gjennomført i en 1-minutters periode. En kvalifisert
20 medarbeider inspisert doseringsbegeret og hver forsøkspersons munn umiddelbart etter fullføring av dosen for å sikre at hele dosen var konsumert. Alternativt svelget forsøkspersonen en pille inneholder BH4 fremfor å løse den i vann. For hvert individ foregikk doseringsperiodene med minimum 7 dager mellom dosene.

Matinntaksplan

25 [0230] En snack ble servert kvelden for innsjekking. Alle forsøkspersonene ble da påkrevd å faste i minst 10 timer før dosering.

Fastende tilstand

[0231] Forsøkspersoner som får behandlinger fastende ble dosert etter at de fullførte en
30 minimum 10-timers faste over natten.

[0232] Forsøkspersonene fortsatte å faste i 4 timer etter dosering. Vann var tillatt ad lib i løpet av studien med unntak av fra 1 time før til 1 time etter dosering. Standardiserte måltider ble levert ved omtrent 4 og 10 timer etter legemiddeladministrasjon og ved egnede tider deretter.

Ikke-fastende tilstand

[0233] Forsøkspersoner som får behandlinger administrert under ikke-fastende forhold ble dosert etter inntak av et høykalori, fettriikt frokostmåltid. Forsøkspersoner mottok følgende standard fettrike (omtrent 50 % av totalt kaloriinnhold av måltidet), høykalori (omtrent 1000 kalorier) frokost som startet 30 minutter før planlagt administrering av dosen og endte (siste bit tatt) innen 5 minutter før dosering.

2 egg stekt i smør

2 strimler av bacon

2 skiver av toast med smør

4 ounce av røstipoteter

8 ounce helmelk

[0234] Dette måltidet inneholdt omtrent 150 kalorier protein, 250 kalorier karbohydrat, og 500-600 kalorier fett. Et tilsvarende måltid ble erstattet ved dokumentasjon av menyen og kalori-innhold.

[0235] Deretter fastet forsøkspersonene i 4 timer etter dosering. Vann var tillatt ad lib i løpet av studien med unntak av fra 1 time før til en time etter dosering. Standard måltider ble levert ved omtrent 4 og 10 timer etter legemiddeladministrasjon og ved egnede tider deretter.

Varighet av behandling

[0236] Tre enkel-dose behandlingsperioder ble atskilt av minimum 7 dager.

[0237] Et oppfølgende besøk ble gjennomført 5 til 7 dager etter siste behandlingsbesøk.

Sikkerhetsmessige variabler: Evaluering og metoder

[0238] Sikkerhet ble evaluert for alle forsøkspersonene som tar minst en dose av BH4.

Effektivitet og sikkerhetsmålinger vurdert og flytskjema

[0239] Sikkerhet ble evaluert ved å registrere forekomsten av uønskede hendelser, endringer i 12-avlednings-EKG parametere, resultater fra vitale tegn og fysikalsk undersøkelse, og endringer i opprinnelige laboratorieprøveverdier. Tidsplanen for disse vurderingene er vist i figur 22.

Fysikalsk undersøkelser og vitale tegn

[0240] Hver forsøksperson gjennomgikk en rutinemessig fysikalsk undersøkelse av studie-utprøveren. Den fysikalske undersøkelsen omfattet evaluering av hode, øyne, ører, nese, hals,

nakke, hjerte, bryst, lunger, mage, ekstremiteter, perifere pulser, nevrologisk status, hud og andre fysikalske forhold i notatet vurderes. Denne studienprotokollen krevde ikke urogenitale undersøkelser.

[0241] Høyde (i centimeter) og vekt (i kilogram) ble målt og body mass index (BMI) ble beregnet ($BMI = \text{vekt (kg)} / [\text{høyde (m)}]^2$).

[0242] Blodtrykket ble målt i sittende stilling i henhold til American Heart Association anbefalinger. Forsøkspersoner var i ro med føttene på gulvet i 5 minutter i sittende stilling når blodtrykket ble målt.

[0243] Hjerterytme (puls) ble målt mens forsøkspersonen var i sittende stilling.

[0244] Et standardisert 12-avlednings-elektrokardiogram (EKG) opptak ble tatt ved screening og ved studieslutt. EKG ble evaluert av en kvalifisert utprøver. Kopier av EKG og evalueringsrapporter ble oppbevart som en del av hver forsøkspersons fil.

[0245] Den medisinske historien, kliniske laboratorieprøver og EKG måling(er) ble gjennomgått og evaluert av hovedutprøveren for å avgjøre klinisk egnethet av hver forsøksperson til å delta i studien.

Klinisk laboratievurderinger

Hematologi:

[0246] Følgende ble evaluert: hemoglobin, hematokrit, total- og differensialtelling av leukocytt, røde blodceller (RBC) og blodplater.

[0247] I tillegg ble blod testet for hepatitt B-overflateantigen, hepatitt C-antistoff og humant immunsviktvirus (HIV).

Kjemi:

[0238] Følgende ble evaluert: albumin, blod urea nitrogen (BUN), kreatinin, total bilirubin, alkaliskfosfatase (ALP), aspartattransaminase (AST), alanintransaminase (ALT), natrium (Na^+), kalium (K^+), klorid (Cl^-), laktatdehydrogenase (LDH), urinsyre, og glukose.

Urinalysis:

[0249] Følgende ble evaluert med urin dipstiks-metoden: pH, relativ tetthet, protein, glukose, ketoner, bilirubin, blod, nitritt og urobilinogen. Ved protein, okkult blod, eller nitritt verdier som er utenfor området utføres en mikroskopisk undersøkelse.

[0250] Urinprøver ble også testet for legemiddelmisbruk (amfetamin, barbiturater, benzodiazepiner, cannabinoider, kokain og opiater).

Bivirkninger

[0251] I denne studien ble en bivirkning (AE) definert som enhver uheldig medisinsk hendelse i en forsøksperson eller klinisk undersøkelsesforsøksperson administrert BH4, ved enhver dose, hvorvidt det har eller ikke en årsakssammenheng med hendelsen. En AE kan derfor være et hvilket som helst ugunstig og utilsiktet tegn (inkludert et unormalt laboratoriumfunn), symptom eller sykdom tidsmessig forbundet med anvendelsen av BH4, hvorvidt eller ikke relatert til BH4. Denne definisjonen omfattet forbigående tilstander eller skader og forverring (økning i frekvens, alvorlighetsgrad eller spesifisitet) av pre-eksisterende forhold.

[0252] Rapporteringsperioden for AEer begynte ved den første administreringen av BH4.

Rapporteringsperioden for alvorlige bivirkninger ("serious adverse events" SEA) begynte tidligere, fra tidspunktet for undertegningen av Informert Samtykke. Alvorlige bivirkninger ble definert senere i dette avsnittet. Utprøveren overvåket alle AE inntil løsning eller, dersom AE ble fastslått å være kronisk, en årsak ble identifisert. Hvis en AE forble uløst ved avslutningen av studien, gjorde PI og Medisinsk Overvåker en klinisk vurdering av om fortsatt oppfølging av AE var hjemlet, og dokumenterte resultatene. Vurdering av alvorlighetsgraden var ett av ansvarsområdene til utprøveren i evalueringen av AEer og SAEer. Utprøveren var ansvarlig for å anvende hans eller hennes kliniske skjønn for å vurdere årsakssammenhengen av hver AE med BH4.

Alvorlige bivirkninger

[0253] En alvorlig bivirkning (SAE) ble definert som enhver AE som har minst en av de følgende resultater:

Resulterte i døden

Var livstruende, det vil si plasserte forsøkspersonene i umiddelbar fare for å dø av hendelsen da den skjedde

Denne definisjonen inkluderer ikke en reaksjon som, hvis den hadde det skjedd i en mer alvorlig form, kan forårsake død

Krevde innleggelse på sykehus eller forlengelse av eksisterende sykehusinnleggelse

Inntak av en forsøksperson til sykehuset som en innleggelse som et resultat av en AE, selv om forsøkspersonen ble utskrevet samme dag, kvalifiserte som sykehusinnleggelse. Besøk på akuttmottaket utgjorde ikke sykehusinnleggelse.

Resulterte i vedvarende eller betydelig handikap eller uførhet

[0254] En hendelse kvalifisert som resulterende i et vedvarende eller betydelig handikap eller uførhet hvis det involverte en betydelig forstyrrelse av forsøkspersonens evne til å gjennom-

føre vanlige livsfunksjoner. Denne definisjonen var ikke ment å inkludere erfaringer av relativt mindre eller midlertidig medisinsk betydning.

[0255] Var en medfødt anomali eller fødselsdefekter, det vil si en AE som skjedde i barnet eller fosteret til forsøksperson utsatt for studielegemidlet før unnfangelsen eller under graviditet

[0256] Var en viktig medisinsk hendelse som ikke oppfyller noen av kriteriene ovenfor, men kan svekke forsøkspersonen eller krevde medisinsk eller kirurgisk inngrep for å forhindre et av resultatene som er nevnt ovenfor.

[0257] Mer enn ett av de ovennevnte resultater kunne gjelde enhver bestemt hendelse.

10 *Hensiktsmessigheten av målinger*

[0258] Målingene av sikkerhet i denne studien var rutinemessige fysikalske undersøkelser, vitale tegn, bivirkningsforekomst og alvorlighetsgrad, og kliniske og laboratorie prosedyrer.

Medikamentkonsentrasjonsmålinger

[0259] Blod (plasma) farmakokinetiske (PK) egenskaper ble vurdert etter hver dose av studiemedisiner. Alle forsøkspersonene forble sittende i oppreist stilling i 4 timer etter dosering. Blodprøvene ble tappet innen 30 minutter før dosen og ved 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 5,0, 6,0, 8,0, 10,0, 12,0, 18,0, og 24,0 timer etter dosering. Prøvene ble samlet i hensiktsmessigmerket 6 ml K₂-EDTA lilla topp Vacutainer® rør. Blodprøver ble sentrifugert ved omtrent 3000 rpm ved 4 °C i 10 minutter. Fra det resulterende plasma ble nøyaktig 1 ml fjernet fra hver prøve ved hjelp av en pipette, og plassert i et alikvotrør inneholdende 0,1 % vekt/vol ditioerytritol. Prøven ble lukket og vortexet i omtrent 10 sekunder ved hjelp av en VWR Mini vortexer på hastighet 6. Etter fullførelse av disse trinn ble prøven hurtigfrosset i et isopropyl/tørrisbad og plassert i en -70 °C fryser i påvente av analyse.

[0260] Omtrent 80 ml blod ble tappet i løpet av hver behandlingsperiode (5 ml pr tidspunkt) for PK-analyse.

Farmakokinetikk:

[0261] Farmakokinetisk (PK) analyse av plasma BH4-konsentrasjon-tidsdata ble utført ved hjelp av ikke-kompartiment al metoder for å få estimater av følgende farmakokinetiske parametere:

Maksimal plasmakonsentrasjon (C_{max}) og tid til maksimal konsentrasjon (T_{max}), hentet direkte fra data uten interpolering,

λ_z , den tilsynelatende terminale eliminasjonshastighetskonstant, bestemt av log-lineær regresjon av den terminalen plasmakonsentrasjonen;

Areal under plasmakonsentrasjon-tidskurven fra tid null til tidspunktet for siste målbare konsentrasjon [AUC(0-t)], beregnet med den lineære trapesmetoden;

Tilsynelatende halveringstid ($T_{1/2}$), beregnet som $0,693/\lambda_z$;

Areal under plasmakonsentrasjon-tidskurven fra tid 0 til uendelig [AUC (inf)] hvor
 5 AUC (inf) = AUC(0-t) + C_t/λ_z og C_t er den siste målbare konsentrasjon.

Beregning av absorpsjonshastigheten

[0262] Forsøkspersoner fikk en 10 mg/kg oral eller intravenøs dose av BH4, etterfulgt av serielle målinger av plasma-total-biopterinkonsentrasjon for å bestemme hastigheten av BH4-absorpsjon fra gastrointestinal tractus fra arealet under plasma-total-biopterin-konsentrasjon
 10 økning (ΔC_p)-tidskurven (ΔAUC). Det ble forventet at en lavere dose av BH4 var nødvendig når det administreres intravenøst sammenlignet med BH4 administrert oralt for å oppnå samme nivå av biotilgjengelighet. For eksempel kan det behøves 10 mg/kg av BH4 gitt oralt for å oppnå samme nivå av biotilgjengelighet som 1 mg/kg BH4 administrert intravenøst. Fordi måten av administrasjonen forbedret biotilgjengelighet kan det behøves bare 5 mg/kg av
 15 BH4 for å oppnå samme nivå av biotilgjengelighet som en 1 mg/kg intravenøs dose av BH4. [0263] Hastigheten av BH4 absorpsjon fra gastrointestinal tractus ble estimert fra området under plasma-total-biopterin-konsentrasjonens øknings- (ΔC_p)-tidskurven (ΔAUC) etter administrering BH4 ved anvendelse av følgende formler:

Estimering fra AUC

20 [0264]

$$\text{Absorpsjonshastigheten (\%)} = (\Delta AUC \text{ etter p.o. dose} / \Delta AUC \text{ etter i.v. dose}) \times (\text{i.v. dose} / \text{p.o. dose} \times 100)$$

Statistiske metoder:

25 [0265] Sammenligning av farmakokinetiske parametre C_{max} , AUC(0-t), og AUC (inf) for BH4 ble utført ved hjelp av en analyse av varians (ANOVA) modell med sekvens, forsøksperson innenfor sekvens, behandling, og periode som klassifikasjonsvariabler ved anvendelse av de naturlige logaritmene til parameterene som avhengige variabler. Sammenligningene av interesse var mellom oppløste og intakt tablett i fastende tilstand og den intakte tablett i
 30 ikke-fastende og fastende tilstand.

[0266] Dataene fra alle forsøkspersonene som fullfører minst to studieperioder ble inkludert i de PK statistiske analysene. Alle forsøkspersonene som fikk minst én dose av studie legemidlet ble inkludert i sikkerhetsanalysene.

[0267] Alle PK og tilhørende statistiske analyser ble gjort ved hjelp av SAS® for Windows®
 35 Versjon 9.1.3 eller nyere.

[0268] For å få tilstrekkelig grunnlag for å oppfylle målene i studien, ble en prøvestørrelse på omtrent 30 forsøkspersoner, hver med tre behandlingsperioder, ansett tilstrekkelig til å tilveiebringe estimer av ulikhetssammenligningene av interesse. Ingen formell utvalgsstørrelsesberegningen ble utført.

5 **Resultater**

Farmakokinetikk

Intakte versus oppløste tabletter

[0269] Gjennomsnittlige plasmakonsentrasjoner av BH4 var lavere når BH4 ble administrert som en oppløst tablett i forhold til intakt tablett (figurene 23 og 24). Gjennomsnittlig C_{max} var høyere for intakt tablett likesom middelerverdier for AUC(0-t) og AUC(inf) (Figur 25). De geometriske middelerverdi-ratioene, intakt-til-oppløst tablett, varierte fra 118 % til 121 % og de øvre grenser av de tilhørende 90 % konfidensintervaller ble større enn 125 % (figur 26), som indikerer en statistisk signifikant økning i absorpsjon når den intakte tablett tas sammen med et høykalori, fettrikt måltid forskjell i absorpsjon mellom oppløst og intakt tablett administrasjon. Median og variasjonsbredde for T_{max} var hovedsakelig de samme for de oppløste og intakte tablettene (Figur 25), noe som tyder på at økningen sett med den intakte tablett var i graden, men ikke hastigheten av absorpsjon.

Effekt av høykalori, fettrik mat på legemiddelabsorpsjon

[0270] Som forventet resulterte administrering av intakt tablett med et standard fettrikt høykalori måltid i en vesentlig økning i den gjennomsnittlige plasma-BH4-konsentrasjonen (figur 23) og middelerverdiene for C_{max}, AUC(0-t), og AUC(inf) (Figur 25). Den geometriske gjennomsnittsratio (ikke-fastende-til-fastende) varierte fra 126 % til 139 % (figur 26), og følgelig ble de øvre grensene for de tilhørende 90 % konfidensintervallene større enn 125 %, noe som indikerer en statistisk signifikant forskjell i effekten av mat på absorpsjon sammenlignet med intakte tabletter. Median og variasjonsbredde for T_{max} var hovedsakelig de samme under ikke-fastende og fastende betingelser (figur 25), noe som tyder på at økningen sett med mat var i graden, men ikke hastigheten av absorpsjon.

30 **Sikkerhet:**

[0271] Det var ingen alvorlige bivirkninger (SAEs) i denne studien. Fem (5) forsøkspersoner rapporterte totalt 9 uønskede hendelser (AEer). Åtte (8) av disse 9 AEer ble vurdert som milde og 1 ble vurdert som moderat i alvorlighetsgrad. Den vanligste AE var hodepine, 1 forsøksperson opplevd en moderat hodepine som ble vurdert som ikke-relatert til studie legemidlet, og én av forsøkspersonene opplevde mild hodepine ved to anledninger, som begge ble vurdert

som mulig relatert. I alt ble fem hendelser vurdert å være irrelevant og 4 ble vurdert til å være mulig relatert til studie legemidlet. Studiens avsluttende vurderinger ble EKG og fysikalsk undersøkelseevalueringer gjennomført uten klinisk signifikante funn.

Konklusjoner:

- 5 [0272] Administrering av BH4 som en intakt tablett resulterte i en tilnærmet 20 % økning i omfanget av absorpsjon i forhold til en oppløst tablett.
- [0273] Administrasjon av BH4 som en intakt tablett med et høykalori, fettrikt måltid under ikke fastende betingelser resulterte i en tilnærmet 30 % økning i omfanget av absorpsjon sammenlignet med fastende betingelser.
- 10 [0274] Ingen klinisk signifikante problemer og sikkerhetsparametere sikkerhetsaspekter ble identifisert i denne studiepopulasjonen. Det var ingen AEer som ble vurdert som alvorlige i denne studien. Blant de ni AEene rapportert var alle bortsett fra én, en forekomst av hodepine, milde, og det ble vurdert å være ikke-relatert til studie legemidlet. Forekomster av tretthet og hodepine var de eneste AEene som muligens var relatert til studie legemidlet, men og disse ble
- 15 vurdert som milde i alvorlighetsgrad.

EKSEMPEL 4

Formuleringstilnærminger for å øke biotilgjengeligheten av BH4

- [0275] To kontrollformuleringer (BH4 intravenøs formulering og BH4 tablett for mikstur) og
- 20 seks testformuleringer ble valgt for testing i dyrestudier. Hver formulerings-prototype inneholdt 80 mg eller 100 mg av BH4.

BH4 Intravenøs formulering

- [0276] Tabell 3 viser sammensetningen av en intravenøs formulering. BH4 ble ført gjennom en #20 mesh rustfri sikt før bruk mens mannitol ble anvendt som mottatt. Denne formu-
- 25 leringen ble fylt som et pulver i en flaske og tilberedt med sterilt vann til injeksjon før administrering. Hver flaske inneholdt 100 mg av BH4 og 5 g mannitol i en klar polyetylen-tereftalat blandingspolyester (PETG) flaske med en hvit høytetthets polyetylen (HDPE) skrutopp lukkingen. Før administrering ble formuleringen tilberedt med 100 ml sterilt vann for injeksjon for å gi en endelig konsentrasjon på 1 mg/ml. IV formuleringen ble levert som et tørt
- 30 pulver i en flaske, og hver flaske inneholdt API og mannitol. Pulveret ble oppløst i sterilt vann for injeksjon og filtrert før administrasjon ved IV rute.

Tabell 3 Sammensetning av BH4 IV Formulering

Ingredienser	% (vekt/vol)	mg/ml
BH4	0,1	1,0
Mannitol (lite av endotoksin), USP/Ph.Eur.	5,0	50,0
Sterilt vann til injeksjon	qs 100 ml	qs 1ml

BH4 tablett for mikstur

[0277] Tabell 4 viser sammensetningen av en mikstur formulering. Ti (10) BH4 tabletter (100 mg) ble anbrakt i en 125 ml gradert PETG flaske med en hvit HDPE lukking. Før administrering ble formuleringen tilberedt med 100 ml sterilt vann for injeksjon for å gi en endelig konsentrasjon på 10 mg/ml.

Tabell 4 Sammensetning av BH4 tablett, 100 mg

Ingredienser	5 (vekt/vekt)	Mg/tablett
BH4	33,33	99,99
Askorbinsyre, USP/EP	1,67	5,01
Crospovidon, USP/EP	4,5	13,5
Dikaliumfosfat, vannfri USP/EP	2,18	6,54
Mannitol (Partek M200), USP/EP	57,06	171,18
Riboflavin, Universell, USP/EP	0.01	0,03
Natriumstearyl fumarat (PRUV), NF/EP	1,25	3,75
Total	100,00	300,00

Formuleringsprototype til å redusere gastrointestinal motilitet

[0278] Tabell 5 lister sammensetningen av en forsinket gastrisk tømmingstid prototype. BH4 ble passert gjennom en #20 mesh rustfri stålsikt før bruk. Capmul GMO-50'en ble smeltet i et 37 °C vannbad. BH4 og askorbinsyre ble veid og tilsatt langsamt til smeltet Capmul under kraftig omrøring. Den faste dispersjonen ble tilsatt dråpevis inn i en størrelse # 2 kapsel ved bruk av en pipette. Tre fylte kapsler ble anbragt i en 100 cc høytetthetspolyetylen (HDPE) flaske med en varme-induksjonsforseglingsslukking.

Tabell 5 Sammensetning av BH4 forsinket ventrikkeltømmingstid Oral kapsel Formulering

Ingredienser	% (vekt/vekt)	mg/kapsel
BH4	25	80

Glycerylmono/di-oleat (Capmul GMO-50)	65	208
Askorbinsyre fint pulver	10	32
Totalt	100	320

Bioadhesiv prototype

[0279] Tabell 6 viser sammensetningen av et bioadhesiv prototype. Alle materialer, bortsett fra Carbopol 71G, ble ført gjennom en # 20 mesh rustfri stålsikt. Alle materialer ble veid og tilsatt til en plastpose med en zip-låslukking, som deretter ble rystet i noen minutter inntil blandingen virket uniform. Pulveret ble komprimert til en tablett ved anvendelse av en 1/4"standard, rund, konkav, glatt-overflate B innretning på en Globe Pharma MTCM-I manuell presse ved 600 psi. Tre tabletter sammen med et silikagel tørkemiddelbeholder ble pakket i en 100 cc HDPE med en varmeinduksjonsforseglingsslukking.

Tabell 6 Sammensetning av BH4 bioadhesiv oral tablettformuleringen

Ingredienser	% (vekt/vekt)	mg/tablett
BH4	48,5	80,00
Carbopol 71 G	20,0	32,99
Polycarbofil (Neveon AA1)	20,0	32,99
Askorbinsyre fint pulver	10,0	16,49
Natriumstearylfulmarat (PRUV)	1,5	2,47
Total	100,0	164,94

Vedvarende frigjøringsprototype

[0280] Tabell 7 viser sammensetningen av en vedvarende frigjøringsprototype testet i apen. Alle materialer, bortsett Mehocel K100M Premium CR, ble ført gjennom en #20 mesh rustfri stålsikt. Alle materialer ble veid og tilsatt til en plastpose med zip-låslukking, som deretter ble rystet i noen minutter inntil blandingen virket uniform. Pulveret ble komprimert til en tablett med en 1/4"standard, runde, konkave, glatt-overflate B innretning på en Globe Pharma MTCM-I manuell trykk ved 1200 psi. Tablettene sammen med en silikagel tørkemiddelbeholder ble pakket i en 100 HDPE flaske med varmeinduksjonsforseglingsslukking.

Tabell 7 Sammensetning av BH4 vedvarende frigjøringstablettformuleringen

Ingredienser	% (vekt/vekt)	mg/tablett
BH4	53,5	80,00
Metocel K100M premium CR	35,0	52,34
Askorbinsyre fint pulver	10,0	14,95

Natriumstearyl fumarat (PRUV)	1,5	2,24
Total	100,0	149,53

Protondonor polymer prototype

[0281] Tabell 8 lister sammensetningen av en protondonor polymer prototype testet i apen. Alle materialer, bortsett Eudragit L100-55 og Kollidon CL, ble for-siktet ved hjelp av en #20 mesh rustfri stålsikt. Alle materialer ble veid og tilsatt til en plastpose med en zip-låslukking, som deretter ble rystet i noen minutter inntil blandingen virket uniform. En for-veid mengde pulver ble fylt i en størrelse #2 kapsel.

[0282] En belegningsløsning ble fremstilt ved oppløsning av Eudragit L100-55 og Carbowax PEG 4600 i etylalkohol. Eudragit L100-55 og Carbowax PEG 4600 ble veid og tilsatt til en 125 ml gradert polyetylentereftalat ko-polyester flaske (PETG). Etylalkoholen ble tilsatt til PETG flasken, og den ble plassert i et 40 °C vannbad med sonikering inntil løsningen var klar.

[0283] De pulver-fylte kapsler ble manuelt dyppet i beleggløsningen og tillatt å tørke ved 40 °C i 20 minutter. De tørkede kapsler ble veid og deretter rullet i Syloid FP244 å fjerne gjenværende klebrighet. Tre kapsler ble pakket i en 100 cc HDPE flaske med en varme-induksjonsforseglingslukking.

Tabell 8 Sammensetning av BH4 protondonor kapsler

<i>Ingredienssammensetning av kapsel</i>	% (vekt/vekt)	mg/kapsel
BH4	40,0	80
Eudragit L100-55	44,5	89
Crospovidon (Kollidon CL)	4,0	8
Askorbinsyre fint pulver	10,0	20
Natriumstearyl fumarat (PRUV)	1,5	3
Totalt	100,0	200
<i>Ingredienssammensetning av kapselbelegg</i>	% (vekt/vekt)	mg/kapsel ¹
Eudragit L100-55	5,0	ND
Polyetylglykol 4600 (Carbowax Sentry)	5,0	ND
Etylalkohol, 200 "proof"	100 ml	ND
¹ Etter kapsel belegging og tørking i ovnen ved 40 °C øker kapselen omtrent 1 til 3 % vekt i polymerbelegging. ND = "Not determined" Ikke bestemt		

Flytende leveringssystem

[0284] Tabell 9 viser sammensetningen av et flytende leveringssystem. Alle materialer, bortsett Eudragit L100-55, ble ført gjennom en # 20 mesh rustfri stålsikt. Denne tablett-prototypen omfattet tre lag, den midterste laget inneholdt legemiddelsubstansen, som ble klemmt mellom to vannuløselige ytre lagene. De indre og ytre materialer ble veid og tilsatt separat til plastposer har zip-låslukninger, som så ble ristet inntil blandinger virket uniform.

[0285] De to ytre lag (12 mg hver) og indre lag (14,5 mg) ble veid. Et av de ytre lagene ble tilsatt til pressen, etterfulgt av det indre laget, og deretter siste ytre lag. Lagene ble komprimert til en tablett med en 3/16" rund, skrå, glatt-overflate B innretning på en Globe Pharma MTCM-I manuell trykk ved 200 psi.

[0286] En belegningsløsning ble fremstilt ved løsning av Etocel og PEG 4600 i en etylalkohol og rensset vann blanding. Ingrediensene ble tilsatt til en PETG flaske, som ble blandet og plassert i et 40 °C vannbad med sonikering inntil løsningen virket klar.

[0287] Tablettene ble manuelt dyppet i beleggløsningen og får tørke i 20 minutter ved 40 °C.

Hver tablett ble re-veid etter belegging. Syv (7) tabletter ble anbrakt i hver av størrelse #2 langstrakte kapsler. Tre kapsler ble pakket i en 100 cc flaske HDPE med en varme-induksjons-forseglingsslukking.

Tabell 9 Sammensetning av BH4 flytende doseringsformulering

<i>Ingredienser ytre lag 1 og 3</i>	% (vekt/vekt)	mg/tablett
Eudragit L 100-55	49,5	5,94
Stearinsyre	49,5	5,94
Natriumstearylfulmarat (PRUV)	1,5	3
Totalt	100,0	12,00
<i>Ingredienser midtre lag 2</i>	% (vekt/vekt)	mg/tablett
BH4	79,0	11,46
Stearinsyre	10,0	1,45
Askorbinsyre fint pulver	10,0	1,45
Natriumstearylfulmarat	1,0	0,15
Totalt	100,0	14,51
<i>Ingredienser 7 tabletter i en kapsel</i>	% (vekt/vekt)	mg/kapsel
BH4	29,8	80,19
Stearinsyre	34,6	93,31
Askorbinsyre fint pulver	3,8	10,15
Eudragit L100-55	30,8	83,16
Natriumstearylfulmarat (PRUV)	1,0	2,7
Totalt	100.0	269,59

<i>Ingredienser tablettbeleggingsløsning</i>	% (vekt/vekt)	mg/kapsel
Etocel Standard 10 FP	5,0	ND
Carbowax PEG 4600	5,0	ND
Etylalkohol, 200 "proof"	95,0 ml	ND
Renset vann	5,0 ml	ND
¹ Etter kapsel belegging og tørking i ovnen ved 40 °C, øker kapselen omtrent 3 til 8 % vekt i polymerbelegging. ND = "Not determined" Ikke bestemt		

Gassgenererende Flytende Leveringssystem

[0288] Tabell 10. viser sammensetningen av en gassgenererende flytende leveringssystem.

Denne formuleringen ble sammensatt av en tablettkjerne som inneholder legemiddel-substansen omgitt av et gassgenererende yttersjikt. Alle materialer, bortsett ifra

- 5 natriumbikarbonat og Methocel K100M CR, ble forhåndssiktet ved hjelp av en # 20 mesh rustfri stålsikt. Materialene til indre kjerne og ytre lag ble veid og tilsatt separat til plastposer med zip-lås lukking, som ble lukket og rystet inntil blandingen virket uniform. Pulver-blanding for den indre kjerne (35 mg) ble komprimert til en tablett ved hjelp av en 1/8" rund, skrå, glatt-overflate B innretning på Globe Pharma MTCM-I manuell presse ved 800 psi.
- 10 **[0289]** En belegningsløsning ble fremstilt ved å oppløse med Ethocel og PEG 4600 i etylalkohol. De indre kjernetablettene ble manuelt dyppet i belegningsløsningen og fikk tørke i 20 minutter ved 40 °C. Pulverblanding for det ytre laget (40 mg) ble veid. En halvdel ble tilsatt til pressen, etterfulgt av den indre kjernen tablett, og deretter den andre halvdel av det ytre laget. Tabletten ble komprimert med en 3/16 "rund, skrå, glatt-overflate B innretning på
- 15 en Globe Pharma MTCM-I manuell presse ved 800 psi. Fire (4) tabletter ble anbrakt i hver størrelse # 2 kapsel.

Tabell 10 Sammensetning av BH4 gassgenererende Flytende Dosering Formulering

<i>Ingredienser Indre tablettkjerne</i>	% (vekt/vekt)	mg/tablett
BH4	58,3	20,39
Askorbinsyre fint pulver	19,4	6,80
HPMC K100MCR	19,4	6,80
Natriumstearyl fumarat (PRUV)	2,9	1,02
Totalt	100	35,01
<i>Ingredienser Ytre tablettlag</i>	% (vekt/vekt)	mg/tablett
HPMC K100MCR	46,1	18,46
Sitronsyre vannfri	34,2	13,68
Natriumbikarbonat	17,1	6,84

Natriumstearylfulmarat	2,6	1,03
Totalt	100	40,01
<i>Ingredienser 4 tabletter i en kapsel</i>	% (vekt/vekt)	mg/kapsel
BH4	27,2	81,55
Askorbinsyre fint pulver	9,1	27,18
HPMC K100MCR	33,7	101,03
Sitronsyre vannfri	18,2	54,70
Natriumbikarbonat	9,1	27,35
Natriumstearylfulmarat	2,7	8,18
Totalt	100	299,99
<i>Ingredienserbeleggingsløsning</i>	% (vekt/vekt)	mg/kapsel ¹
Etocel Standard 10 FP	5,0	ND
¹ Etter kapsel belegging og tørking i ovnen ved 40 °C, øker kapselen i vekt ved polymer-belegging. ND = "Not determined" Ikke bestemt		

Bioadhesiv Granule Prototype

[0290] Tabell 11 viser sammensetningen av et bioadhesiv granule prototyp. Alle materialer, bortsett ifra Methocel K100M CR, ble forhåndssiktet ved hjelp av en # 20 mesh rustfri stålsikt. Alle materialer, bortsett natriumstearylfulmarat (PRUV), ble veid og plassert i en størrelse # 1 granulator bolle (LB Bohle Mini Granulator BMG). Pulveret ble blandet ved en impeller-hastighet på 300 rpm og en kutterhastighet på 2500 rpm i fem minutter til blandingen virket uniform. Mens impeller- og kutter-hastighetene ble opprettholdt, ble 5 ml etylalkohol tilsatt dråpevis til blandingen inntil granulene ble dannet. Den våte masse ble fjernet fra granuleringsbollen og siktet gjennom en 18-mesh rustfri stålsikt. Granulene ble oppsamlet og plassert i en 40 °C ovn for å tørke i en time. Tapet ved tørking av granulene ble bestemt til å være 1,93 % etter en times tørking. Granulene ble veid og plassert i en plastpose med en zip-lås lukking. Natriumstearylfulmarat (PRUV) ble lagt til de tørkede granulene i posen. Posen ble lukket og rystet inntil natriumstearylfulmarat (PRUV) virket jevnt fordelt blant granulene. Granulene ble veid (134 mg). Langstrakte kapsler størrelse 2 ble fylt med porsjoner av granulene alternerende med dråper av delvis hydrogenert vegetabilsk olje (350 µl). Tre kapsler ble pakket i en 100 cc flaske HDPE med en varme-induksjonsforseglingsslukking..

Tabell 11 Sammensetning av BH4 bioadhesiv granul kapsel formulering

<i>Ingredienser</i>	% (vekt/vekt)	mg/tablett
BH4	60	80,00
Methocel K 100M CR	19	25,33

Carbopol 971	10	13,33
Askorbinsyre fint pulver	10	13,33
Natriumstearyl fumarat (PRUV)	1	1,33
Pureco HSC-1 olje		350 µl
Totalt	100	133,33

In Vitro Legemiddelfrigjøring

[0291] *In vitro* legemiddelfrigjøringstesting fra tabletter ble gjennomført i henhold til USP 27 apparat II spesifikasjoner med en Distek 2100C Dissolution Tester (Distek, Inc., North Brunswick, NJ), sammen med et Agilent UV-Synlig spektroskopisystem (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Oppløsningsmediet som ble brukt for frigjøringstesting av BH4 var 900 ml 0,1 N HCl. Under oppløsningstesting ble mediene i hver beholder holdt ved $37^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ og agitert ved 50 rpm. Et prøvevolum på 5 ml ble tatt på forhåndsbestemte tidspunkter. For å bestemme konsentrasjonen av BH4 i prøvene ble 250 µl av hver prøve fortynnet med 500 µl av 0,1 N HCl, og absorpsjonen ble målt ved 265 nm ved hjelp av et UV-spektrometer (8453 UV-Visible spektrofotometer, Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Dataene ble samlet inn ved hjelp ChemStation programvare (Rev. A.09.01 [76], Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Alle oppløsningstestene ble utført i triplikat.

Tablett Flyteevnetesting

[0292] Flyteevnen av de flytende prototypetablettene ble først bestemt ved å plassere tablettene i plastkopper med 25-50 ml av 0,1 N HCl. Denne testen bestemmer den tid som er nødvendig for at tablettene skal flyte, så vel som varigheten av deres flyting uten omrøring. De prototyper som fløt i minst fire timer ble underkastet oppløsningstesting. Under oppløsningstesting, ble flyteevnen av tablettene bestemt ved padlemetoden ved en rotasjonshastighet på 50 rpm. Tablettenes tilstand ble kontrollert visuelt ved forskjellige tidspunkter.

Henfallstesting

[0293] Henfallstesting ble utført i henhold til USP-27 henfallstest-spesifikasjoner ved hjelp av en Distek 3100 Series Disintegration Tester (Distek Inc., North Brunswick, NJ). Henfallsmedia anvendt var 900 ml av 0,1 N HCl eller 900 ml 0,2 M kaliumfosfat pH 5,8. Under henfallstesting ble media i beholderne holdt ved $37^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Tablettene og kapslene ble visuelt inspisert for henfall.

Tablett Hardhetstesting

[0294] Tablett-hardhet ble bestemt ved hjelp av en Dr. Schleuniger Pharmatron 8M Tablet Hardness Tester (Dr. Schleuniger® Pharmatron Inc., Manchester, NH). Tablettene ble plassert i kjeven på hardhetsmåleren, og hardheten ble målt i kiloponds (Kp).

Tablett Tykkelse

[0295] Tykkelsen av tablettene ble målt ved hjelp av en Mitutoyo Digimatic Indikator (Mitutoyo Absolutt, Dr. Schleuniger Pharmatron Inc., Manchester, NH). Tablettene ble plassert under tykkelsemåleren og verdien angitt ble registrert i millimeter (mm).

Resultater og Diskusjon

[0296] Flere prototyper ble utviklet basert på tre begreper: gastroretentive, protondonor polymer for å endre intestinal pH, og vedvarende frigjøring doseringsformer. Avsnittene nedenfor beskriver formulering utvikling av hver prototype.

[0297] *BH4 intravenøs formulering* - Etter konstitusjon med sterilt vann var den resulterende løsning isoton, pH 3,2 og inneholdt 1 mg/ml av BH4, og var egnet for intravenøs administrering etter sterilfiltrering gjennom et 0,22 mikron filter. Stabilitet av 1 mg/ml løsning lagret ved omgivelsestemperatur ble analysert ved HPLC hver time i tre timer. Prøvene fra den aldrede løsning ble deretter lagret ved -20 °C og analysert ved HPLC etter 2 uker. Figur 27 indikerer at løsningen var stabil ved romtemperatur i minst 3 timer etter konstitusjon og var stabil i minst 2 uker ved lagring ved -20 °C.

BH4 tablett for mikstur

[0298] Hver flaske ble pakket til å inneholde ti (10) BH4 tabletter, 100 mg. Ett hundre (100) ml av rensset vann eller sterilt vann for injeksjon ble tilsatt til innholdet i hver flaske. Etter kraftig risting av flasken henfalt tablettene raskt innen 5 minutter. Den resulterende løsningen inneholdt 10 mg/ml av BH4 for oral administrering. Ikke alle ingrediensene i tablettene var løselige, og selv om den endelige løsningen syntes tåkete eller gjennomskinnelig, ble den aktive farmasøytiske ingrediensen helt løst og de fine partiklene var lite løselige inaktive ingredienser.

Formuleringsprototype til langsom Gastro-intestinal motilitet

[0299] Denne kapselformuleringen består av BH4 og askorbinsyre dispergert i et halvfast fettsyrederivat (glycerylmono/di-oleat, smeltepunkt på 86 °F (30 °C)). Glycerylmono/di-oleat (GMO) ble også valgt fordi GMO er kjemisk kompatibel med BH4. Oppløsnings-

hastighetsprofilen avbildet i Figur 28 viste at over 90 % av medikamentet ble frigjort innen 2 timer og opp-løsningsprofilen forble uendret etter at kapslene ble lagret ved 40 °C i 57 dager. [0300] Legemiddeldispersjonen i smeltet GMO, et halvfast stoff, ble manuelt fylt i harde gelatinkapsler. Tettheten av det halvaste stoffet, er større enn 1 g/ml, og det var mulig å fylle minst 80 mg dose med 25 % legemiddelmengde i en størrelse # 2 kapsel. Det forventes at en størrelse # 0 kapsel skal kunne inneholde minst 200 mg av legemidlet ved hjelp av samme formulering. Lekkasje av fettsyre fra kapselen ble observert under lagring ved 40 °C. Fortrinnsvis vil kapsler eller softgel kapselformuleringer bli ombundet for å unngå lekkasje av fettsyre under lagring.

Bioadhesiv Prototype

[0301] Mange bioadhesiver er laget av enten syntetiske eller naturlige polymerer. De fleste av de nåværende syntetiske bioadhesive polymerer er enten polyakrylsyre eller cellulosederivater. Eksempler på polyakrylsyre-baserte polymerer innbefatter, men er ikke begrenset til carbopol polykarbofil, polyakrylsyre ("poly acrylic acid" PAAc) osv. Cellulosederivater inkluderer, men er ikke begrenset til, hydroksypropylcellulose og hydroksypropylmetylcellulose (HPMC). To bioadhesive prototyper ble utviklet for testing i dyrestudier. Den første prototypen var en bioadhesiv tablett-formulering og den andre en kapsel inneholdende bioadhesive granuler. [0302] Polykarbofil og karbomer polymerer ble valgt for utviklingen av den første bioadhesive tablettprototype. Carbopol 71 G er en granulær form av karbomer og har gode pulver flyteegenskaper. Alle batchene av de fabrikkerte tablettene var av god kvalitet med akseptabelt legemiddelinnhold (åpenbart med nær 100 % legemiddelfrigjøring i oppløsningshastighetsprofiler) og akseptabel hardhet. Tabell 12 viser representative tablettvekt, tykkelse og hardhet for den bioadhesive prototypen som inneholder karbomer og polykarbofil.

Tabell 12 Representant Tablettvekt, Tykkelse og Hardhet for Bioadhesiv Prototype inneholdende Karbomer og Polykarbofil

Tablett lot nummer	Kompresjonstrykk (psi)	Vekt (mg)	Tykkelse (mm)	Hardhet (Kp)
11210-83	600	165,4	5,24	10,5
11229-4	600	166,7	5,64	10,3
11229-4	800	164,1	5,27	14,4
11229-4	1000	164,9	5,12	18

[0303] HPMC og karbomer polymerer ble brukt for utvikling av de andre bioadhesive granulene. HPMC ble valgt fordi det er anvendt som lav-tetthet hydrokolloid system og kontrollert legemiddelfrigjøring uavhengig av pH. Granuler ble valgt over tablett for å øke sjansen for bioadhesjons ved å øke overflatearealet av doseringsformen. For å lette

separasjonen av den granuler-fylte kapslen i oppløsningsmedium ble granulene belagt delvis med hydrogenert olje. Uten belegging med olje hydratiserte granulene og dannet en kapsel-formet matriks uten henfall til individuelle granuler.

[0304] Frigjøringsprofiler av de to bioadhesive prototypene (tablett og granuler) er vist i Figur 29, som viser at frigjøringsprofilen av tablett var lengre enn granulene. Legemiddel-frigjøring var omtrent 90 % på fire timer og 95 % på en time for henholdsvis de bioadhesive tablett- og granuledoseringsformene. Ved lagring ved 40 °C og normal luftfuktighet i en måned uten fuktbeskyttelse (ingen varmeindusert segl), viste tablettprototypen en nedgang i legemiddeloppløsning (Figur 29). For prototyper inneholdende karbomer, bør fuktighets-beskyttelsesforholdsregel tas for å beskytte tablett fra mulig for tidlig fuktighet. *Vedvarende frigjøringsprototype*

[0305] Hydroksypropylmetylcellulose (HPMC) brukes som en hydrofil bærer for fremstilling av oral kontrollerte legemiddelfrigjøringssystemer (Colombo, Adv. Drug Deliv. Rev, 1993, 11, 37). HPMC matrikser er kjent for å kontrollere frigjøringen av en rekke medikamenter (Chattaraj, et al. Drug Develop. Ind Pharm, 1996, 22, 555; Pabon et al, Drug Develop. Ind Pharm, 1992, 18, 2163; Lee, et al, Drug Develop. Ind Pharm, 1999, 25, 493; Basak, et al, Indian J. Pharm. Sci, 2004, 66, 827, Rajabi-Siabhoomi, et al, J. Pharm. Pharmacol., 1992, 44, 1062). Ulike viskositetsklasser av HPMC (K4M, K15M og K100 M) for å kontrollere frigjøring av BH4 ble evaluert i denne studien. Oppløsningshastighetsprofilene til tabletter laget med forskjellige graderinger av HPMC er vist i figur 30. Legemiddelfrigjørelsesprofiler var like ved 20 % HPMC uansett viskositetsgrad, mer enn 80 % av medikamentet ble frigjort på 2 timer. Da HPMC polymer ble utsatt for vandig medium, gjennomgikk det rask hydrering og kjedeavslapping for å danne gellag (Naruhashi, et al., Pharm Res., 2003, 19:1415-1421). HPMC'en ved 20 % kan ikke danne et betydelig gel barrierelag for å redusere frigjøring av BH4 signifikant.

[0306] Oppløsningshastighetsprofilene av tabletter produsert med varierende konsentrasjoner (20 % til 40 %) av en høy viskositet HPMC (Methocel K100M CR) er presentert i figur 30. En tablett inneholder 35 % til 40 % Methocel K100M CR ble funnet å hemme legemiddel-frigjøring i opptil fire timer mens 20 % HPMC frigjorde stoffet på to timer (Figur 31). En tablett inneholdende 35 % HPMC (Methocel K100M) ble valgt som prototype for testing i dyrestudier fordi den inneholdt den minste mengden av HPMC som kreves for å hemme legemiddelfrigjøring i opptil fire timer. Som sådan var tablettene av god kvalitet med akseptabel medikamentinnholdet som åpenbart av nær 100 % medikamentfrigjøring i oppløsningshastighetsprofiler.

Protodonor polymer Prototype

[0307] For å øke oral absorpsjon av BH4 er en tilnærming å stabilisere stoffet ved å redusere pH i den proksimale tynntarm. For å manipulere tarmkanalens pH ble Eudragit L100-55, en

proton-avgivende polymer som vanligvis brukes for enterisk belegg, valgt. Denne polymeren er ikke løselig under sure betingelser, og den blir løselig og frigjør protoner under svakt sure (pH > 5,5) til alkaliske forhold på grunn av dens karboksylgrupper, og dermed kontrolleres den tarmkanalens pH til å være sure. Naruhashi, et al. (2003) fant at pH i lumen ble redusert på en

5 Eudragit L100-55 konsentrasjon-avhengig måte og absorpsjon av cefadroxil og cefixime fra tynntarmssløyfene ble økt i nærvær av den sure polymeren (Nozawa et al., J. Pharm 2003 Sci, 92 (11), 2208-2216). Nozawa, et al (2003) viste at Eudragit senket pH i tynntarmssløyfene og økt forsvinningen av både cefadroxil og cefixime fra sløyfer.

[0308] Pulverformuleringer inneholdende BH4 og Eudragit L100-55 som vist i Tabell 8 ble

10 komprimert til tabletter og fylt i kapsler. Tablettformuleringen frigjorde omtrent 27 % medikament på en time i simulert magevæske ("simulated gastric fluid" SGF) under oppløsnings-hastighetstesting. Under henfalltidstesting forble imidlertid tabletten intakt i SGF og pH 5,8 fosfatbuffer (PB) i minst 2 timer. Selv i nærvær av et super-desintegreringsmiddel (crospovidon eller croscarmellose) mislyktes tabletten i å henfalle. Det er mulig at legemidlet

15 kan surgjøre Eudragit og danne et lav-pH mikromiljø slik at polymeren forble organisert og uløselig.

[0309] Den pulverfylte kapsel legemiddel-Eudragit formuleringen henfalt raskt i SGF. For å målrette proton frigjøring i den proksimale tarmen, ble et enterisk belegg påført kapselen. Etter kapselbelegging og tørking i ovnen ved 40 °C, økte kapselen omtrent 1 til 3 % vekt i polymer-belegg. Når testet ved hjelp av USP dissolution apparatus II (paddle), oppløsningsmedium 0,1 N HCl holdt ved 37 °C ved en rotasjonshastighet på 50 rpm, frigjorde den belagte kapselen omtrent 25 % av medikamentet på en time. Etter 1 time med syreforbehandling (0,1 N HCl), ble den belagte kapselen plassert i et USP desintegration Apparatus med 500 ml fosfatbuffer pH 5,8 holdt ved 37 °C, henfalt den belagte kapselen på omtrent 1 time. Den enterodrasjerte

20 kapselprototypen ble valgt fremfor tablett eller ubelagt kapsel fordi den enterodrasjerte kapselen var mer sannsynlig til å levere proton-frigjørende polymer til målstedet.

Flytende leveringssystem

[0310] To flytende leveringssystemer ble utviklet. Den første prototypen var en flytende

30 multippel enhetsdoseform; hensikten med denne doseringsform var å øke sjansen for at en av enhetene vil forbli i den gastriske regionen og dermed forlenge den gastriske oppholdstiden av legemidler. Denne doseringsformen besto av syv trelagstabletter i en kapsel, det midterste laget inneholdt legemiddelsubstansen, som ble klemte mellom to vannuløselige ytre lag (Figur 32). De ytre lagene inneholdt stearinsyre, en hydrofob og vannuløselig fettsyre som ga den nødvendige oppdrift til den flytende tabletten. Hver tablett ble manuelt belagt med en

35 alkoholisk løsning av etylcellulose og polyetylenglykol MW 4600 (PEG). Etylcellulose dannet en vannuløselig film rundt tabletten, og PEG, som fungerte som en poredanner, modulert frigjøringshastigheten. Oppløsningshastighetsprofilene for tabletter belagt med etylcellulose

og forskjellige konsentrasjoner (20 % til 40 %) av PEG løsninger er presentert i Figur 33. Det ble bemerkt at den belagte trelagstabletten oppnådd nær nullte-ordens frigjøringskinetikk. Som forventet økte legemidlets oppløsningshastighet når konsentrasjonen av PEG økte. Tablettene fløt i simulert gastrisk medium i minst fire timer under oppløsningshastighets studier. Tabell 9 viser sammensetningen av formuleringen testet i dyrestudier.

[0311] Den andre prototypen var en gass-genererende doseringsform. Det ble formulert på en slik måte at når den kom i kontakt med surt mageinnhold ble karbondioksid frigjort og ble fanget i de svellede hydrokolloidene, som ga oppdrift til doseringsformen (Figur 33). Denne formuleringen fløt i simulert gastrisk medium i minst fire timer under oppløsningshastighets studier. For at et slikt system skal fungere konsekvent må imidlertid tablettene produseres i et miljø med lav luftfuktighet å forhindre for tidlig syre- og basereaksjon. Det kan oppstå potensiell interaksjon mellom BH4 og natriumbikarbonat i tabletten under lagring. Av disse grunner ble denne doseringsformen ikke testet i dyrestudier.

[0312] Seks prototype testformuleringer som inkorporerer ulike formuleringstilnærminger, inkludert protondonor polymer for å redusere intestinal pH, gastroretentive doseringsformer, og vedvarende frigjøringsformuleringer, ble utviklet for biotilgjengelighetstudier i dyr.

EKSEMPEL 5

Biotilgjengelighet av Nye BH4 Formuleringer

[0313] Målet med denne studien var å øke absorpsjonen av BH4 ved å utvikle doseringsformer som øker oppholdstiden av medikamentet i gastrointestinal (GI) tractus.

[0314] Metoder: Tre friske krabbemakaker som veide 3-4 kg ble brukt i åpne, 8-perioders ikke- crossover studie for å bestemme biotilgjengeligheten av syv formuleringer sammenlignet med en kontroll løst BH4 formulering. Etter faste over natten, fikk apekattene, ved separate anledninger, en enkelt dose på 80 mg av den samme nye formuleringen oralt eller intravenøst med et intervall på minst en 1-ukes utvaskingsperiode mellom de studerte ulike nye formuleringene. For intravenøs administrering ble blodprøver samlet før dosering og deretter ved 5, 15 og 30 min og 1,0, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0, 12 og 24 timer etter dosering. For oral administrering ble blodprøver tatt før dosering og deretter ved 15 og 30 min og 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 6,0, 8,0, 12 og 24 timers etter hver dose. Etter separasjon av plasma ved sentrifugering ble 200-µl aliquoter av hver prøve straks overført til individuelle rør inneholdende 0,1 % DTE og frosset ved -70 °C til alt er klart for analysen for total L-biopterin.

[0315] Studieformuleringer: Formuleringene som ble administrert finnes i Tabell 13. Tre av formuleringene ble konseptuelt utformet for å være gastroretentive via bioadhesive eller flytemekanismer for å øke oppholdstiden i GI (karbomer-basert, multi-partikkelformede flytende granuler og bioadhesive granuler). Andre konsepter var basert på å dempe GI motilitet for å øke oppholdstiden av formuleringen (glycerylmono-oleat), reduksjon av pH i tynntarmen og

derved øke BH4's kjemiske stabilitet for å muliggjøre absorpsjon av intakt medikament (protonpumpe) eller vedvarende leveringsformulering for å fastslå om det vil forbedre absorpsjonen.

Tabell 13

Fase	Prototype	Doseringsform	Konsept	Ingredienser
Fase I	IV formulering	IV løsning, 1 mg/ml	Kontroll	BH4, D(-)-Mannitol
Fase II	Kuvan tabletter til løsning	Mikstur, 10 mg/ml	Kontroll	BH4 tabletter produsert av Lyne (Lot# 140651)
Fase III	Glyserolmonooleat	Kapsel, 80 mg	Sen GI motilitet	BH4, Capmul GMO-50, Askorbinsyre
Fase IV	Karbomer prototype	Tablett, 80 mg	Gastroretentive, bioadhesive	BH4, Carbopol 71G, Noveon AA1, Askorbinsyre, PRUV
Fase V	HPMC prototype	Tablett, 80 mg	Vedvarende frigjøring	BH4, Methocel K100M Premium CR, Askorbinsyre, PRUV
Fase VI	Eudragit prototype	Kapsel, 80 mg	Protondonor polymer for å senke GI pH	BH4, Eudragit L100-55, Askorbinsyre, Kollidon CL, PRUV, Belegg (Eudragit L100-55, Carbowax PEG 4600, Etylalkohol 200 proof)
Fase VII	Multiple-flytende enheter	Multiple tabletter i kapsel, 80 mg	Gastroretentive, flytende	<i>Indre lag</i> (BH4, askorbinsyre, stearinsyre, PRUV), <i>Ytre lag</i> (stearinsyre, Eudragit L100-55, PRUV), Belegg (Etozel Standard 10FP, Carbowax PEG 4600, 95 % Etanol)
Fase VIII	Bioadhesive granuler	Granuler i kapsler, 80 mg	Gastroretentive, bioadhesive	<i>Intergranulært</i> (BH4, Methocel K100M Premium CR, Carbopol

				971, askorbinsyre), <i>Extragranulært</i> (PRUV, Pureco HSC-1 olje)
--	--	--	--	--

[0316] Plasma analyse for Biopterin: BH4 konsentrasjoner i plasma ble bestemt ved hjelp av en validert, spesifikk, revers-fase LC/MS/MS metode. Standardkurven var lineær over konsen-trasjonsområdet av 50 ng/ml til 2500 ng/ml. Den nedre grensen for kvantifisering for L-biopterin var 50 ng/ml med intradag presisjon vist ved variasjonskoeffisienter på mindre enn 5 %. L-biopterin er stabil i frossent apeplasma stabilisert med 0,1 % DET ved -70 °C inntil analysert. BH4 konsentrasjoner ble beregnet ut fra de bestemte L-biopterinkonsentrasjons-nivåer.

[0317] Farmakokinetiske og statistisk analyse: Farmakokinetiske parametere ble bestemt for plasma BH4 etter administrering av de orale og intravenøse formuleringer. De farmako-kinetiske parametere er gitt i Tabell 14.

Tabell 14

Fase, Formulering	AUC_{siste} (ng-t/ml)	AUC_∞ (ng-t/ml)	C_{max} (ng/ml)	C_{siste}^a (ng/ml)	T_{max} (t)	T_½ (t)
2, løst tablett	641 (88)	805 (36)	93,6 (31,3)	9,60 (2,20)	2,33 (0,58)	11,7 (2,1)
3, glyserol- mono-oleat	716 (154)	858 (317)	133 (83)	6,47 (3,60)	2,00 (0)	12,1 (10,3)
4, bioadhesiv polymer	593 (50,6)	648 (114)	108 (15)	4,46 (3,36)	2,67 (0,58)	6,89 (3,51)
5, vedvarende frigjøring	355 (134)	472 (36)	86,0 (43,1)	12,9 (12,4)	3,33 (0,58)	5,30 (1,73)
6, proton donor	276 (49,8)	282 (49)	68,3 (25,3)	2,97 (0,71)	3,33 (0,58)	1,59 (0,74)
7, flytende doseringsformer	304 (78)	b	59,9 (31,8)	5,90 (0,94)	4,00 (2,00)	b
8, bioadhesiv granulering	292 (79)	366 (40,6)	42,5 (12,6)	5,11 (2,43)	3,0 (0)	15,3 (8,2)

Resultater

[0318] Målet med denne studien var å identifisere formuleringer som forbedrer biotilgjengeligheten BH4 sammenlignet med kontroll oppløst tablettformuleringen. De gjennomsnittlige

plasma BH4 konsentrasjon-tidsprofiler for de forskjellige doseringsformer og kontrollformuleringen etter den orale administrering av BH4 er vist i Figur 35, og de BH4 farmakokinetiske parametere avledet fra plasmakonsentrasjon-tidsprofiler er gitt i Tabell 14. Kontrollformuleringen (fase 2) er den løste tablett.

- 5 **[0319]** Som vist i Figur 35 gir glycerylmono-oleat formuleringen den høyeste AUC_{siste} og AUC_{∞} som henholdsvis er 716 ng-t/ml og 858 ng-t/ml. Kontrollen med oppløst-BH4-tablettformuleringen viste AUC_{siste} og AUC_{∞} som henholdsvis er 641 ng-t/ml og 805 ng-t/ml (Tabell 14). Den stigende rekkefølgen av formuleringene fra mest til minst biotilgjengelige er: glycerylmono-oleat > løst tablett > bioadhesiv polymertablett > vedvarende frigjøringstablett > 10 flytende doseringsformer > bioadhesive granuleringskapselprodukt > Protodonor kapselproduktet.

EKSEMPEL 6

Fremstilling av intravenøs formulering av tetrahydrobiopterin *Preformuleringsstabilitetsevaluering*

- 15 **[0320]** Generelt var målet med denne studien er å evaluere stabiliteten av BH4 i bufferløsninger varierende i pH fra pH 1 til 7 (se Tabell 15) og i nærvær og fravær av antioksidanter og med eller uten inert gass i reaksjonsløsningene (se Tabell 16).

Tabell 15 Komponenter og sammensetning av bufferløsninger som skal brukes for BH4 Preformuleringsstabilitetsstudier

Komponenter	Mengde
<u>pH 1,2 Buffer (0,1 N HCl)</u>	
Konsentert HCl (12 N)	8,33 ml
Natriumklorid	2,92 g
Destillert/deionisert vann qs	1000 ml
<u>pH 2,1 Buffer (0,1 N HCl)</u>	
pH 1,2 (0,1 N HCl) buffer	100 ml
Natriumklorid	7,79 g
Destillert/deionisert vann qs	1000 ml
<u>pH 3 Buffer</u>	
Fosforsyre, 15 M, 85 %	0,347 ml
Natriummonobasisk fosfat, vannfritt (NaH_2PO_4)	6,17 g
Natriumklorid	6,16 g
Destillert/deionisert vann qs	1000 ml
<u>pH 4 Buffer</u>	
Iseddik, 100 %	2,38 ml
Natriumacetat, trihydrat	1,29 g
Natriumklorid	8,22 g
Destillert/deionisert vann qs	1000 ml
<u>pH 5 Buffer</u>	
Iseddik, 100 %	0,87 ml
Natriumacetat, trihydrat	4,78 g

Natriumklorid	6,72 g
Destillert/deionisert vann qs	1000 ml
pH 6 Buffer	
4-mofolinetansulfonsyre (MES)-monohydrat	4,99 g
MES Natriumsalt	5,75 g
Natriumklorid	7,23 g
Destillert/deionisert vann qs	1000 ml
pH 7 Buffer	
Natriummonobasisk fosfat, monohydrat (NaH_2PO_4)	2,56 g
Natriumdibasisk fosfat, vannfritt (NaH_2PO_4)	5,75 g
Natriumklorid	7,23 g
Destillert/deionisert vann qs	1000 ml

Tabell 16 Sammensetning av bufferløsninger for stabilitetsstudier som inneholder BH4 med eller uten antioksidant og om utsatt for gassoversprøyting eller ikke

pH	Studiegruppenummer				
	1	2	3	5	6
	Bufferstudie	Buffer + askorbinsyre-studie	Buffer + L-cysteinestudie	Buffer + argongjennom-boblingsstudie	Buffer + oksyngsgjennom-boblingsstudie
1	1 mg/ml BH4 i pH 1,2 buffer	1 mg/ml BH4 og 1 mg/ml askorbinsyre i pH 1,2 buffer	1 mg/ml BH4 og 1 mg/ml L-cystein i pH 1,2 buffer	1 mg/ml BH4 i pH 1,2 buffer og argon-gjennom-boblet og argon teppeforseglet	1 mg/ml BH4 i pH 1,2 buffer og oksygen-gjennom-boblet og O ₂ teppeforseglet
2	1 mg/ml BH4 i pH 2,1 buffer	1 mg/ml BH4 og 1 mg/ml askorbinsyre i pH 2,1 buffer	1 mg/ml BH4 og 1 mg/ml L-cystein i pH 2,1 buffer	1 mg/ml BH4 i pH 2,1 buffer og argon-gjennom-boblet og argon teppeforseglet	1 mg/ml BH4 i pH 2,1 buffer og oksygen-gjennom-boblet og O ₂ teppeforseglet
3	1 mg/ml BH4 i pH 3 buffer	1 mg/ml BH4 og 1 mg/ml askorbinsyre i pH 3 buffer	1 mg/ml BH4 og 1 mg/ml L-cystein i pH 3 buffer	1 mg/ml BH4 i pH 3 buffer og argon-gjennom-boblet og argon teppeforseglet	1 mg/ml BH4 i pH 3 buffer og oksygen-gjennom-boblet og O ₂ teppeforseglet
4	1 mg/ml BH4 i pH 4 buffer	1 mg/ml BH4 og 1 mg/ml askorbinsyre i pH 4 buffer	1 mg/ml BH4 og 1 mg/ml askorbinsyre i pH 4 buffer	1 mg/ml BH4 i pH 4 buffer og argon-gjennom-boblet og argon teppeforseglet	1 mg/ml BH4 i pH 4 buffer og oksygen-gjennom-boblet og O ₂ teppeforseglet
5	1 mg/ml BH4 i pH 5	1 mg/ml BH4 og 1 mg/ml	1 mg/ml BH4 og 1 mg/ml L-	1 mg/ml BH4 i pH 5 buffer	1 mg/ml BH4 i pH 5 buffer

	buffer	askorbinsyre i pH 5 buffer	cystein i pH 5 buffer	og argon-gjennomboblet og argon teppeforseglet	og oksygen-gjennomboblet og O ₂ teppeforseglet
6	1 mg/ml BH4 i pH 6 buffer	1 mg/ml BH4 og 1 mg/ml askorbinsyre i pH 6 buffer	1 mg/ml BH4 og 1 mg/ml L-cystein i pH 6 buffer	1 mg/ml BH4 i pH 6 buffer og argon-gjennomboblet og argon teppeforseglet	1 mg/ml BH4 i pH 6 buffer og oksygen-gjennomboblet og O ₂ teppeforseglet
7	1 mg/ml BH4 i pH 7 buffer	1 mg/ml BH4 og 1 mg/ml askorbinsyre i pH 7 buffer	1 mg/ml BH4 og 1 mg/ml L-cystein i pH 7 buffer	1 mg/ml BH4 i pH 7 buffer og argon-gjennomboblet og argon teppeforseglet	1 mg/ml BH4 i pH 7 buffer og oksygen-gjennomboblet og O ₂ teppeforseglet

[0321] Mer spesifikt ble innflytelsen av å kombinere to antioksidanter i nærvær eller fravær av inert gass evaluert ved pH 4 for å støtte formuleringen av et flytende produkt, og ved pH 7 for å fastslå bidraget av ustabilitet ved fysiologisk pH på den lave biotilgjengelighet av forbindelsen i aper og mennesker (Se Tabell 17 og 18). Stabiliteten av BH4 forventes å være temperaturavhengig. Derfor ble forbindelsesstabiliteten evaluert ved 2-8 °C, 25 °C, 30 °C og 37 °C for å støtte fastsettelse av prediktiv langsiktige hylletiden for forbindelsen ved forskjellige temperaturer. Bestemmelse av stabiliteten av forbindelsen ved den fysiologiske temperaturen på 37 °C gir data som støtter estimering av stabilitetslevetiden av en formulert oral doseringsform i absorptive regioner av gastrointestinal tractus.

Tabell 17 Sammensetning av bufferløsninger for pH 4 stabilitetsstudium av BH4

pH 4	pH 4
Buffer + askorbinsyre + L-cysteinstudie	Buffer + askorbinsyre + L-cystein + argon-gjennomblingsstudie
1 mg/ml BH4 og 1 mg/ml askorbinsyre og 1 mg/ml L-cystein i pH 4 buffer	1 mg/ml BH4 og 1 mg/ml askorbinsyre og 1 mg/ml L-cystein i pH 4 buffer og argon-gjennomboblet og argon-teppeforseglet

Tabell 18 Sammensetning av bufferløsninger for pH 7 stabilitetsstudium av BH4

pH 7	pH 7
Buffer + askorbinsyre + L-cysteinstudie	Buffer + askorbinsyre + L-cystein + argon-gjennomblingsstudie
1 mg/ml BH4 og 1 mg/ml askorbinsyre og 1 mg/ml L-cystein i pH 7 buffer	1 mg/ml BH4 og 1 mg/ml askorbinsyre og 1 mg/ml L-cystein i pH 7 buffer og argon-gjennomboblet og argon-teppeforseglet

[0322] Foreslåtte prøvetakingstider for studier som skal gjennomføres i forskjellige buffer-løsninger ble beregnet ved å sammenligne halveringstiden fra en enkelt undersøkelse ved pH 3.1 med data innhentet av Davis, et al. (1988; Eur. J. Biochem. 173, 345-351, (1988)), i pH 6,8 Tris- og fosfatbuffer. Stabilitetsstudiet av en pH 3,1-løsning ga en estimert $t_{1/2}$ på 17769 min (12,3 dager), og arbeidet til Davis et al ga en $T_{1/2}$ på 10 min i fosfatbuffer pH 6,8 og 14 min i pH 6,8 Trisbuffer. Disse to studiene antyder en størrelsesorden på reduksjon i halveringstid (dvs. en størrelsesorden på økning i reaktivitet) av BH4 for hver en-gangers økning i pH (se Tabell 19). Basert på denne tilnærmingen ble pH 1,2 til pH 3 løsninger samlet ukentlig i startfasen og prøvetakingstidsrettelser ble om nødvendig gjort etter at de første 2 datapunktene ble samlet. De estimerte prøvetakingstider ved 25 °C er gitt i Tabell 19.

Tabell 19 Forslag prøvetakingstider ved ulike pH basert på målte halveringstider av BH4 og teoretisk halveringstider avledet fra dem

pH	Målt $t_{1/2}$ (min)	Estimert $t_{1/2}$ basert på $t_{1/2}$ oppnådd ved pH 3 (min) ^a	Først foreslåtte ^c prøvetakingstid
1,0	-	776900,0 (1234 dager)	Hver 7. dag
2,0	-	177690,0 (123,4 dager)	Hver 7. dag
3,0	17769,0 (12,34 dager)	17769,0 (12,34 dager)	Hver 96. dag
4,0	-	1776,9 (1,23 dager)	Hver 12. time
5,0	-	177,7 (0,12 dager)	Hver ½ time
6,0	-	17,7 (0,01 dager)	Hvert 5. minutt ^d
6,8 ^b	10 (fosfat) 14 (tris)		
7,0	-	1,8	hvert ½ minutt ^d

^a Estimert $t_{1/2}$ er basert på endring av en størrelsesorden, halveringstiden oppnådd ved pH 3,0 for hver en-gangers endring i pH. pH <3 økes oppover mens pH > 3 reduseres nedover med en størrelsesorden på en trinnsvis måte til å omtrent matche pH 6,8 data innhentet av Davis et al. ^bData fra Davis, et al.1988; Eur. J. Biochem., 173, 345-351, (1988)

^c Prøvetaking kan endres

^d Reaksjonsløsninger blir samlet og slukket så raskt som mulig og krever en stoppeklokke og 2 personer, en prøvetaker/slukker og den andre registrerer nøyaktig tiden i en notatbok i minutter og/eller sekunder

[0323] Studier ble utført i pH 1-7 bufferløsninger og ved 5 °C, 25 °C, 30 °C og 37 °C. Selv om disse studiene ble utført i ikke-hermetisk lukkede beholdere, reduserte antioksidanter alene (askorbinsyre eller L-cystein) eller kombinert sammen (askorbinsyre + L-cystein) hastigheten av tap eller nedbrytning av BH4 (se Figur 36 og Figur 37). Oversprøyting av en løsning inneholdende både askorbinsyre og L-cystein forbedret stabiliteten av BH4 betydelig.

[0324] Hastigheten av nedbrytning av BH4 er konsentrasjonsavhengig (se Figur 38). Derfor ble høy-dose, høykonsentrerte formuleringer av BH4 vist å kreve lavere konsentrasjon av stabilisatorer for synergistisk stabilisering av formuleringene.

[0325] Disse resultatene viser at formulering med lang holdbarhet, stabile, flytende formuleringer kan fremstilles i henhold til metoder og sammensetninger som er beskrevet her, inkludert sterile injiserbare væsker, orale væsker, og lyofilisert og sterile pulvere for konstitusjonsformuleringer.

5 EKSEMPEL 7

Flytende og Lyofiliserte Formuleringer av Tetrahydrobiopterin for Oral og Parenteral Anvendelse

Eksempelsammensetninger av Formuleringer

[0326]

10 **Tabell 20 Spesifikk formulering buffret ved pH 4 med askorbinsyre som stabilisator**

Komponenter	Mengde (mg)	% vekt/volum	Funksjon
BH4	1,00	0,10	Aktiv substans
Askorbinsyre	10,00	1,00	Antioksidant
Sitronsyre	6,56	0,66	Bufferagent
Natriumsitrat, dihydrat	5,53	0,55	Bufferagent
Vann til injeksjon qs	1,00 ml	1,00 ml	Fortynningsmiddel

Tabell 21 Formulering buffret ved pH 4,0 inneholdende en kombinasjon av to stabilisatorer: askorbinsyre og natriummetabisulfitt

Komponenter	Mengde (mg)	% vekt/volum	Funksjon
BH4	1,00	0,10	Aktiv substans
Askorbinsyre	2,50	0,25	Antioksidant
Natriummetabisulfitt	2,50	0,25	Antioksidant
Sitronsyre	6,56	0,66	Bufferagent
Natriumsitrat, dihydrat	5,53	0,55	Bufferagent
Vann til injeksjon qs	1,00 ml	1,00 ml	Fortynningsmiddel

15 **Tabell 22 Formulering buffret ved pH 4,0 inneholdende en kombinasjon av tre stabilisatorer: L-cystein, askorbinsyre og natrium-metabisulfitt**

Komponenter	Mengde (mg)	% vekt/volum	Funksjon
BH4	1,00	0,10	Aktiv substans
Askorbinsyre	2,00	0,20	Antioksidant
Natriummetabisulfitt	2,00	0,20	Antioksidant
L-cystein	4,00	0,40	Antioksidant
Sitronsyre	6,56	0,66	Bufferagent
Natriumsitrat, dihydrat	5,53	0,55	Bufferagent
Vann til injeksjon qs	1,00 ml	1,00 ml	Fortynningsmiddel

Tabell 23 Formulering buffret ved pH 7,0 inneholdende bare askorbinsyre bare som stabilisator

Komponenter	Mengde (mg)	% vekt/volum	Funksjon
BH4	10,00	1,00	Aktiv substans
Askorbinsyre	50,00	5,00	Antioksidant
Natriummonobasisk fosfat, monohydrat	10,24	0,10	Bufferagent
Natriumdibasisk fosfat	17,76	0,18	Bufferagent
Vann til injeksjon qs	1,00 ml	1,00 ml	Fortynningsmiddel

5

Tabell 24 Formulering buffret ved pH 7,0 inneholdende askorbinsyre natriummetabisulfitt som stabilisatorer

Komponenter	Mengde (mg)	% vekt/volum	Funksjon
BH4	10,00	1,00	Aktiv substans
Askorbinsyre	20,00	2,00	Antioksidant
Natriummetabisulfitt	15,00	1,50	Antioksidant
Natriummonobasisk fosfat, monohydrat	10,24	0,26	Bufferagent
Natriumdibasisk fosfat	17,76	0,44	Bufferagent
Vann til injeksjon qs	1,00 ml	1,00 ml	Fortynningsmiddel

Tabell 25 Formulering buffret ved pH 7,0 inneholdende askorbinsyre, natriummetabisulfitt og L-cystein som stabilisatorer

Komponenter	Mengde (mg)	% vekt/volum	Funksjon
BH4	10,00	1,00	Aktiv substans
Askorbinsyre	20,00	2,00	Antioksidant
Natriummetabisulfitt	15,00	1,50	Antioksidant
L-cystein	10,00	1,00	Antioksidant
Natriummonobasisk fosfat, monohydrat	10,24	0,26	Bufferagent
Natriumdibasisk fosfat	17,76	0,44	Bufferagent
Vann til injeksjon qs	1,00 ml	1,00 ml	Fortynningsmiddel

10

Høy-dose flytende formuleringer [0327]

Tabell 26 Formulering buffret ved pH 6,0 inneholdende askorbinsyre bare som stabilisator

Komponenter	Mengde (mg)	% vekt/volum	Funksjon
BH4	50,00	0,10	Aktiv substans
Askorbinsyre	7,50	0,75	Antioksidant
Sitronsyre	5,30	0,53	Bufferagent
Natriumsitrat, dihydrat	51,4	5,14	Bufferagent
Vann til injeksjon qs	1,00 ml	1,00 ml	Fortynningsmiddel

Tabell 27 Formulering buffret ved pH 6,0 inneholdende en kombinasjon av to stabilisatorer: askorbinsyre og natriummetabisulfitt

Komponenter	Mengde (mg)	% vekt/volum	Funksjon
BH4	50,00	5,00	Aktiv substans
Askorbinsyre	2,50	0,25	Antioksidant
Natriummetabisulfitt	2,50	0,25	Antioksidant
Sitronsyre	5,30	0,53	Bufferagent
Natriumsitrat, dihydrat	51,4	5,14	Bufferagent
Vann til injeksjon qs	1,00 ml	1,00 ml	Fortynningsmiddel

Tabell 28 Formulering buffret ved pH 6,0 inneholdende en kombinasjon av tre stabilisatorer: L-cystein, askorbinsyre og natriummetabisulfitt

5

Komponenter	Mengde (mg)	% vekt/volum	Funksjon
BH4	1,00	0,10	Aktiv substans
Askorbinsyre	2,00	0,20	Antioksidant
Natriummetabisulfitt	2,00	0,20	Antioksidant
L-cystein	4,00	0,40	Antioksidant
Sitronsyre	6,56	0,66	Bufferagent
Natriumsitrat, dihydrat	5,53	0,55	Bufferagent
Vann til injeksjon qs	1,00 ml	1,00 ml	Fortynningsmiddel

Tabell 29 Oral formulering buffret ved pH 3,0 citratbuffer og inneholdende askorbinsyre bare som stabilisator

Komponenter	Mengde (mg)	% vekt/volum	Funksjon
BH4	10,00	1,00	Aktiv substans
Askorbinsyre	20,00	2,00	Antioksidant
Sukrose	200,00	20,00	Søtningsmiddel
Appelsinsmak	1,00	0,10	Smakstilsetning
Sitronsyre	8,98	0,90	Bufferagent
Natriumsitrat, dihydrat	2,13	0,21	Bufferagent
Vann til injeksjon qs	1,00 ml	1,00 ml	Fortynningsmiddel

Tabell 30: Oral formulering buffret ved pH 3,5 tartratbuffer og inneholdende askorbinsyre og natriummetabisulfitt som stabilisatorer

10

Komponenter	Mengde (mg)	% vekt/volum	Funksjon
BH4	10,00	1,00	Aktiv substans
Askorbinsyre	20,00	2,00	Antioksidant
Natriummetabisulfitt	5,00	0,50	
Sukrose	200,00	20,00	Søtningsmiddel
Grapefruktsmak	1,00	0,10	Smakstilsetning
Vinyre	1,34	0,13	Bufferagent
Natriumtartrat dibasisk dihydrat	8,39	0,84	Bufferagent

Vann til injeksjon qs	1,00 ml	1,00 ml	Fortynningsmiddel
-----------------------	---------	---------	-------------------

Tabell 31: Oral formulering buffret ved pH 3,5 i eplesyre basert buffer og inneholdende askorbinsyre og natriummetabisulfitt som stabilisatorer

Komponenter	Mengde (mg)	% vekt/volum	Funksjon
BH4	10,00	1,00	Aktiv substans
Ascorbinsyre	20,00	2,00	Antioksidant
Natriummetabisulfitt	15,00	1,50	
Sukrose	200,00	20,00	Søtningsmiddel
Eplesmak	1,00	0,10	Smakstilsetning
Eplesyre	3,07	0,31	Bufferagent
Natriummalat dibasisk	4,91	0,49	Bufferagent
Vann til injeksjon qs	1,00 ml	1,00 ml	Fortynningsmiddel

- 5 **[0328]** Ovenstående formulert eller sammensatte løsninger er eventuelt oversprøytet med en inert gass (f.eks. argon eller nitrogen) eller karbondioksid i blandingstanken og primære beholdere forseglet fortrinnsvis under et teppe av inert gass eller karbondioksid for å fjerne oksygen fra beholderens frivolum. Formuleringene kan skaleres opp til ethvert volum ved å multiplisere komponentmengdene med en passende oppskaleringsfaktor.

10 **EKSEMPEL 8**

LC/MS/MS Bestemmelse av tetrahydrobiopterin (BH4) i humant plasma ved å måle l-biopterin konsentrasjon ved oksidasjon under basiske betingelser

- 15 **[0329]** Tetrahydrobiopterin (BH4) er et lite, terapeutisk molekyl for behandling av pasienter med fenylketonuri (PKU). Det er viktig å ha en nøyaktig og spesifikk metode for å måle BH4 konsentrasjoner i humant plasma. Imidlertid er det en utfordring å kvantifisere BH4 i humant plasma på grunn av dets lav endogene konsentrasjon og ustabilitet. Under basiske forhold er BH4 oksidert til dihydrobiopterin (BH2) og til slutt til L-Biopterin. I tillegg er omdannelses-
 20 rationen for oksidasjonen av BH4 til L-Biopterin nesten konstant opp til 23 uker. Ved å måle L-Biopterin konsentrasjon ved oksidasjon under basiske forhold, og anvende en molar konverteringsratio, kan vi således med sikkerhet bestemme BH4 konsentrasjonene i humant plasma.

- 25 **[0330]** Publiserte metoder er basert på den klassiske metoden utviklet av Fukushima og Nixon (Anal. Biochem., 102, 176-188 (1980)) ved anvendelse av HPLC med fluorescensdeteksjon. I LC/MS/MS-metoden ble den humane plasmaprøven stabilisert med antioksidant, tilsatt en intern standard (IS)-løsning og gjort basisk med natriumhydroksydøsning, deretter oksydert med jodløsning. Ved inkubasjon i mørke ved romtemperatur tilsettes askorbinsyre for å redusere overskuddet av jod. Oksiderte prøver ble ekstrahert ved protein felling. L-Biopterin i

de rekonstituerte ekstraktene ble analysert ved hjelp av revers-fase HPLC med Turbo Ion Spray® MS/MS deteksjon. Negative ioner for L-Biopterin ble overvåket i MRM modus. Legemiddel-til-IS toppareal-forholdstall for standardene ble anvendt for å lage en lineær kalibreringskurve ved anvendelse av $1/x^2$ -vektet minste kvadraters regresjonsanalyse.

[0331] Oksydasjonens omdannelsesratio av BH4 til L-Biopterin ble evaluert ved flere tidspunkter: 0, 1, 2, 4, 8, 12 og 23 uker, og funnet konsistent ved alle de testede tidspunkter med en nominell molart omdannelsesrasjon på 47,3 % bestemt fra de tre første påfølgende tidspunkter. Forskjellen mellom omdannelsesratioen på andre tidspunkter og den nominelle verdien spenner fra -2,3 til 6,3 %. LC/MS/MS metoden ble validert å kvantifisere L-Biopterin i K₂ EDTA humant plasma i det lineære kalibreringsområdet fra 5 til 1000 ng/ml (tilsvarende 11-2114 ng/ml for BH4). Analysepresisjonen og nøyaktigheten ble evaluert med kvalitetskontroll prøver ("Quality control samples" QCs) og resultatene viste intradag presisjon på mellom 4,7 til 14,5 % CV, intradag nøyaktighet på mellom -7,1 og 7,4 % nominelle verdier, og interdag presisjon og nøyaktighet på henholdsvis 7,4 til 16,4 % CV og -8,3 til 3,7 % nominelle verdier. Gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte for L-Biopterin var 65,3 %. I K₂ EDTA humant plasma, ble L-Biopterin funnet å være stabil ved romtemperatur i minst 4 timer og etter 4 fryse-tine sykluser, og ved -70 °C i minst 275 dager.

EKSEMPEL 9

Fastsettelse av BH4/BH2/B ved Anvendelse av HPLC med Elektrokjemisk- og Fluorescensdeteksjon

[0332] En studie ble utført for å utvikle en metode for å bestemme tetrahydrobiopterin (BH4)-, dihydrobiopterin (BH2)- og biopterin (B)-konsentrasjoner i humant plasma ved hjelp av revers-fase høy-ytelse væskechromatografi (HPLC) med fluorescensdeteksjon (FD) og elektrokjemiskdeteksjon (ECD). Metoden er basert på Cai et al. (Cardiovascular Research 55: 838-849, 2002).

[0333] Stamsløsninger av BH4 (i 20 mM HCl), BH2 og B (i DMSO) ble laget til en endelig konsentrasjon på 10 mM og lagret ved -80 °C. Arbeidsløsninger av kalibreringsstandard ble fremstilt fra stamsløsning som 100, 10, 7,5, 5, 2,5 og 1 nM i K₂ EDTA humant plasma modifisert med 0,1 % (vekt/vol) 1,4-Ditioerytritol (DTE). Kvalitetskontroll arbeidsløsninger av BH4, BH2 og B ble fremstilt som 5, 8, 25 og 50 nM i K₂ EDTA humant plasma modifisert med 0,1 % (vekt/vol) DTE og lagret ved -80 °C.

[0334] For prøvebehandling, ble plasma fortynnet 1:10 i resuspensjon buffer. Til 180 µl av det fortynnete plasma, ble 20 µl av 10X presipiteringsbuffer tilsatt. Denne prosessen av plasmafortynning og presipitering ble brukt på alle plasmastandarder, plasmaprøver og plasma-QCs. Etter tilsetningen av 10X presipiteringsbuffer, ble prøven sentrifugert ved maksimal hastighet

ved 4 °C i 5 min for å fjerne ikke-spesifikkke plasmarester. 150 ml supernatant ble deretter overført til en prøveampulle og deretter plassert på en autosampler for en 100 ml injeksjon.

[0335] Den mobile fasen (2 l) ble fremstilt med 13,6 g natriumacetat (50 mM), 2,1 g sitronsyre (5 mM) 36 mg EDTA (48 mM), 49,4 mg DTE (160 mM), og 2 volum% metanol i vann. pH ble justert til 5,22. Resuspenderingsbuffer (20 ml) ble fremstilt med 20 ml PBS pH 7,4 (50 mM), 20 µl av 1 M DTE (1 mM), og 100 ml av 100 µM EDTA. 10X presipiteringsbuffer (25 ml) ble nylaget med 2,88 ml fosforsyre (IM), 9,39 g trikloreddiksyre (2 M) og 20 ml 1M DTE (1 mM).

[0336] Tetrahydrobiopterin (BH4), dihydrobiopterin (BH2), og Biopterin (B) ble separert ved hjelp av revers-fase HPLC separasjon. BH4 ble målt ved hjelp av elektrokjemiskdeteksjon der BH4 er oksidert ved elektrode-1 til kinonoid-dihydrobiopterin (qBH2) og deretter redusert tilbake til BH4 ved elektrode-2. Detektoren bruker deretter strøm generert av denne reduksjonsreaksjonen for å bestemme konsentrasjonen av BH4. BH2 og B kan måles ved samme injeksjon ved hjelp av fluorescensdeteksjon. Post-kolonne oksidasjon av BH2 ved anvendelse av en kondisjoneringsvaktcelle ved det optimale potensialet, oksiderer BH2 til Biopterin.

[0337] HPLC-separasjon ble utført på en ACE C-18 (250 mm x 4,6 mm) kolonne, 5 µM, med en strømningshastighet på 1,3 ml/min med en driftstid på 13 minutter. Elektrokjemisk-deteksjons innstillinger var El: + 100 mV (bakgrunn strøm +500 nA til +600 nA) og E2: -300 mV (bakgrunnstrøm -50 nA til -60 nA). Post-kolonne oksidasjon ble satt til 900 mV. Fluorescensdeteksjons innstillinger var eksitasjonsbølgelengde: 350 nM og emisjonsbølgelengde: 450 nM.

[0338] Linearitet og område av metoden ble vurdert basert på presisjon og nøyaktighet av standardene i plasma og buffer. Standardkurven konsentrasjonen ble etablert ved hjelp av minst 4-6 ikke-null konsentrasjoner for hver analytt. Konsentrasjonen av standardene var 1, 2,5, 5, 7,5, 10, og 100 nM. Resultatene viste en lineær tilpasning fra 1 til 100 nM for BH4, og B med R2 på > 0,99.

[0339] Nøyaktigheten ble bestemt ved replikattesting av kvalitetskontrollprøver som inneholdt kjente mengder (2, 8, 25, og 50 nM) av analytten og uttrykt som en prosent nøyaktighet.

Presisjon beregnes også på grunnlag av data fra kvalitetskontrollene. Intra-assay presisjon og inter-assay presisjon ble vurdert basert på CV%. På tre separate forsøksanalyseringer ble konsentrasjoner av hver analytt fremstilt i plasma og analysert. I tillegg ble 10 nM BH4, BH2, og B ble tilsatt til humane plasmaprøver for å bestemme nøyaktighet og utbytte. Målingene av BH4 BH2, og B på 8, 25, og 50 nM viste nøyaktig innenfor 112 % -89 % og demonstrert presisjon (CV%) på 2,5 % -20 %. Utbytteforsøk etter tilsetning av 10 nM BH4, BH2 og B i kliniske prøver av humant plasma viste utbytte på mellom 70 % -130 %. Resultatene viser at metoden er nøyaktig og presis for prøver med konsentrasjoner større enn 2 nM.

[0340] For å sjekke for tilstedeværelsen av endogen interferens i seks forskjellige lot'er av plasma, ble 10 nM BH4, BH2, og B tilsatt til seks ulike lot'er av plasma og den bestemte

nøyaktighet og presisjon ble bestemt for hver plasmaprøve. Selektivitetseksperimenter viser at de seks personene hadde endogen baseline av BH4 nivåer på mellom under kvantifiserbar grense til 2,48 nM. Tilsvarende varierte BH2 og B konsentrasjoner fra 0,02 til 10 nM. Utbyttet av de 10 nM tilsatte analytter varierte fra 69 % -87 %. Variasjonen (CV%) over de enkelte plasmaprøver og analytter når tilsatt som 10 nM varierte fra 23 % -37 %. Variasjonen av de endogene nivåene av BH4 BH2 og B varierte fra 0-9,96 nM. Til sammen indikerer resultatene en utvikling som tyder på matriksinterferens eller tap under ekstraksjon, men indikerer ikke sterk selektivitet mellom individer.

[0341] For å måle matrikseffekt ble standardkurver fremstilt i plasma eller buffer sammenlignet for nøyaktighet (recovery), linearitet og korrelasjon. Sammenligning av de standardene som fremstilt i plasma kontra standarder fremstilt i buffer viser en beskjeden matrikseffekt og generelt god korrelasjon. Alle tre analytter hadde gode lineære tilpasning for plasma og buffer. BH4 og B viste ikke signifikante matrikseffekter over konsentrasjonsområdet. BH2, derimot, hadde lavere utbytte ved den høyeste standardkonsentrasjonen (100 nM). Kvalitetskontrollprøvene fremstilt i buffer og plasma vist god nøyaktighet. Samlet synes matrixeffekter å være minimal, med en trend mot lavere utbytte i buffer i forhold til plasma. Fordi BH4 og BH2 lett oksideres, bør innsamlede plasma- og prøvebuffer inneholde antioksidanter og har lav pH når det er mulig.

[0342] For å teste evnen til nøyaktig å fortynne en plasma- og bufferprøve tilsatt 250 nM av BH4 BH2 og B, ble plasma fortynnet med rent plasma i en 3-ganger fortynningsserie. De fortynnede prøvene ble analysert og sammenlignet med den nominelle verdien etter at fortynningsfaktoren ble anvendt. Fortynningen av høye konsentrasjoner av BH4, BH2, og B kan bli fremstilt nøyaktig. For BH4 var de observerte konsentrasjonene etter fortynning mellom 83 % - 104 % nøyaktige for konsentrasjoner mellom 83.33 nM og 3,07 nM. BH2 var 74 % - 80 % nøyaktig over det kvantitative område (83 nM-3 nM). B var 119 % -113 % nøyaktige over det kvantitative område (83 nM-3 nM). Derfor kan en prøve som er over den kvantitative grensen fortynnes nøyaktig.

[0343] Fire konsentrasjoner av analytter (2, 8, 25 og 50 nM) ble fremstilt i plasma og frosset i minimum 24 timer i en syklus og et minimum av 12 timer i andre sykluser for et minimum av tre sykluser. Prøver ble tint uten hjelp ved romtemperatur mellom frosne perioder. Nøyaktigheten og variasjonen etter hver og alle fryse-tine-sykluser ble vurdert for å fastslå det maksimale antall sykluser en prøve kunne gjennomgå. BH4-, BH2-, og B-holdige prøver kan gjennomgå opptil 3 fryse-tine-sykluser uten betydelig endring i nøyaktighet eller presisjon av målingen. Plasmaprøver med 8 nM-50 nM BH4 er 121 % -91 % nøyaktig og CV% mindre enn 10 %. Tilsvarende BH2-målinger var 77 % - 88 % nøyaktig over det kvantitative området av analysen. B-målinger var 98 % -99 % nøyaktig over det kvantitative området med presisjon (CV%) på 5 % -8 %. 2 nM-prøvene av BH4, BH2 og B var ikke nøyaktige eller presise etter gjentatt frysing og tining. Derfor kan standarder, kvalitetskontroller og testprøver fryses og tines opp til 3 ganger.

[0344] Fordi analyttene er følsomme for oksydasjon undersøkte vi langsiktig frysestabilitet for å etterligne forventede lagringsforhold. Fire konsentrasjonsnivåer (2, 8, 50, og 100 nM) av BH4, BH2, og B ble fremstilt i plasma og lagret ved -70 °C i 8 uker. Stabilitetsprøver ble analysert nylaget og i uke 3, 5, 6, og 8. BH4 og B hadde god langsiktig frysestabilitet. BH2 viste redusert prøvekonsentrasjon etter langvarig lagring. I løpet av de åtte ukene med lagring var plasmaprøver med BH4 93 % -94 % nøyaktige og hadde CV% på mellom 31 % -0,21 %, med mest variasjon sett for 2 nM konsentrasjonen. BH2-målinger var 63 % -85 % nøyaktige over konsentrasjonene testet med redusert nøyaktighet for 2 nM og 100 nM konsentrasjonene. Presisjonen (CV%) varierte fra 37 % til 18 % for disse prøvene. B-målinger var 88 % -101 % nøyaktige over konsentrasjonene testet med presisjon (CV%) på 23 % -0,14 %, med høyest variasjon for 2 nM-konsentrasjonen. Tilsammen støtter disse dataene anbefalingen om å lagre prøvene i opptil 8 uker uten nevneverdig tap av analyttkonsentrasjon. BH2 synes å være mest utsatt for nedbrytning (oksidasjon).

[0345] For å måle stabiliteten av BH4, BH2, og autosampler, ble 8 nM av hver analytt i rekonstitueringsløsningsmiddel lagret på autosamplern i 0,25, 4, og 11 timer. Nøyaktighet og presisjon på målingene ble sammenlignet. Den observerte BH4-målingen var nøyaktig innenfor 5 % av teoretisk ved hvert tidspunkt med nøyaktighet og presisjon i alle tre målinger på henholdsvis 102 % og 0,054 %. Målingen av BH2 hadde avtagende nøyaktighet og økende variabilitet etter 4 timer. Etter 11 timer på autosamplern ble omtrent 50 % av BH2 målt. Dette indikerer dårlig autosampler-stabilitet i kjørebuffer. Målingen av B forble nøyaktig innenfor 125 % av teoretisk etter 11 timer. Derfor anbefales ikke kjøretider på mer enn 4 timer.

[0346] For å bestemme injeksjonsoverføring ("Carry-over"), ble en ekstrahert baselinje plasmaprøve satt inn etter den høyeste standardkonsentrasjon på 100 nM. Dette ble gjort for å etterligne muligheten av å overestimere konsentrasjonen av analytt i en lav konsentrasjonprøve på grunn av overføring. Injeksjonsoverføring av BH4, BH2, og B er minimal og står ikke for mer enn 1 % av toppområdet av den 100 nM øvre grense for kvantifisering. Injeksjonsoverføring utgjør cirka 5 % -20 % for den nedre grense for kvantifisering, basert på det gjennomsnittlige topparealet oppnådd for den lave kvalitetskontrollen (2 nM). Derfor bør fortrinnsvis prøvene organisert fra lavest til høy (dvs. pre-dose først, etterfulgt av post-dose prøver) og ytterligere vaskinger for periodisk å rengjøre kolonnen under en kjøring vil fortrinnsvis bli gjort for å minimere potensiell overføring.

[0347] En kvalifisert metode som var robust, spesifikk, nøyaktig og presis ble utviklet. Denne metoden er hensiktsmessig for å kvantifisere nivåene av BH4, BH2 og B i plasma for farmakokinetiske- og legemiddelstudier.

Patentkrav

1. Tetrahydrobiopterin (BH4) eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav for anvendelse ved behandling av hyperfenylalaninemi hvori BH4 eller salt derav administreres oralt i løpet av 0-30 minutter etter et måltid.

5

2. BH4 eller salt for anvendelse ifølge krav 1, hvor BH4 eller salt derav er for oral administrering med et måltid.

10

3. BH4 eller salt for anvendelse ifølge krav 1 eller krav 2, hvor måltidet omfatter et høy-fett, høy-kalori måltid.

4. BH4 eller salt for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1-3, hvori BH4 eller salt derav er for administrering ved en total daglig dose på 1 mg/kg til 20 mg/kg.

15

5. BH4 eller salt for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1-4, hvor BH4 eller farmasøytisk akseptabelt salt derav administreres oppløst i en væske.

6. BH4 eller salt for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1-5 hvor BH4 eller farmasøytisk akseptabelt salt derav administreres svelget som fast doseringsform.

20

7. BH4 eller salt for anvendelse ifølge krav 6, hvor den faste doseringsform er en tablett.

8. BH4 eller salt for anvendelse ifølge krav 6, hvor den faste doseringsform er en kapsel.

25

9. BH4 eller salt for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1-8, hvor BH4 eller farmasøytisk akseptabelt salt er for administrering bare én gang per dag.

10. BH4 eller salt for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1-9, hvor pasienten lider av fenylketonuri (PKU), inkludert mild eller klassiske PKU.

30

11. BH4 eller salt for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1-10 hvor BH4 eller salt derav blir administrert innen 5-20 minutter etter et måltid.

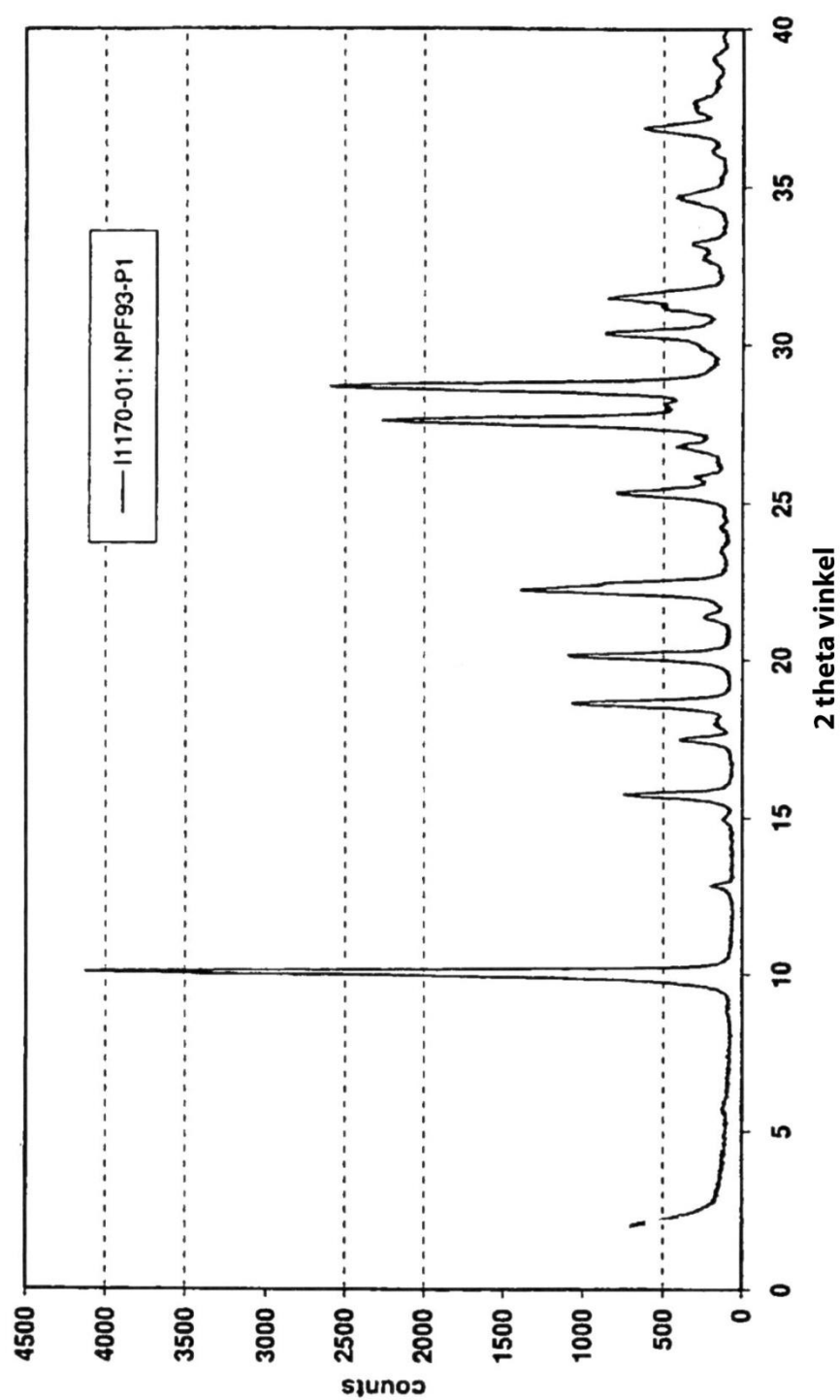
35

12. BH4 eller salt for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1-11 hvor BH4 eller salt derav blir administrert på samme tid av dagen én gang per dag.

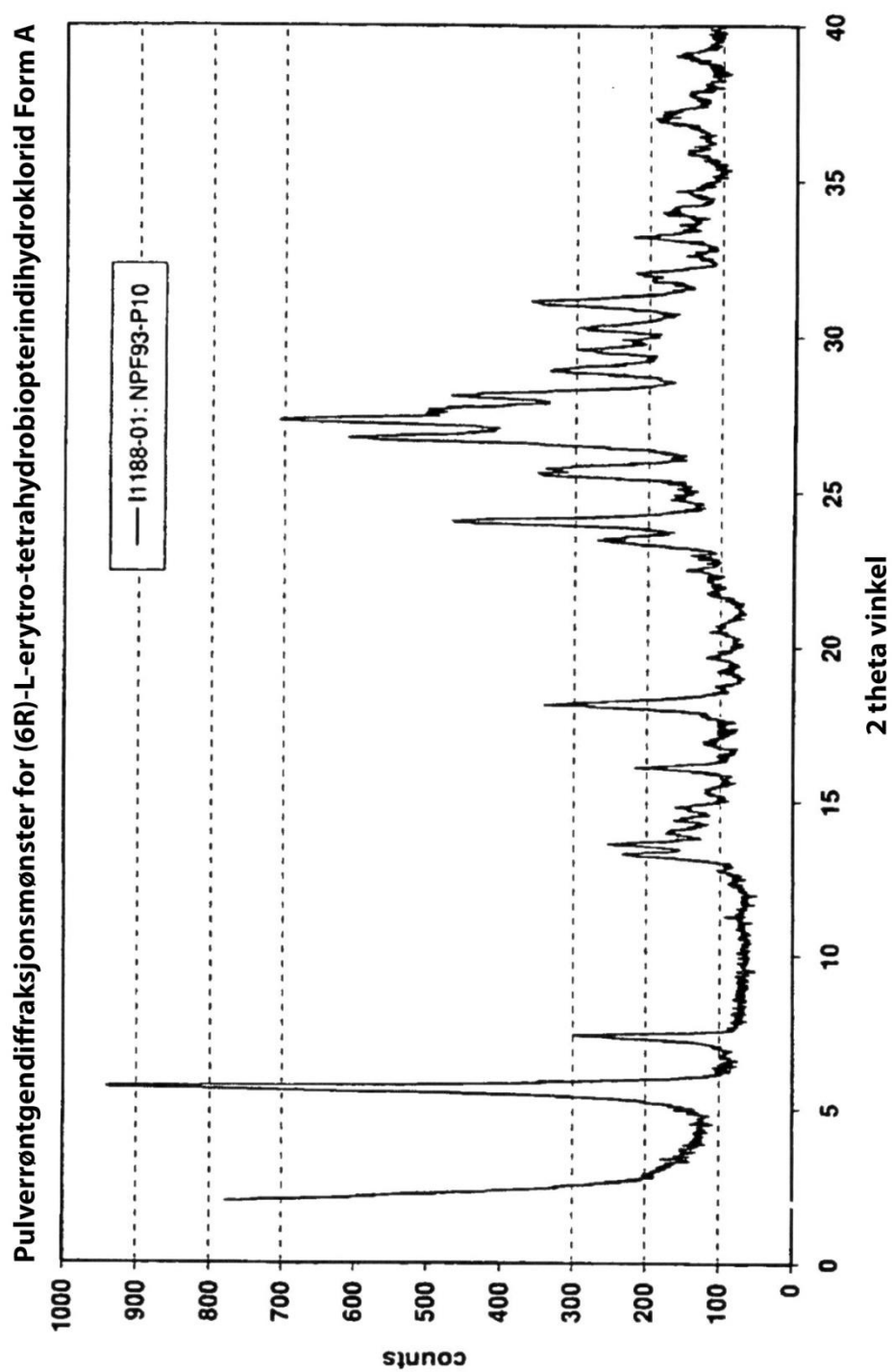
13. BH4 eller salt for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1-12, hvor BH4 administreres med et måltid for å øke BH4 absorpsjon.

Figur 1

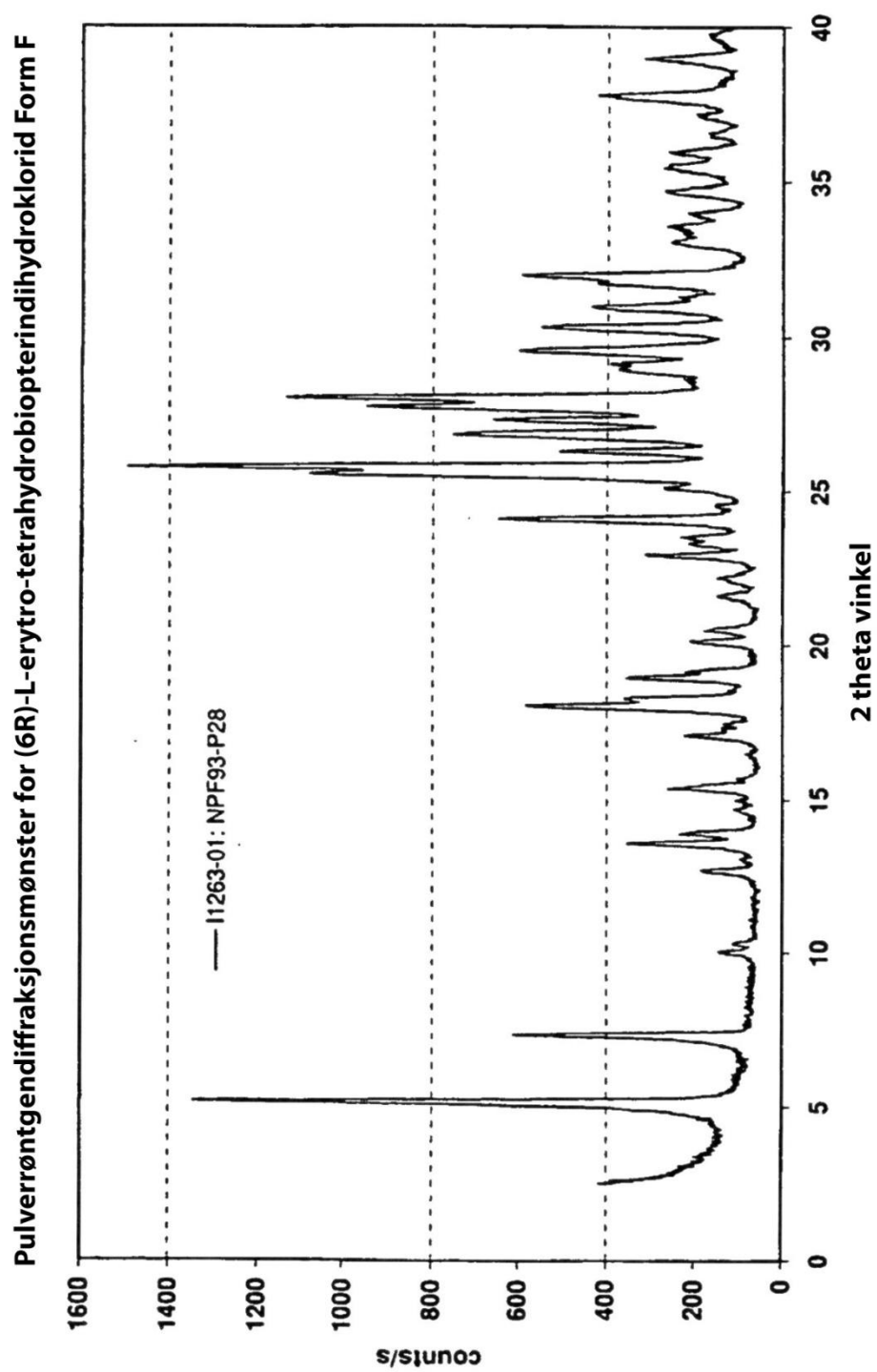
Pulverrøntgendiffraksjonsmønster for (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterin-dihydroklorid form B



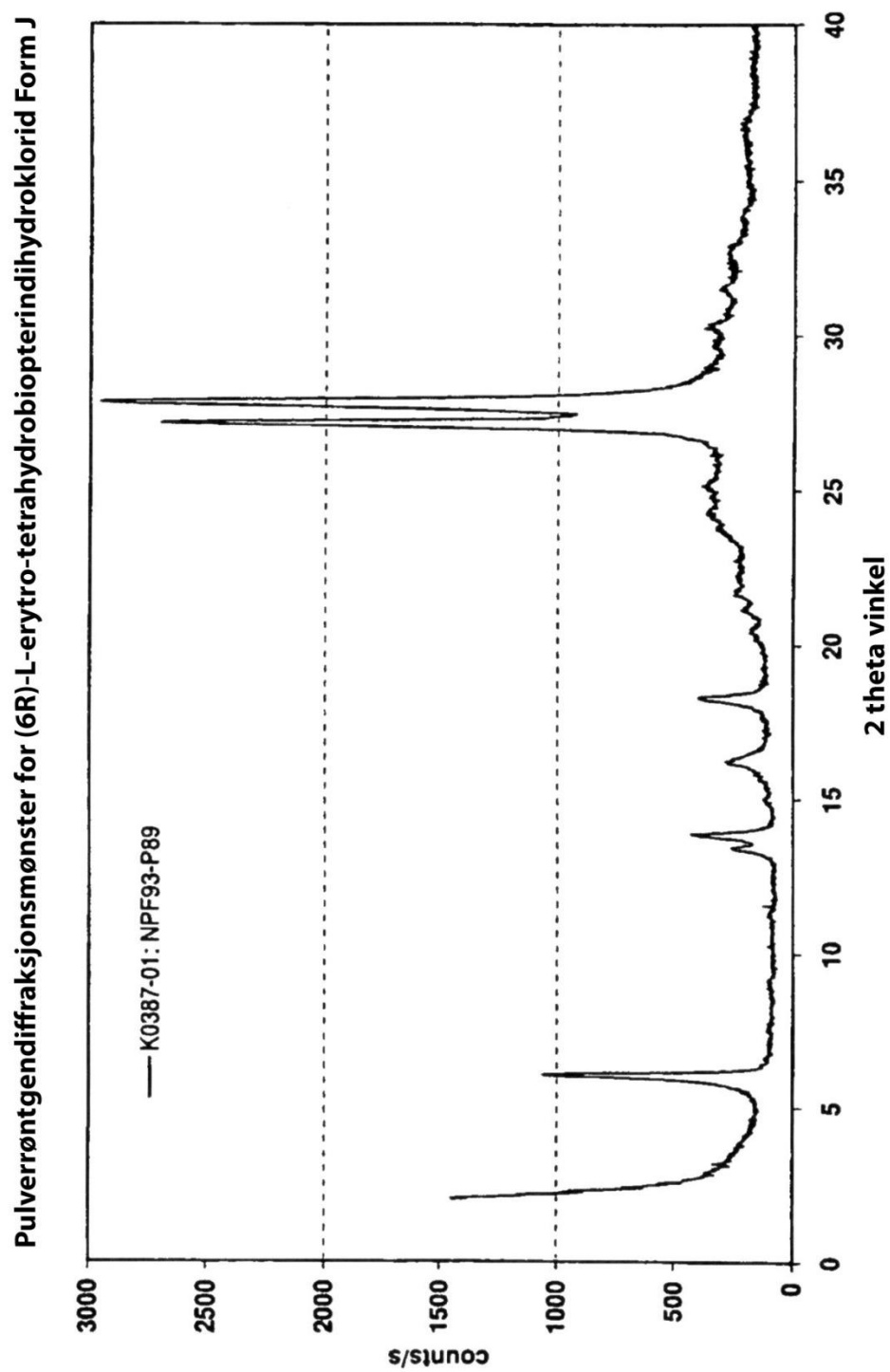
Figur 2

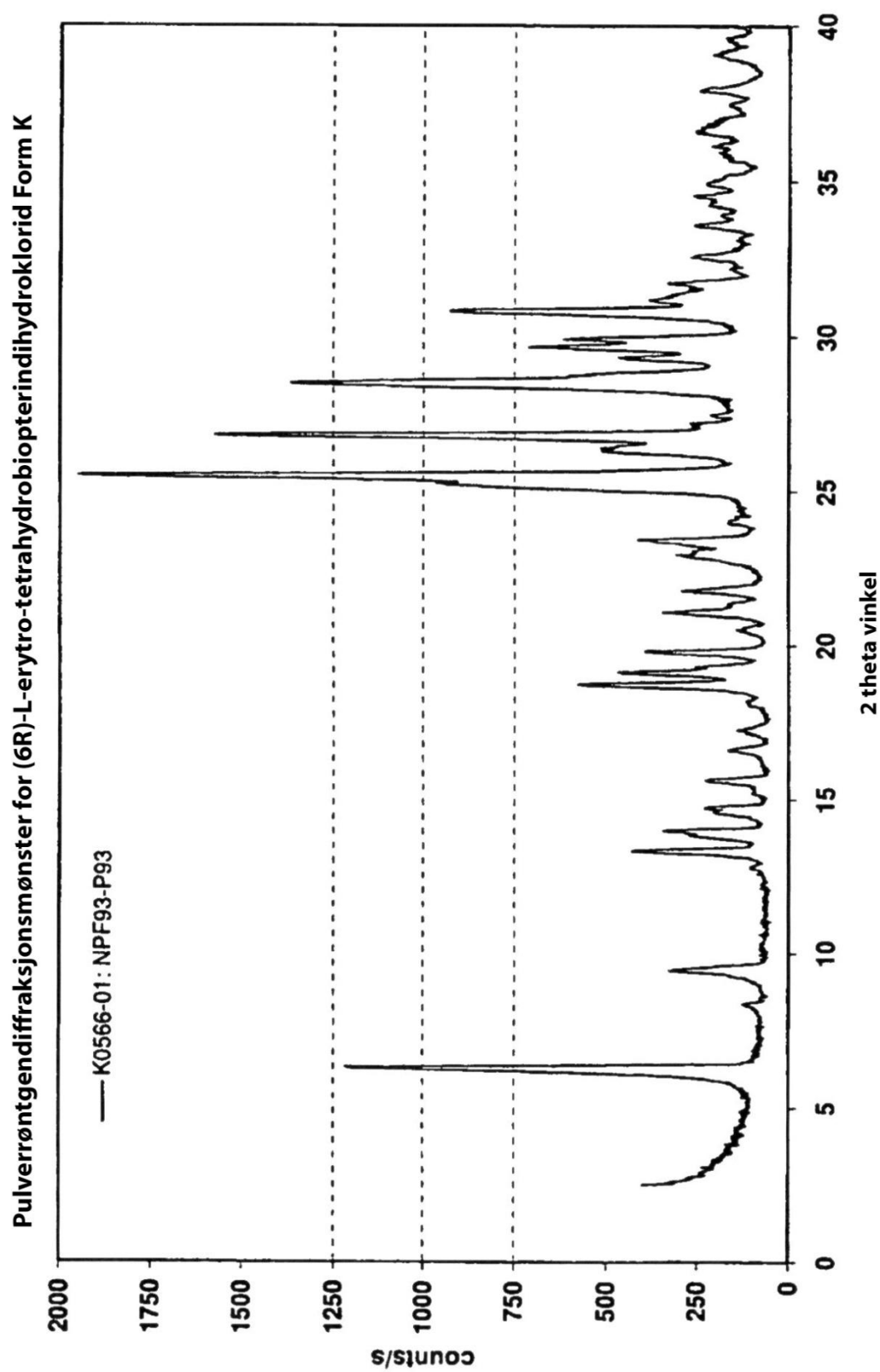


Figur 3



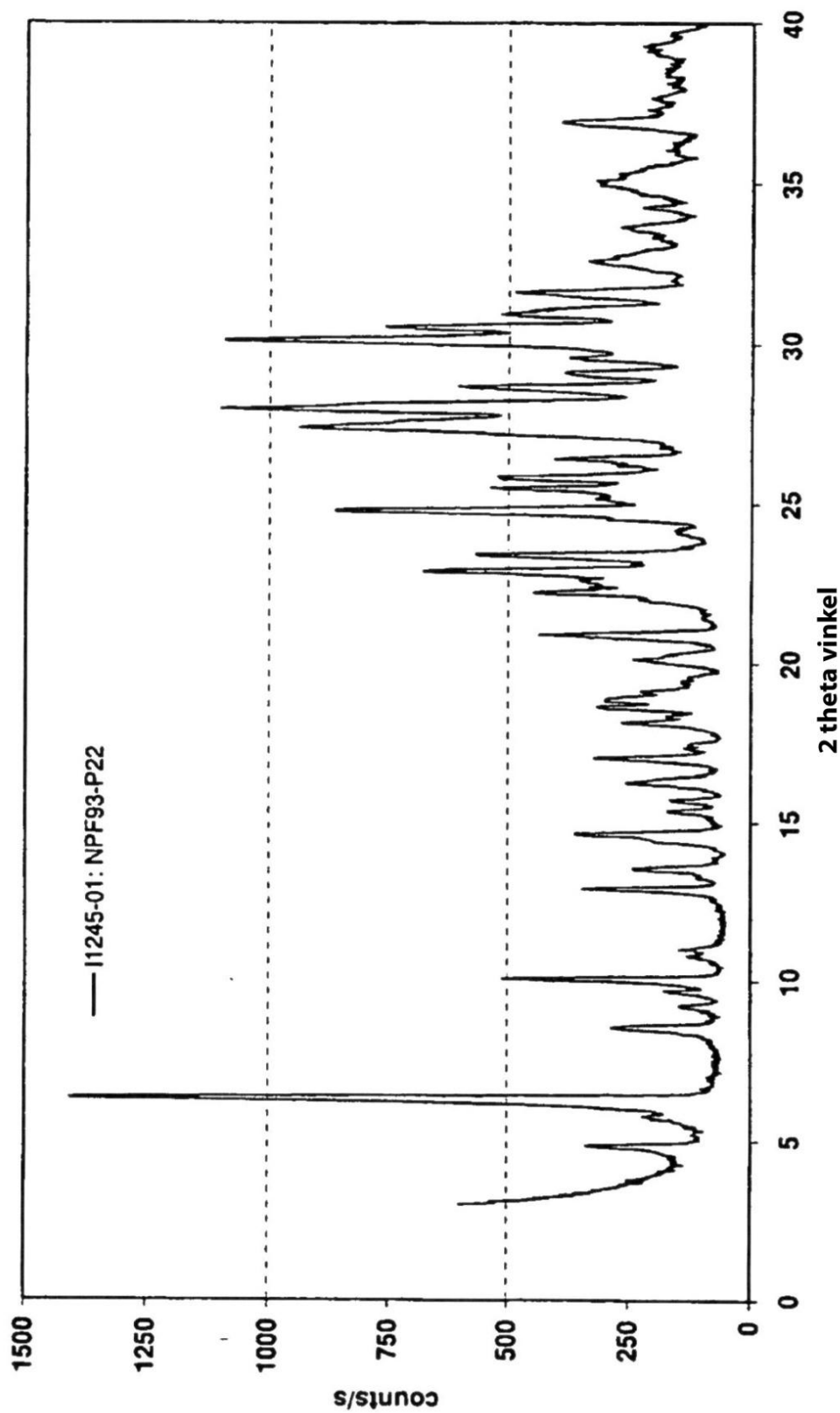
Figur 4



Figur 5

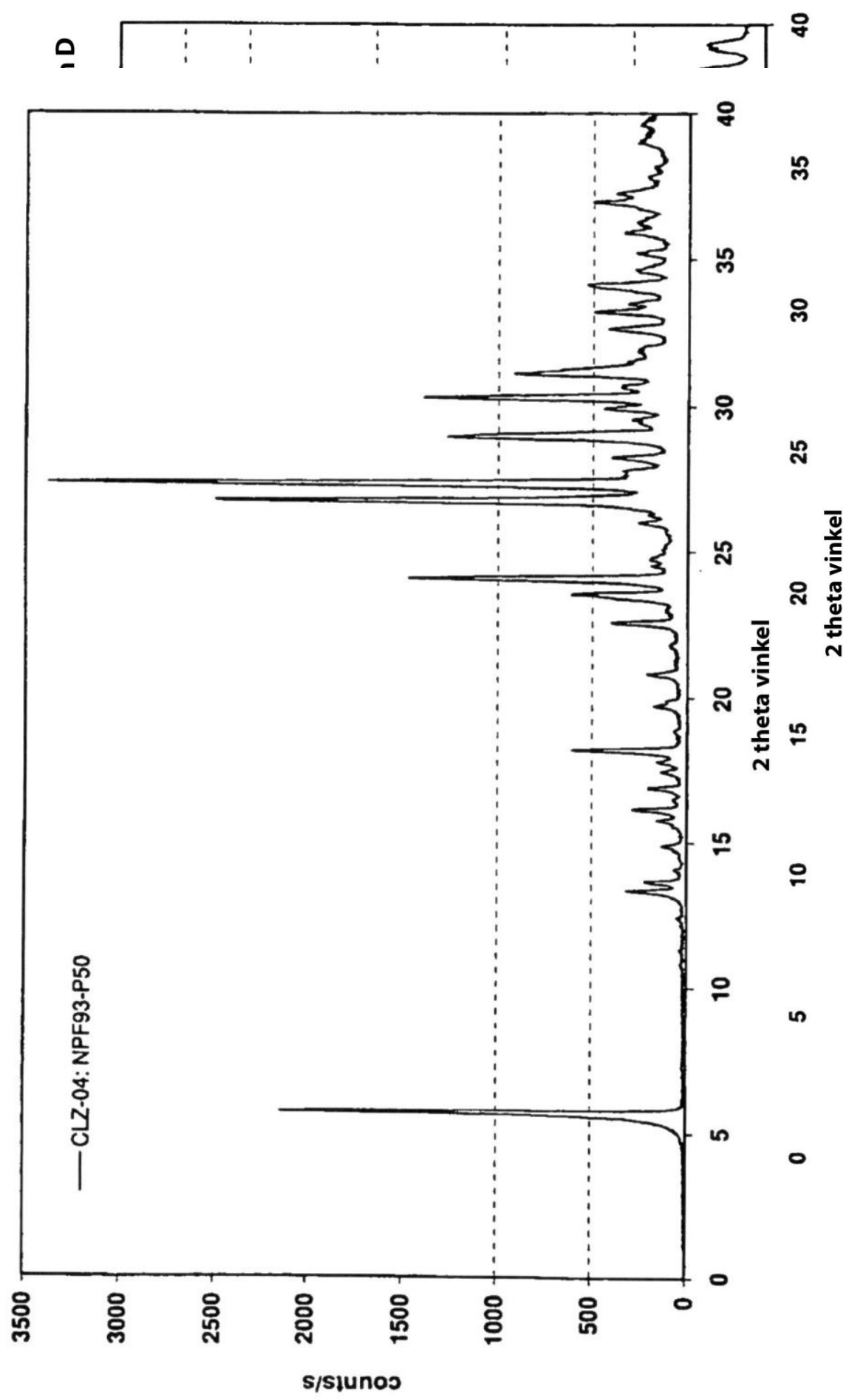
Figur 6

Pulverrøntgendiffraksjonsmønster for (6R)-L-erythro-tetrahydrobiopterindihydroklorid Form C



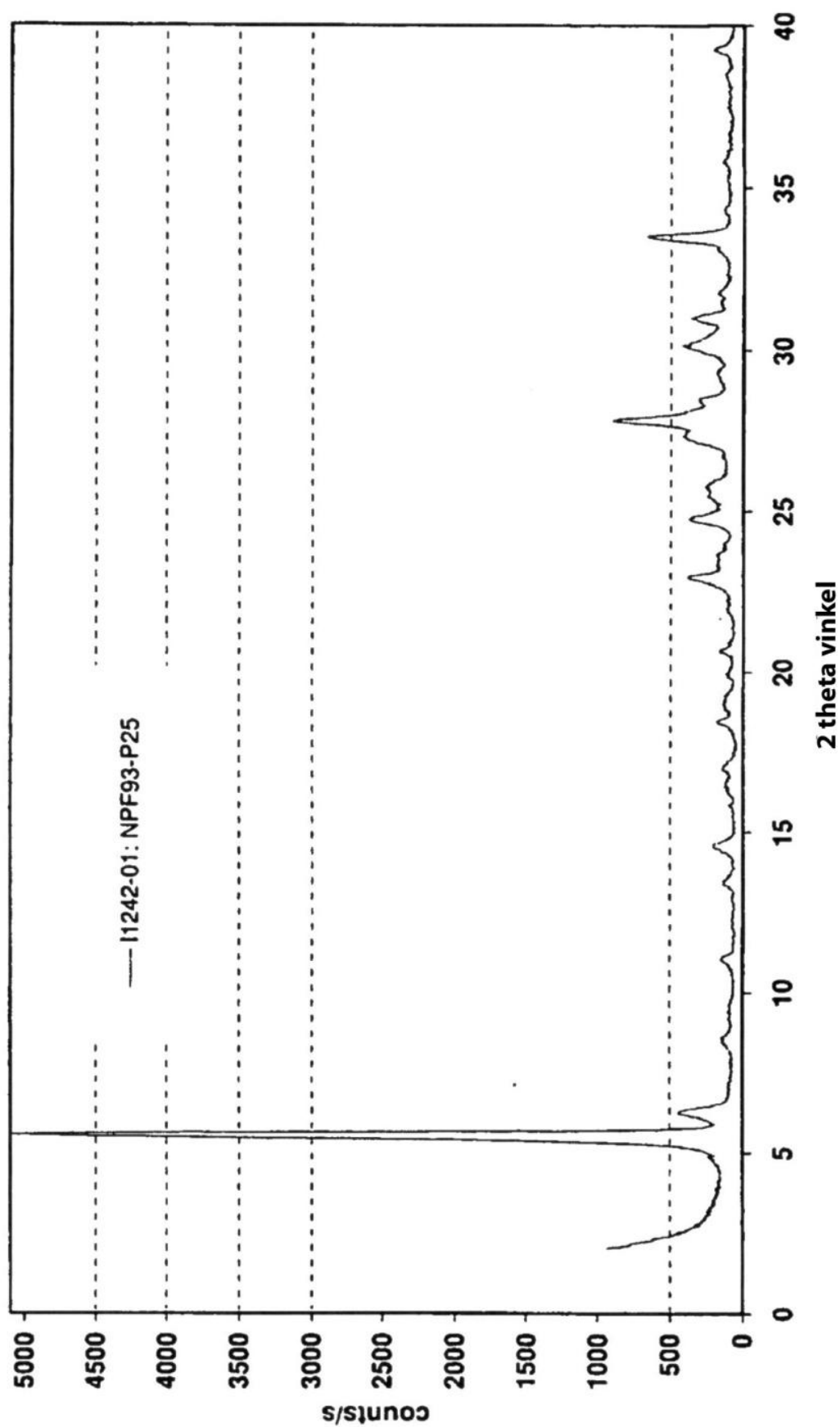
Figur 8

Pulverrøntgendiffraksjonsmønster for (6R)-L-erythro-tetrahydrobiopterindihydroklorid Form E



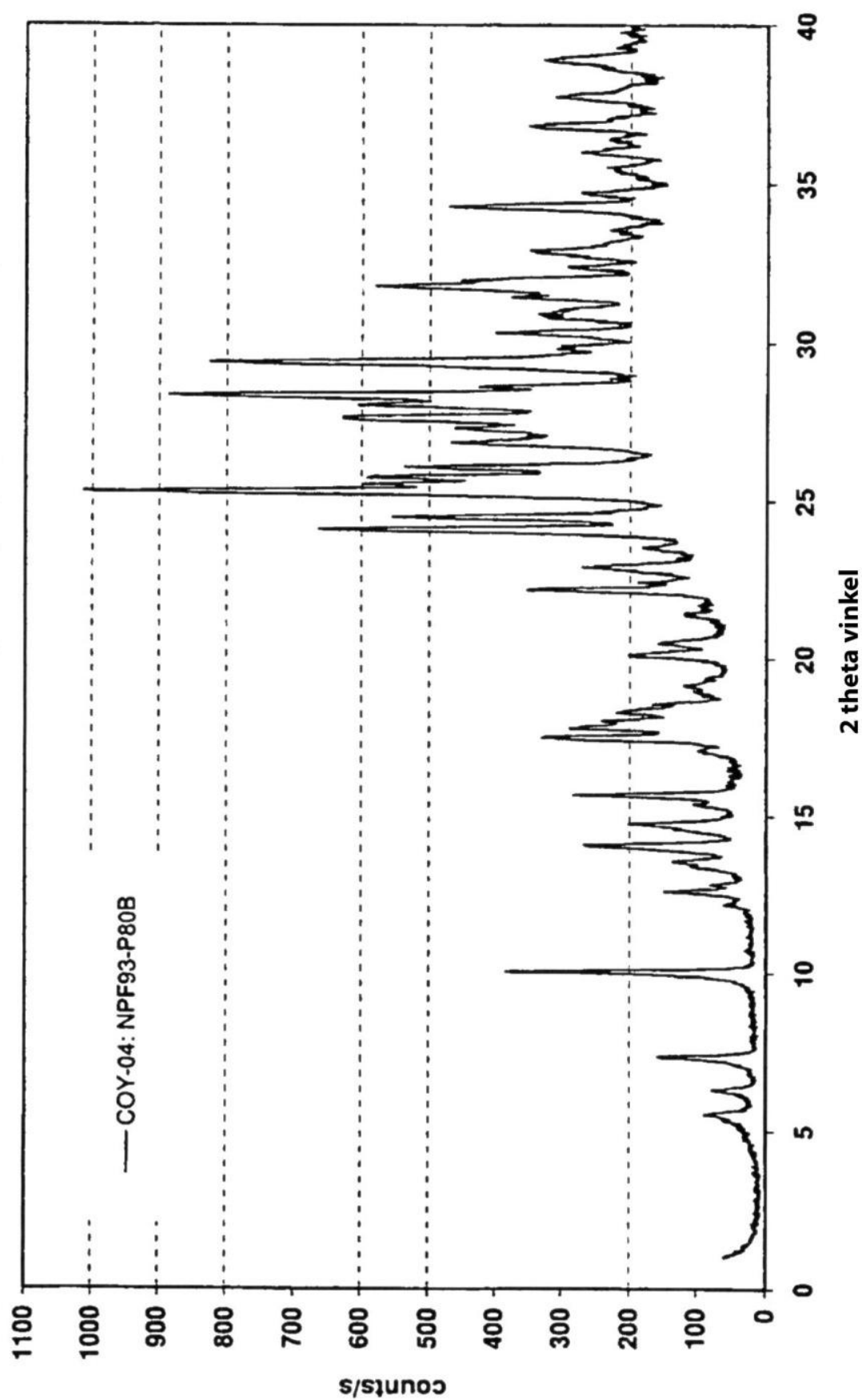
Figur 9

Pulverrøntgendiffraksjonsmønster for (6R)-L-erythro-tetrahydrobiopterindihydroklorid Form H



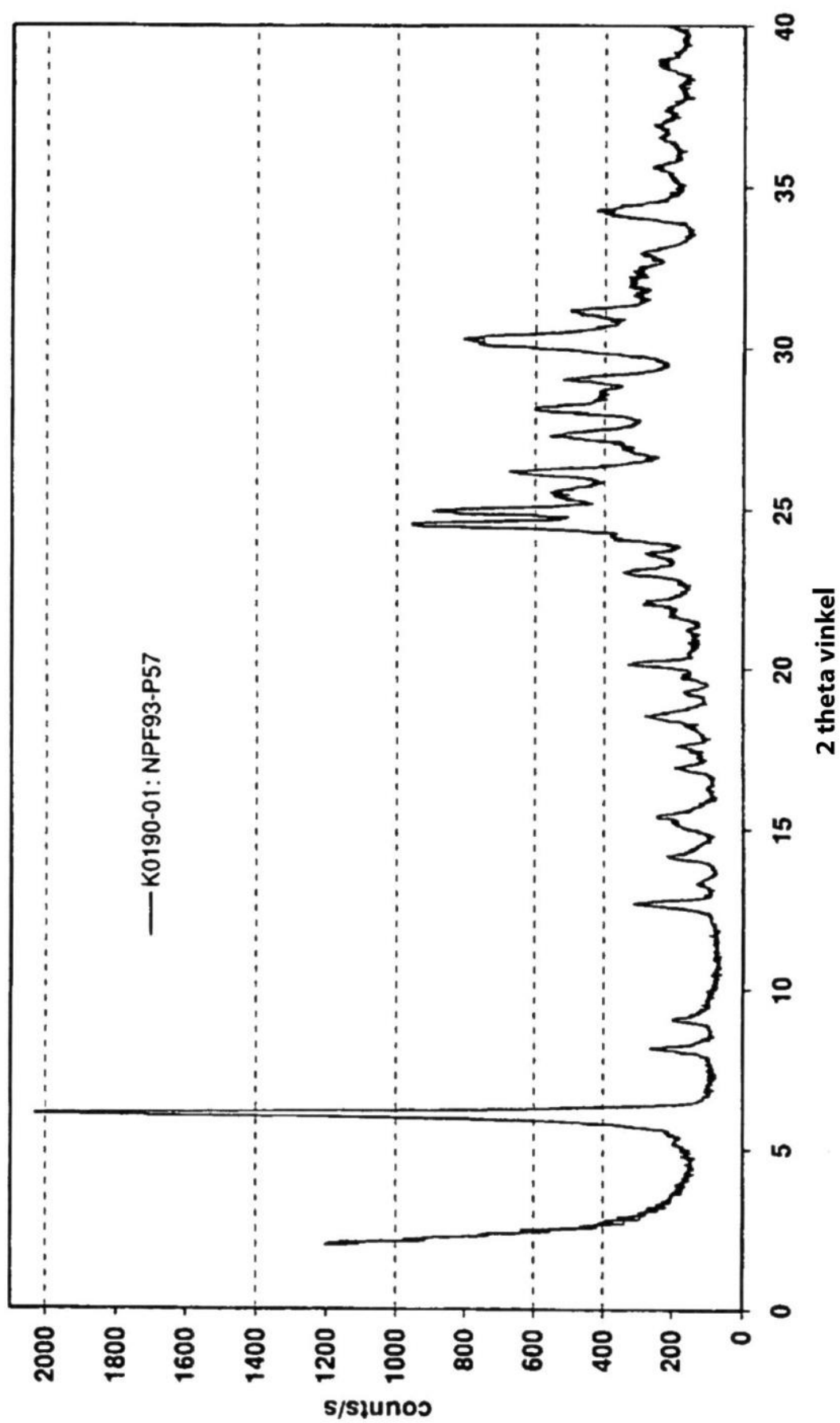
Figur 10

Pulverrøntgendiffraksjonsmønster for (6R)-L-erythro-tetrahydrobiopterindihydroklorid Form O

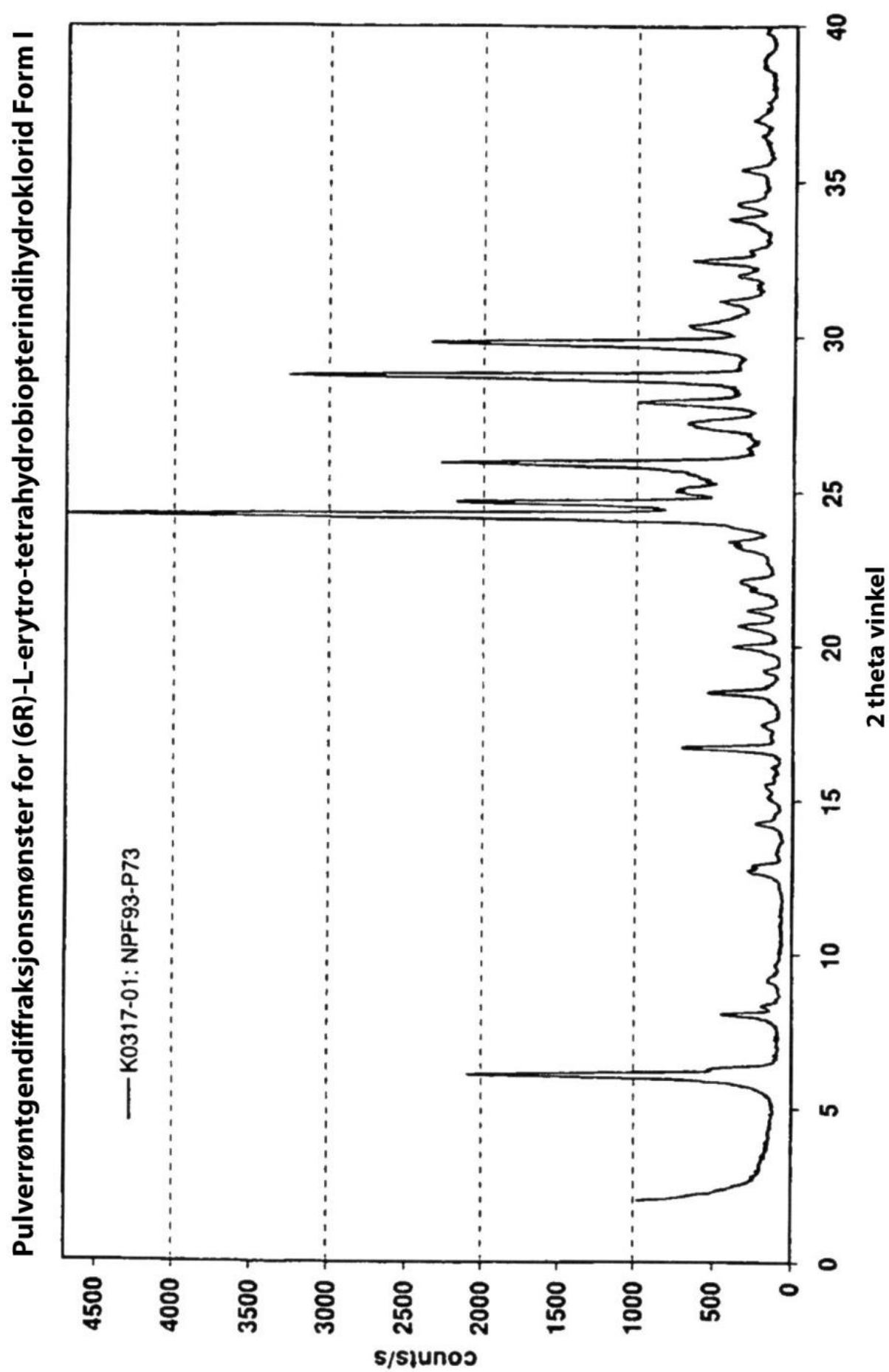


Figur 11

Pulverrøntgendiffraksjonsmønster for (6R)-L-erythro-tetrahydrobiopterindihydroklorid Form G

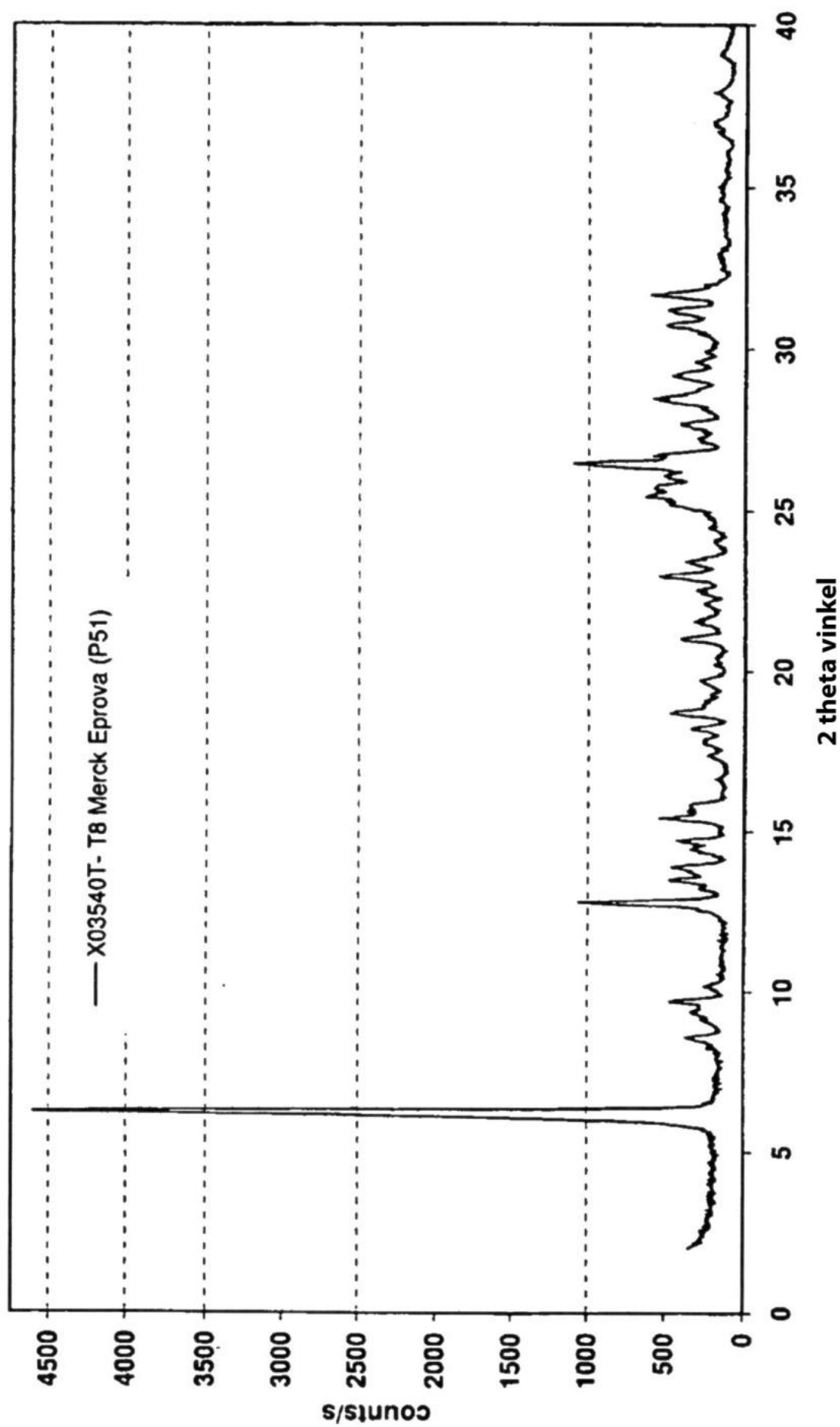


Figur 12

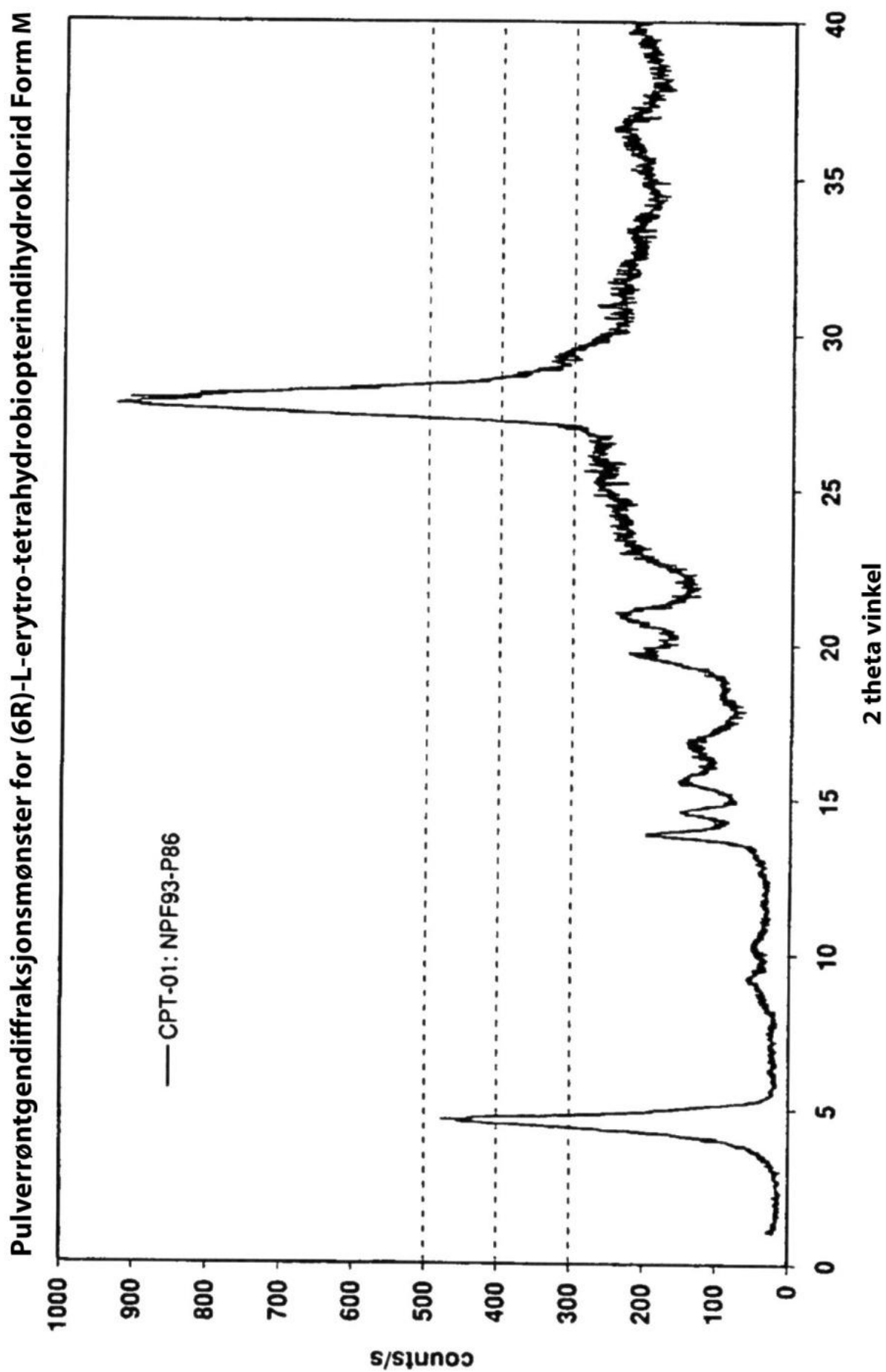


Figur 13

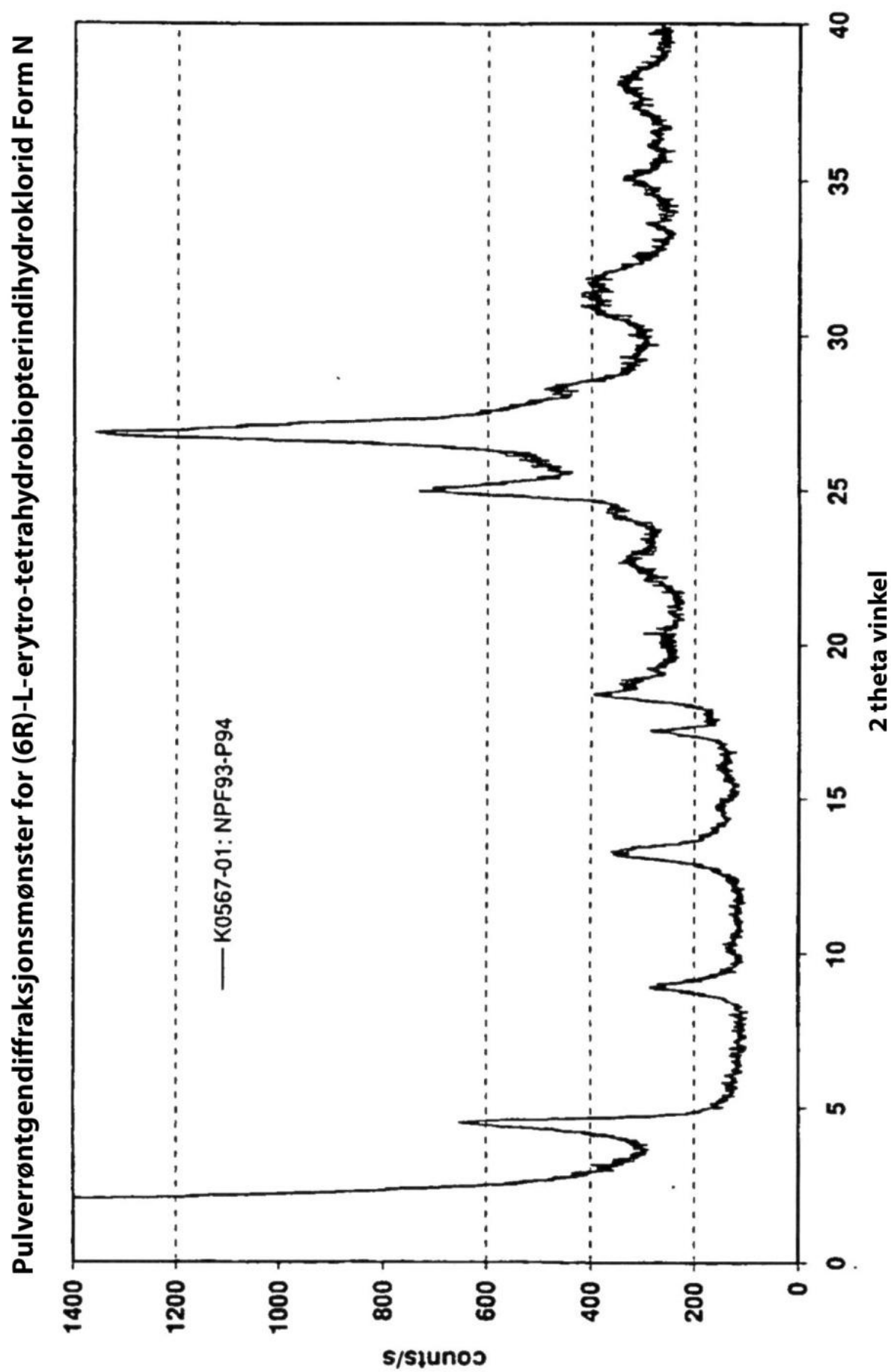
Pulverrøntgendiffraksjonsmønster for (6R)-L-erytro-tetrahydrobiopterindihydroklorid Form L



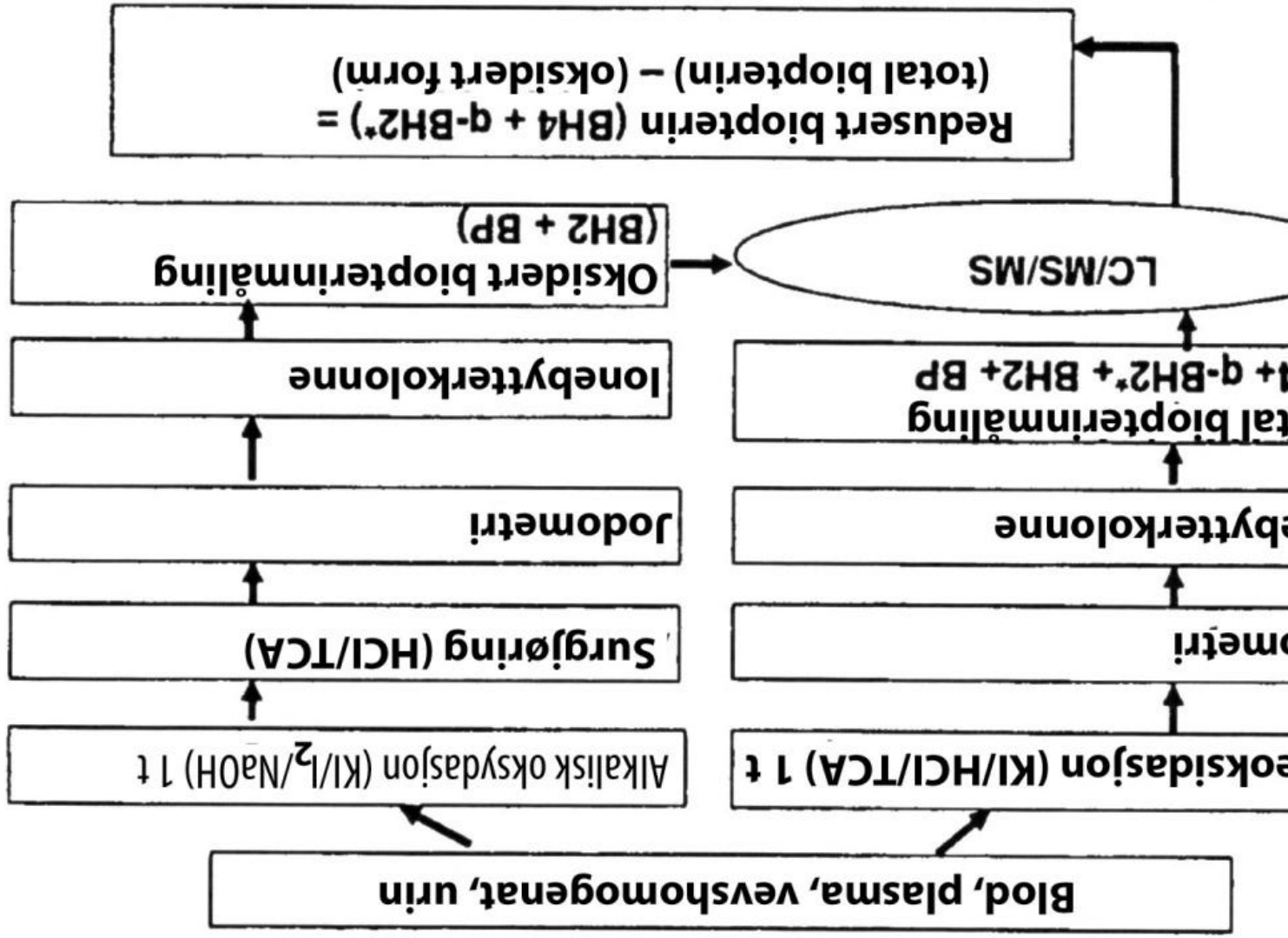
Figur 14



Figur 15



Figur 16 - flytdiagram for måling av biopterin



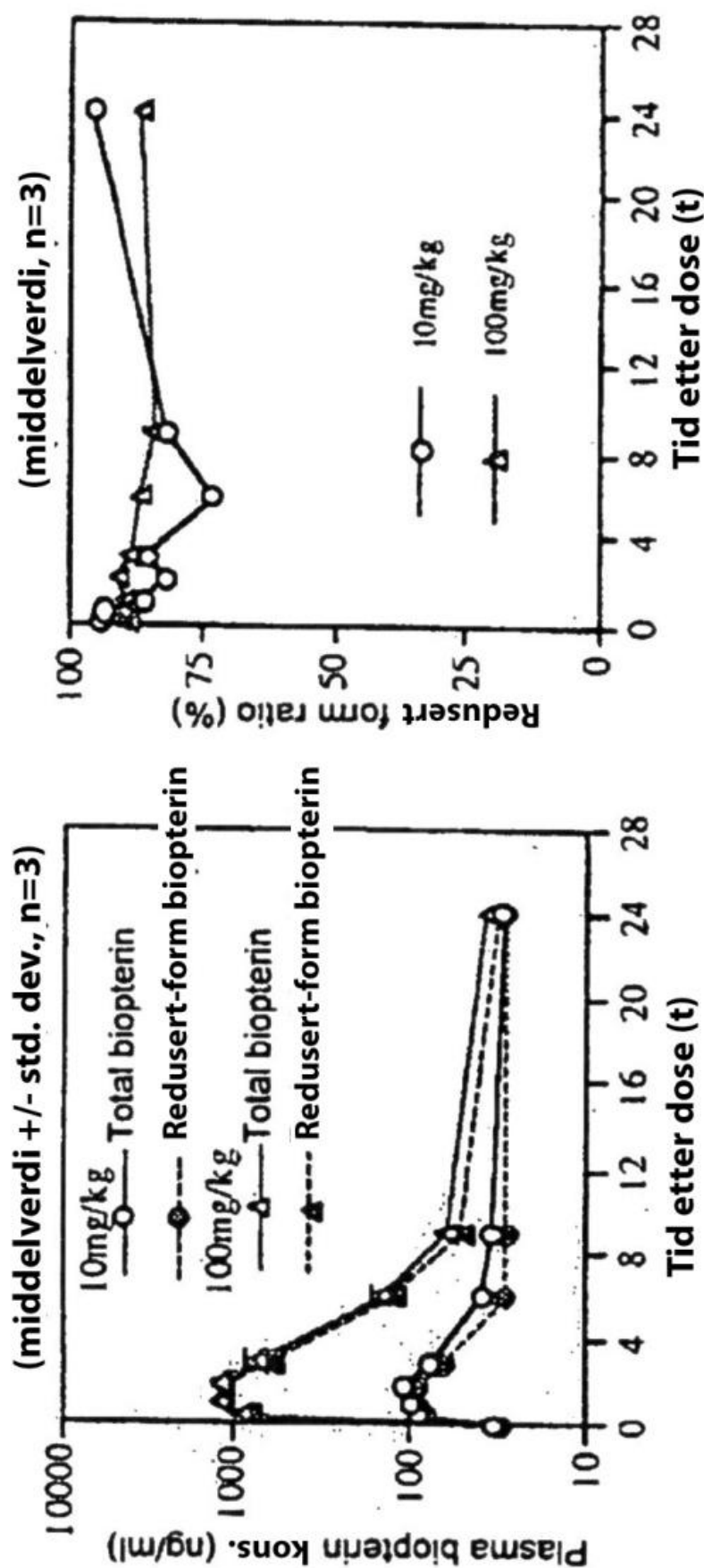
2 blir øyeblikkelig redusert *in vivo* til BH4 slik at det målte reduserte er hovedsaklig er basert på BH4

Figur 17

Analyse	LC/MS/MS bestemmelse av BH4 i humant plasma	HPLC bestemmelse av biopterin i humant plasma
Analytt navn	Tetrahydrobiopterin (BH4)	Biopterin
Analytt navn (oksidert produkt)	L-biopterin	Biopterin
Indre standard	Irbesartan	Biopterin
Analytisk metodetype	LC/MS/MS	HPLC (Eks 365 nm/Em 473 nm)
Ekstraksjonsmetode	Protein presipitering	Protein presipitering
QC konsentrasjoner	5, 15, 150 og 800 ng/ml BH4	1, 10 og 40 ng/ml biopterin
Standardkurve konsentrasjoner	5, 15, 50, 100, 300, 500 og 1000 ng/ml	0,5, 1, 2,5, 5, 10, 25 og 50 ng/ml
Nedre grense for kvantitering	5 ng/ml	(5 ng/ml biopterin)
Øvre grense for kvantitering	1000 ng/ml	(50 ng/ml biopterin)
Gjennomsnittelig utbytte av legemiddel	65,3 %	??
Gjennomsnittelig utbytte av indre standard	94 %	74-94 %
QC intradag presisjonsområde	4,7 til 14,5 % CV	0,8 til 13
QC intradag nøyaktighetsområde	-7,1 til 7,4 % Diff	-2,8 til 6,1
QC interdag presisjonsområde	7,4 til 16, 4 % CV	0,6 til 4,9
QC interdag nøyaktighetsområde	-8,3 til 3,7 % Diff	??
Stamløsning løsemiddel	MeOH:DMSO/50:50 (vol:vol)	Ammoniumfosfatbuffer
Arbeidsbenkstabilitet i humant plasma	4,5 t ved RT	??
Frysing/tiningsstabilitet i humant plasma	4 sykluser ved -70 °C	2 sykluser ved -20 °C
Omdannelsesratio fra BH4 til L-Biopterin	47 % (ved 12 uker)	??
Langtidsstabilitet i K2 EDTA plasma	38 dager ved -70 °C	?? (7 dager ved -20 °C)
Fortynningsintegritet	1500 ng/ml, fortynnet 10-ganger	??
Selektivitet	BH4	Total biopterin

Figur 18

Plasma biopterin konsentrasjon og redusert-form ratio etter en enkelt dose av sapropterin til rotter



Figur 19
Farmakokinetiske parametere av totale biopteriner i plasma etter en enkel oral administrering av Sapropterin til rotter

Dose (mg/kg)	Administrasjons vei	Cendo ¹ (ng/ml)	Cmax (ng/ml)	ΔCmax ² (ng/ml)	Tmax (hr)	ΔAUC ³ (ng·hr/ml)	T _{1/2} (h)	F ⁴ (%)
100	p.o.	38.2	1227	1189	1.0	4571	1.1(2-6 h)	11.8
10	p.o.	33.5	108	75	2.0	265	1.1(2-6h)	6.8
10	i.v.	33.5	–	–	–	3881	0.6(0.5–3h)	
1	i.v.	33.5	–	–	–	529	0.3(0.5–3h)	

¹ Endogen total biopterin konsentrasjon

² Cmax – Cendo

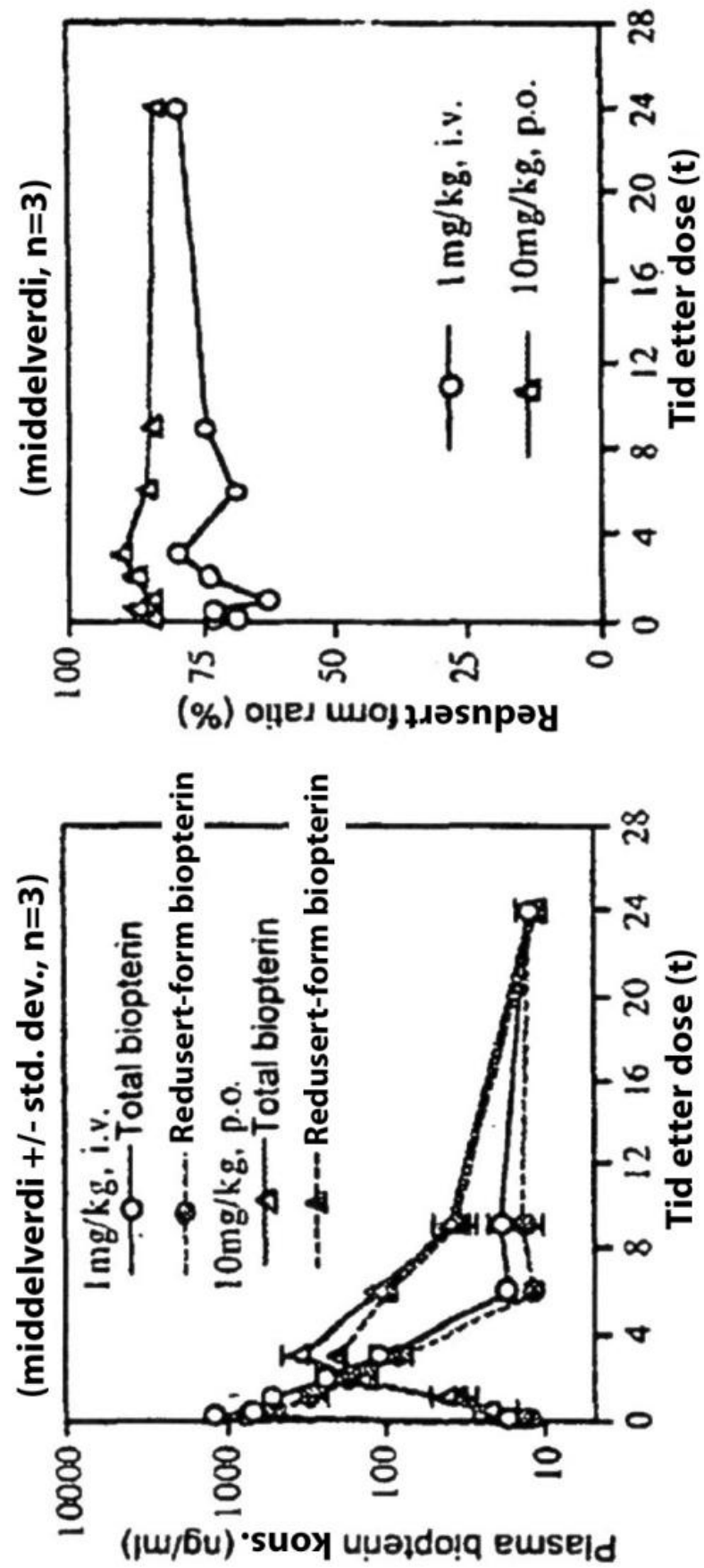
³ Beregnet basert på trapezoid regel ved å anvende verdien (ΔC) oppnådd ved å subtrahere Cendo fra den egentlig målte verdi (C) for plasma konsentrasjon.

⁴ Biotilgjengelighet (F) ble beregnet ved å anvende ΔAUC ved tiden for 10-mg/kg intravenøs injeksjon

$$F = [\Delta AUC_{po}] / [DOSE_{po}] / [\Delta AUC_{iv}] / 10 \times 100 (\%)$$

Sapropterin Lot #:8886202, 8885Y05
(gjennomsnittsverdi for 2 til 5 dyr)

Figur 20
Plasma biopterin konsentrasjon og redusert-form ratio etter en enkelt dose av sapropterin (BH4) til aper



Figur 21

Farmakodynamiske parametre av totale biopteriner i plasma etter en enkelt dose av sapropterin til aper

Dose	Administrasjons	Cendo ¹	Cmax	ΔCmax ²	Tmax	ΔAUC ³	T _{1/2}	F ⁴
(mg/kg)	vei	(ng/ml)	(ng/ml)	(ng/ml)	(hr)	(ng·hr/ml)	(hr)	(%)
10	p.o.	17.4±1.3	344±149	344±148.5	2.9±0.2	1301±144	1.42±0.17	9.0
1	i.v.	17.1±2.1				1449±68.4	0.82±0.14	

¹ Endogen total biopterin konsentrasjon

² Cmax – Cendo

³ Beregnet basert på trapezoid regel ved å anvende verdien (ΔC) oppnådd ved å subtrahere Cendo fra den egentlig målte verdi (C) for plasmakonsentrasjon.

⁴ Biotilgjengelighet (F) ble beregnet ved å anvende ΔAUC ved tiden for 1-mg/kg intravenøs injeksjon

$$F = \frac{[\Delta AUC_{po}]}{[DOSE_{po}]} \div \frac{[\Delta AUC_{iv}]}{1 \times 100 (\%)}$$

Sapropterin Lot #s:8886202, 8885Y05

(gjennomsnittsverdi ± standard feil, n=3)

EP 2 139 485 B1

Figur 22: tidsplan

Besøk	Screening	Åpen behandling					Oppfølging
		Uke 1	Uke 2	Uke 3	Uke 4	Uke 5	
Informert samtykke	X						
Vekt	X	X ⁵					X
Vitale tegn	X	X	X	X	X		X
Fysisk eksaminering	X						X
Kliniske laboratorietester ¹	X						X
Graviditetstest ⁴	X	X			X		X
Urintesting for narkotika-misbruk ²	X	X	X	X	X		X
Ledsagende medisiner	X	X	X	X	X		X
Bivirkninger		X	X	X	X		X
Blod PK prøver ³		X	X	X	X		X
Utdeling av studielegemiddel		X	X	X	X		

1 Kliniske laboratorietester inkluderte hematologi, kjemi, urinalyse B & C, og HIV ved screening. Hematologi, kjemi og urinalyse ble kun repetert ved utskrivelse. Ca. 20 ml blod ble samlet inn ved besøk som innbefattet kliniske laboratorietester.

2 Urintester for narkotika inkluderer testing for amfetaminer, benzodiazepiner, barbiturater, kokain, cannabinoider og opiater.

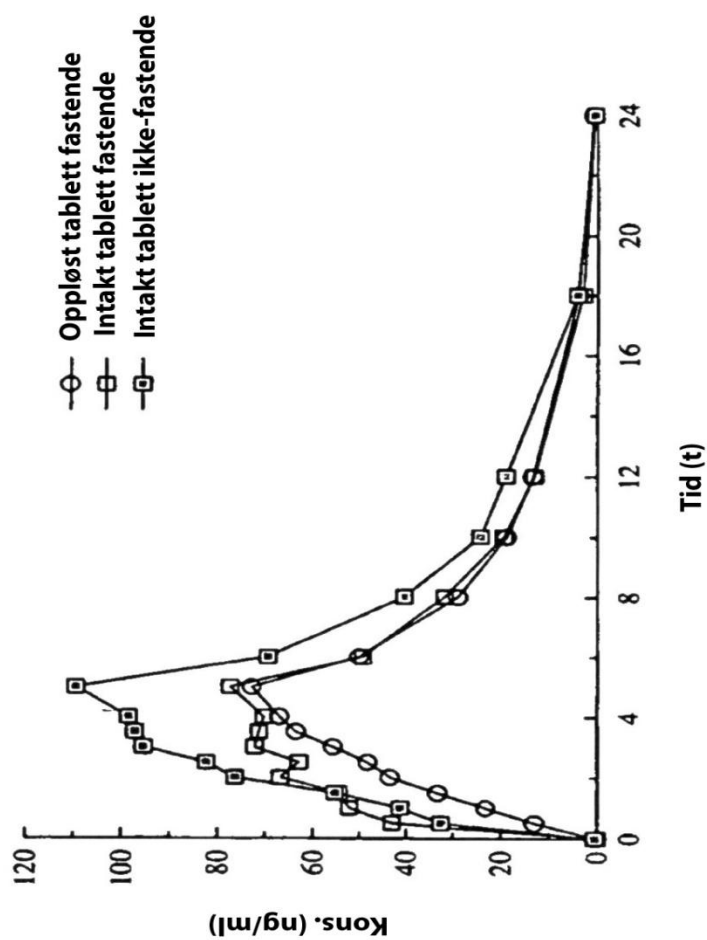
3 Farmakokinetiske prøver ble tatt ved følgende tidspunkter i løpet av hver behandlingsperiode: pre-dose, 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0; 18,0; og 24,0 timer etter dosering. Ca. 80 ml blod ble tappet under hver behandlingsperiode (5 ml pr. gang) for PK-analyse.

4 Ytterligere graviditetstester på urin ble utført ved alle besøk der graviditetsstatus var aktuelt, og graviditetstester på serum ble utført i tilfeller med positive eller tvetydige testresultater fra urin.

5 Vekten i behandlingsuke 1 ble anvendt for å beregne dose.

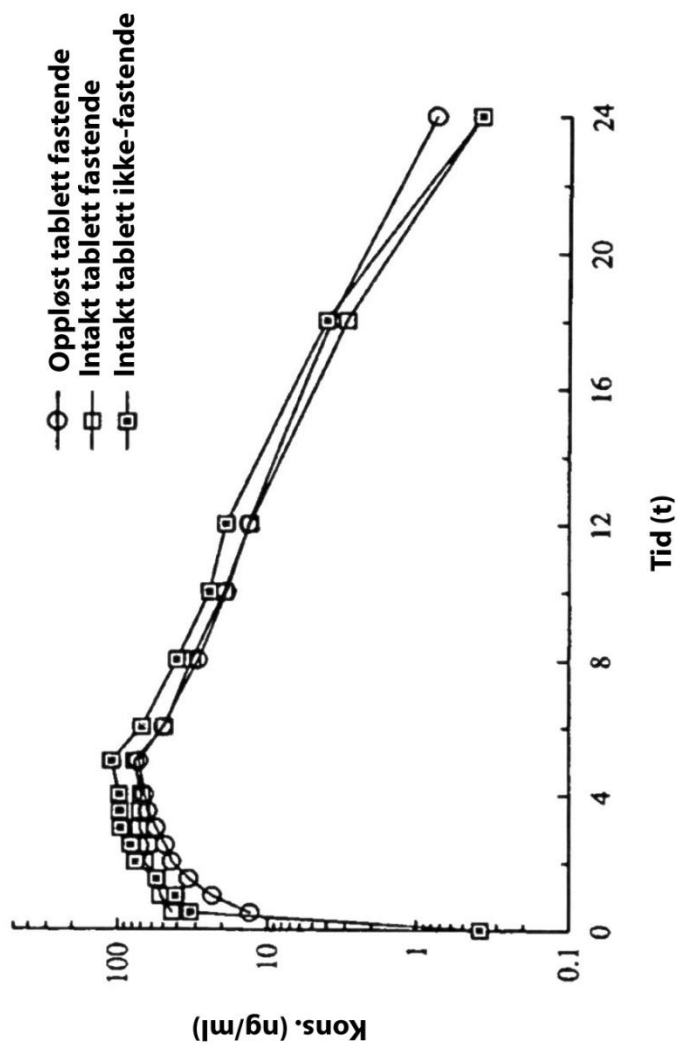
Figur 23

Gjennomsnittlig plasmakonsentrasjon av BH4 etter oral administrasjon av 10 mg/kg Fenoptin som løste og intakte tabletter under fastende forhold og intakte tabletter under ikke-fastende forhold til friske frivillige - lineære akser



Figur 24

Gjennomsnittlig plasmakonsentrasjon av BH4 etter oral administrasjon av 10mg/kg Fenoptin som løste og intakte tabletter under ikke-fastende forhold til friske frivillige - semilogaritmiske akser



Figur 25

Oppsummering av farmakokinetiske parametre for BH4 etter oral administrasjon av 10 mg/kg Fenoptin som løste og intakte tabletter under fastende forhold og intakte tabletter under ikke-fastende forhold til friske frivillige

Parameter ¹	Oppløst tablett Fastende	Intakt tablett Fastende	Intakt tablett Ikke-fastende
C _{max} (ng/mL)	80.3 ± 63.3 [30] (69.4)	91.2 ± 36.3 [30] (84.0)	121 ± 33.6 [30] (116)
T _{max} (h)	4.00 [30] (2 - 6)	3.50 [30] (1 - 5)	4.00 [30] (1 - 5)
AUC(0-t) (h•ng/mL)	479 ± 292 [30] (420)	550 ± 214 [30] (505)	709 ± 221 [30] (675)
AUC(inf) (h•ng/mL)	597 ± 336 [22] (528)	704 ± 202 [19] (670)	825 ± 256 [23] (784)
λ _z (h ⁻¹)	0.2101 ± 0.1326 [22]	0.2099 ± 0.0942 [19]	0.2104 ± 0.0918 [23]
t _{1/2} (h)	5.31 ± 4.42 [22]	4.47 ± 3.37 [19]	4.28 ± 2.79 [23]

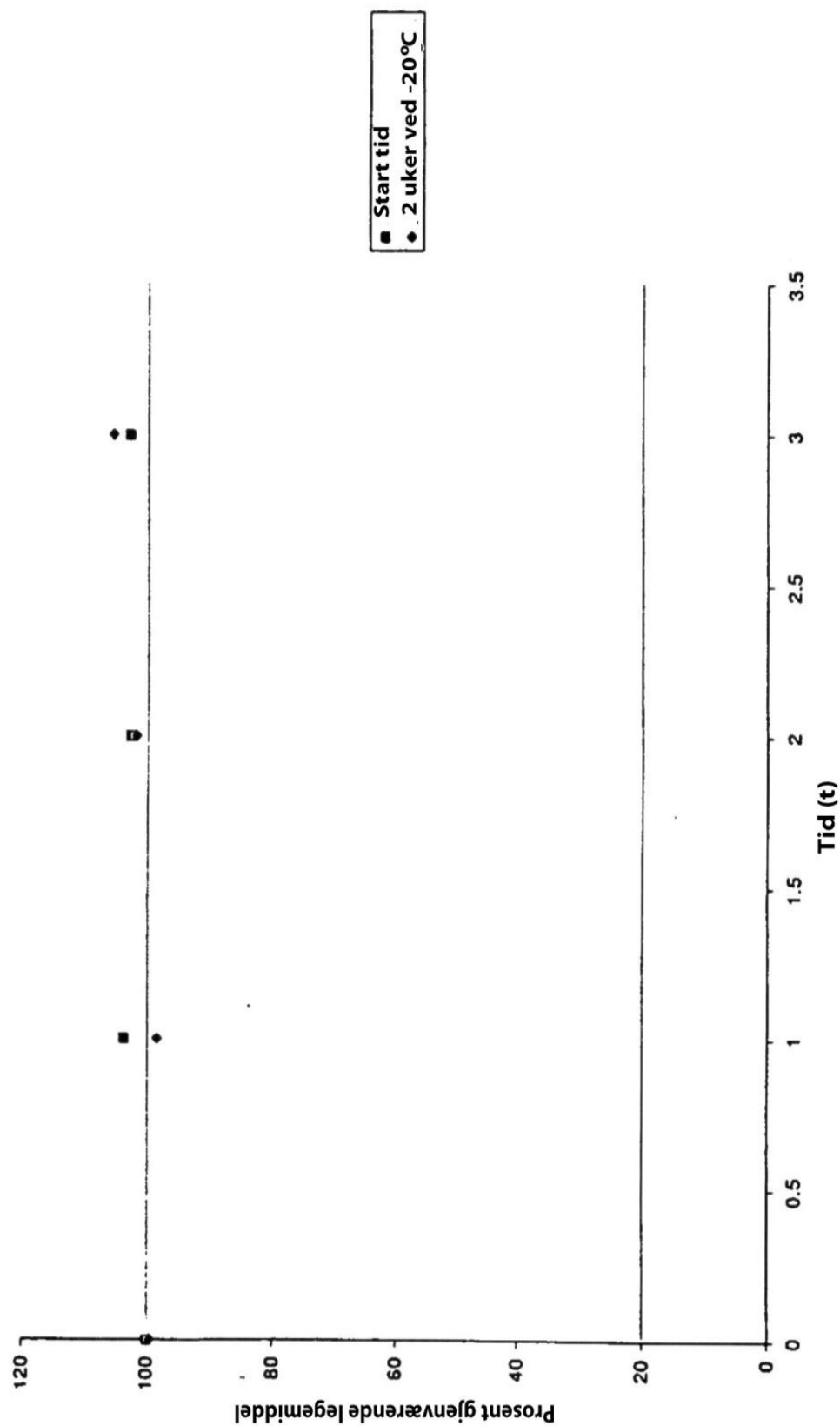
¹ Middelverdi ± standard avvik untatt for T_{max} for hvilken medianen rapporteres. Tall i hakeparenteser er antall forsøkspersoner for hvem parameteret kunne estimeres og antall i parentes er det geometriske middeltall for C_{max}, AUC(0-T), og AUC(inf) og området for T_{max}

Figur 26
Statistisk sammenlikning av farmakokinetiske parametre for BH4 etter oral administrering av 10 mg/kg av Fenoptin som oppløste og intakte tabletter under fastende forhold og intakte tabletter under ikke-fastende forhold til friske frivillige

Parameter	Geometrisk middel ratio (%) ¹		
	Estimat	90% konfidens	Interval
Intakt vs. oppløst tablett (fastende)			
C _{max}	120.98	104.21 →	140.44
AUC(0-t)	120.33	104.12 →	139.06
AUC(inf)	118.04	98.16 →	141.96
Intakt tablett - ikke-fastende vs. fastende			
C _{max}	138.63	119.42 →	160.93
AUC(0-t)	133.69	115.68 →	154.50
AUC(inf)	125.61	104.29 →	151.30

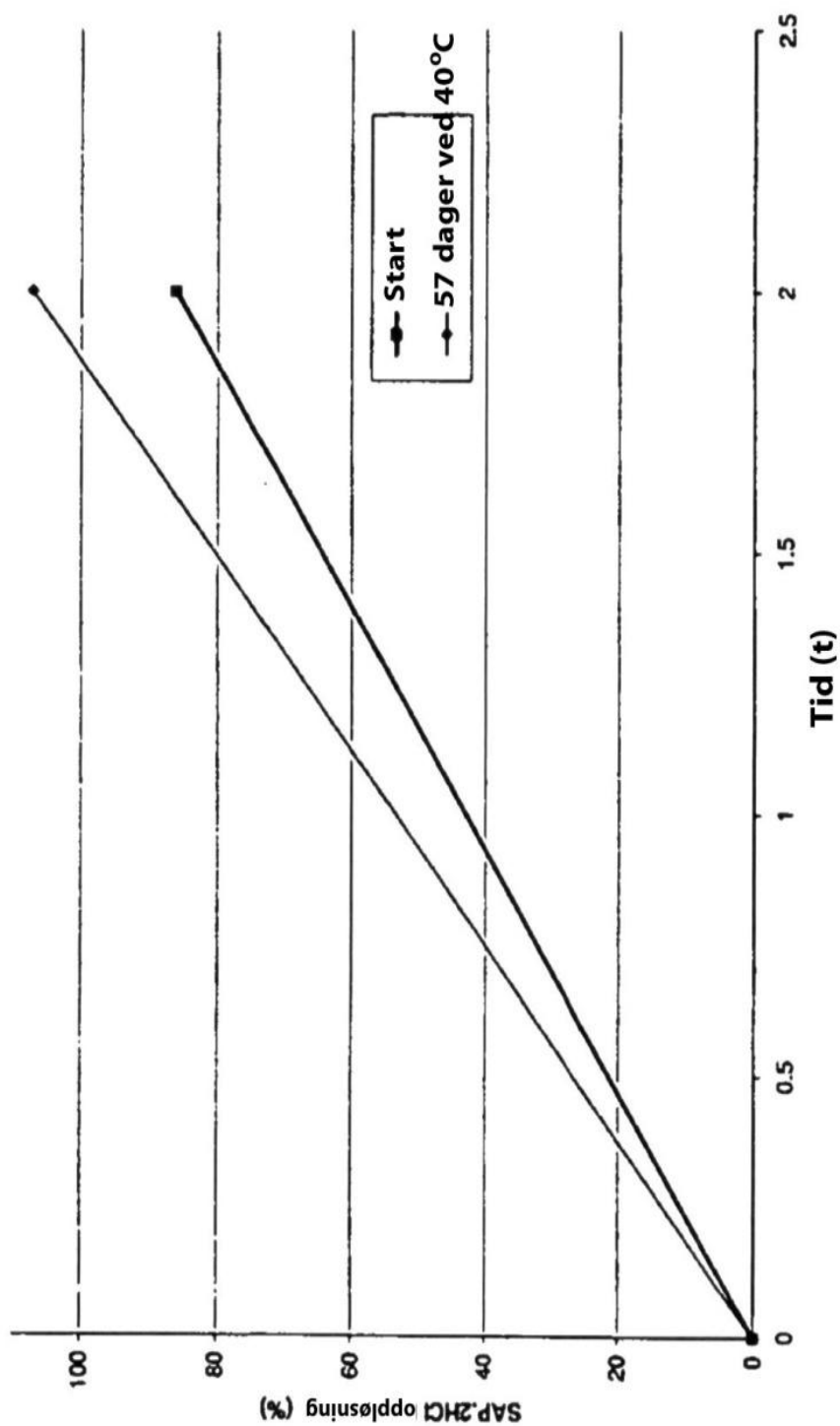
¹ Basert på analyse av naturlige log-transformerte data.

Figur 27
Stabilitet av BH4 (1 mg/ml) i 5% mannitol vandig løsning



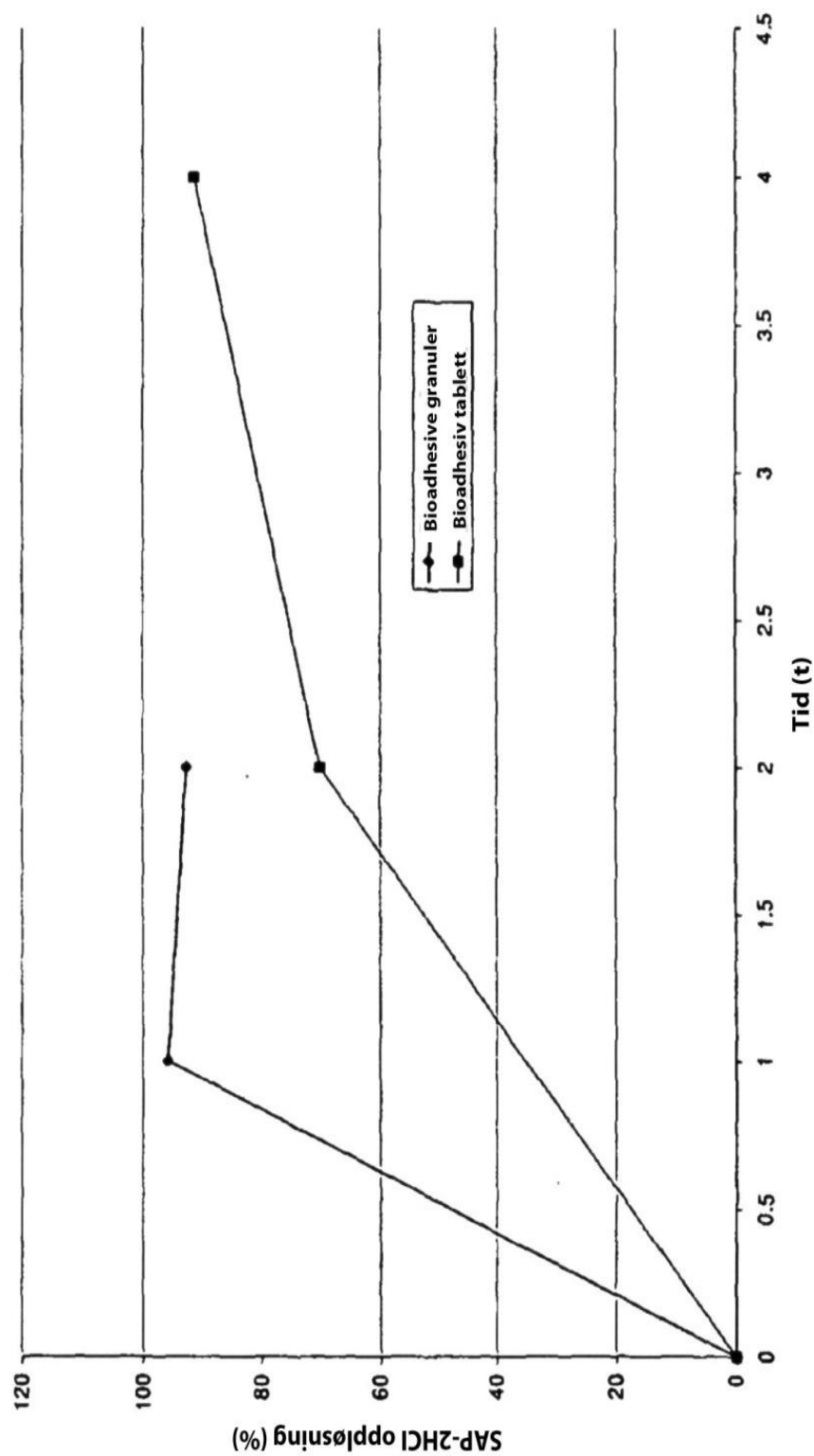
Figur 28
Løslighetsprofil til GMO kapselprototype

USP Paddle Apparatus, 50 rpm, 37 °C, 900 mL 0.1 N HCl (110210-28, 110210-76E)



Figur 29
Løslighetsprofil av bioadhesiv tablett prototype (80 mg BH4)

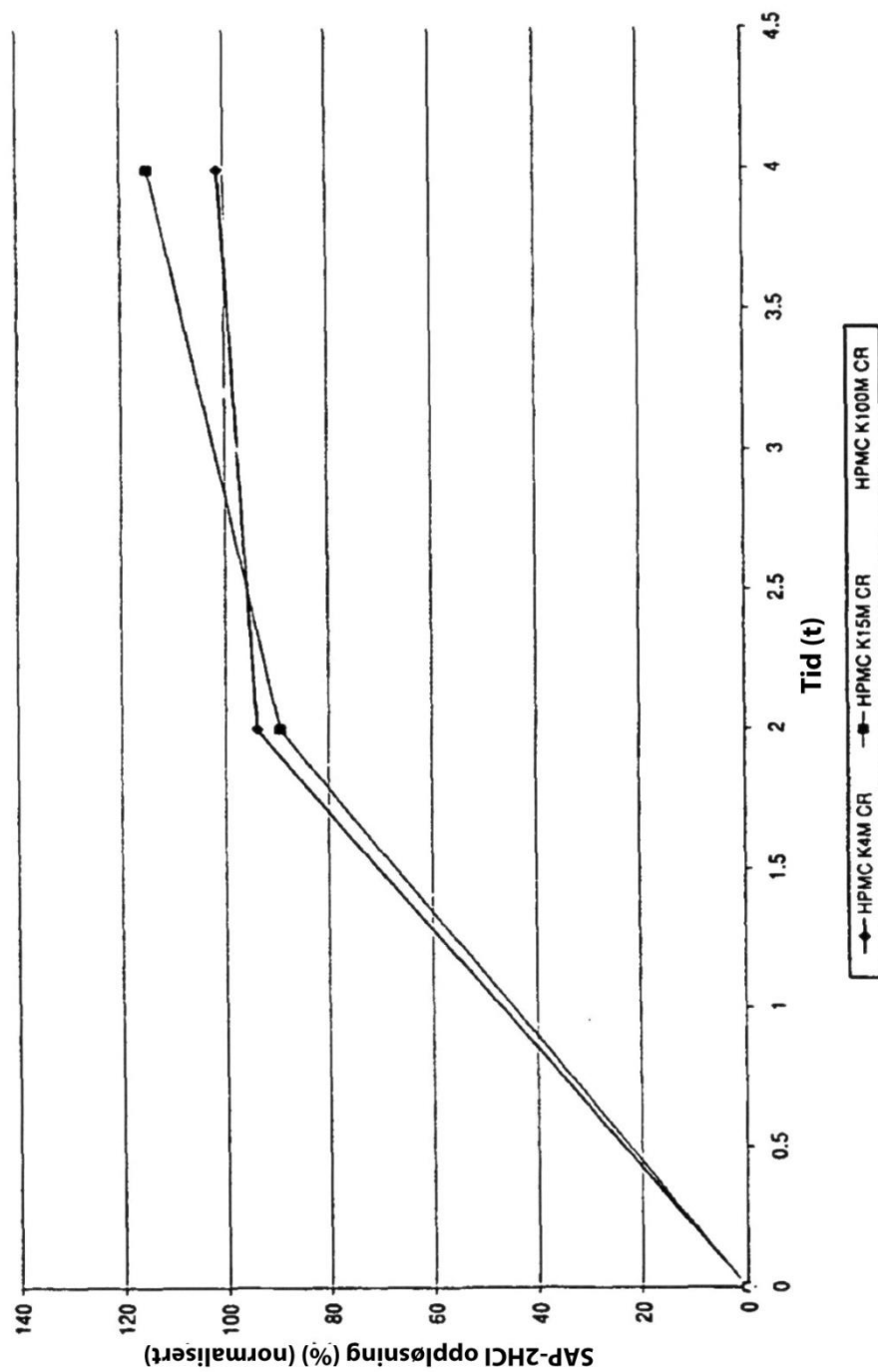
USP Paddle Apparatus, 50 rpm 37°C, 900 mL 0.1N HCl (11229-04, 11229-85)



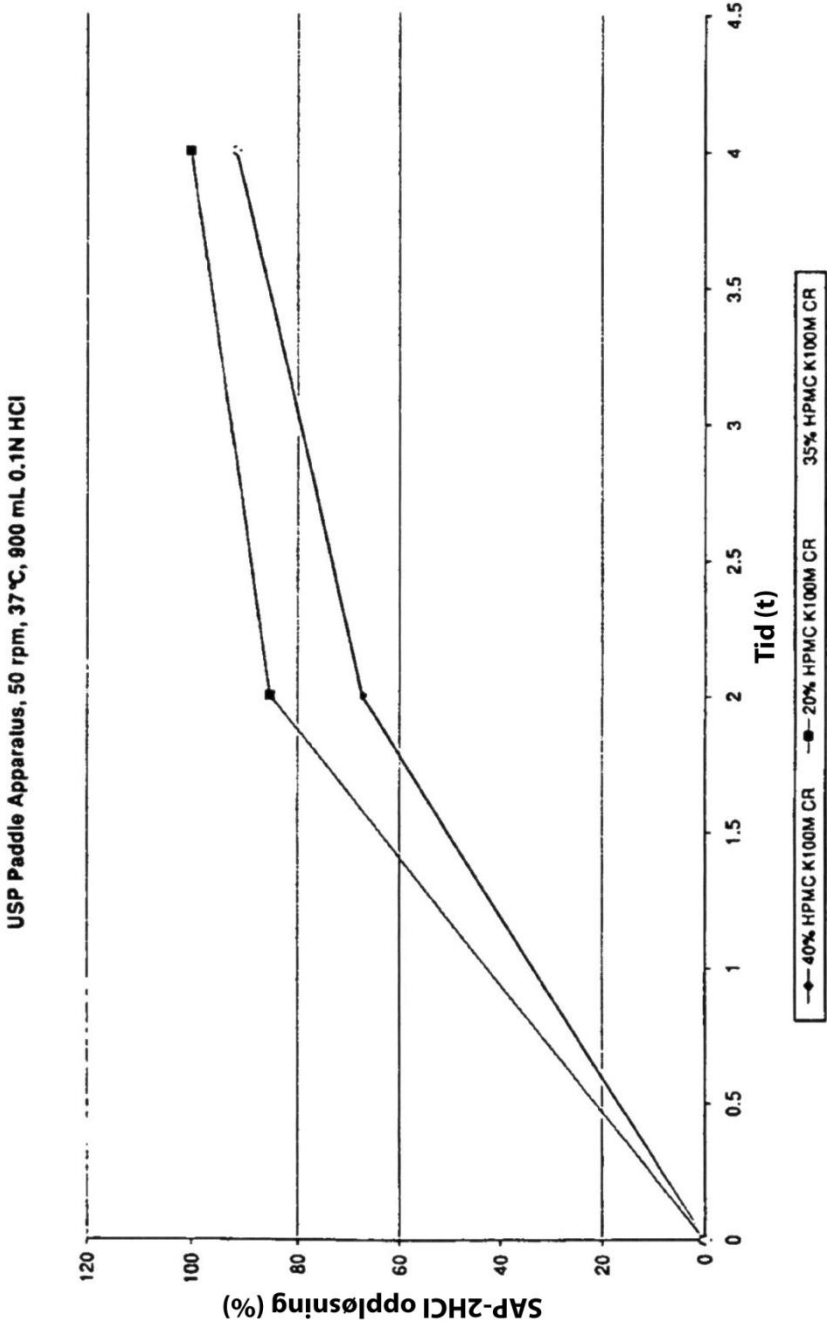
Figur 30

Løslighetsprofil av vedvarende frigjøringsprototype (80 mg SAP-2HCl) med 20% HPMC av forskjellig viskositetsgrad

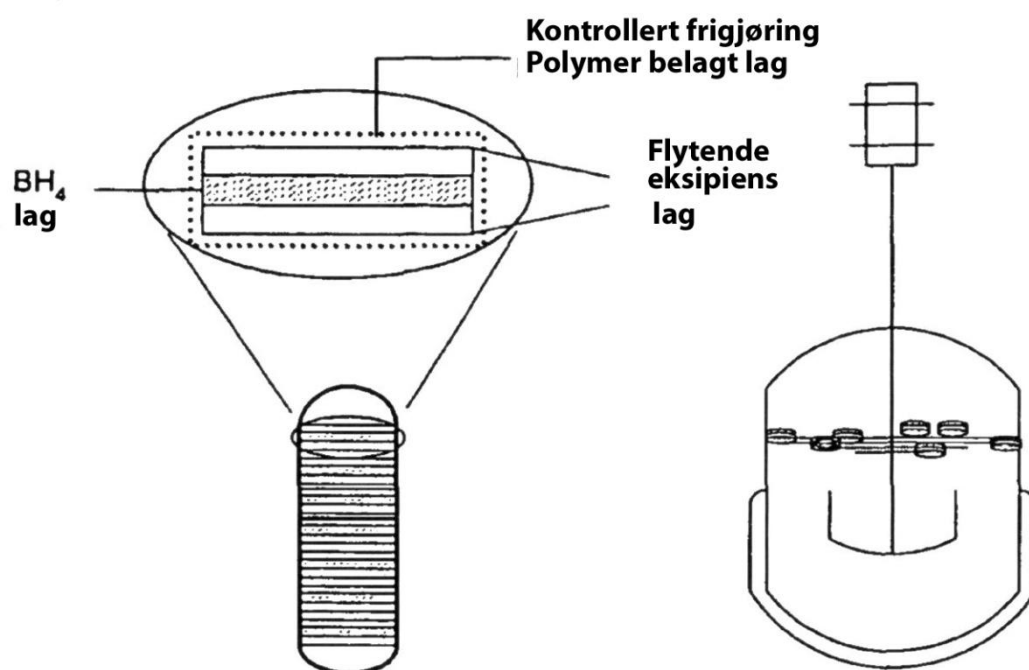
USP Paddle Apparatus, 50 rpm, 37°C, 900 mL 0.1N HCl



Figur 31
Løslighetsprofil av vedvarende frigjøringsprototyper (80 mg BH4) inneholdende 20% til 40% Metocel K100M CR



Figur 32
Skjematisk diagram av flytende doseringsform

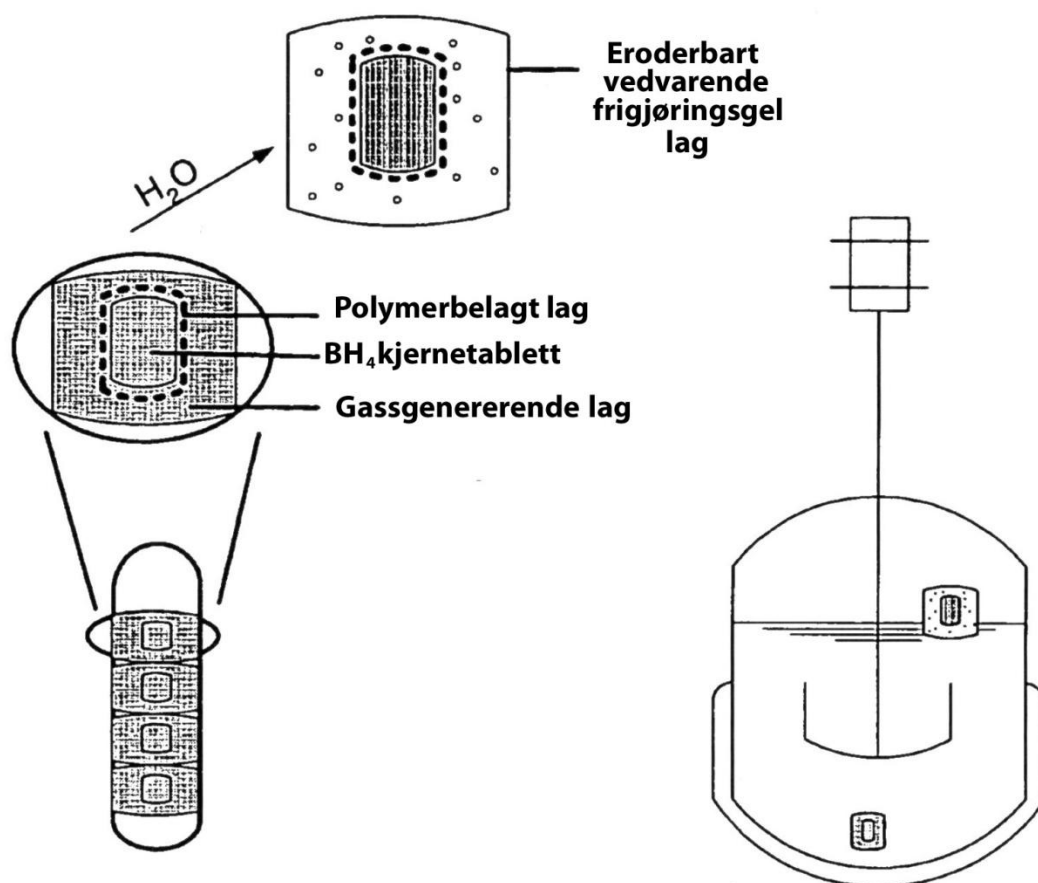


de PEG-belegging

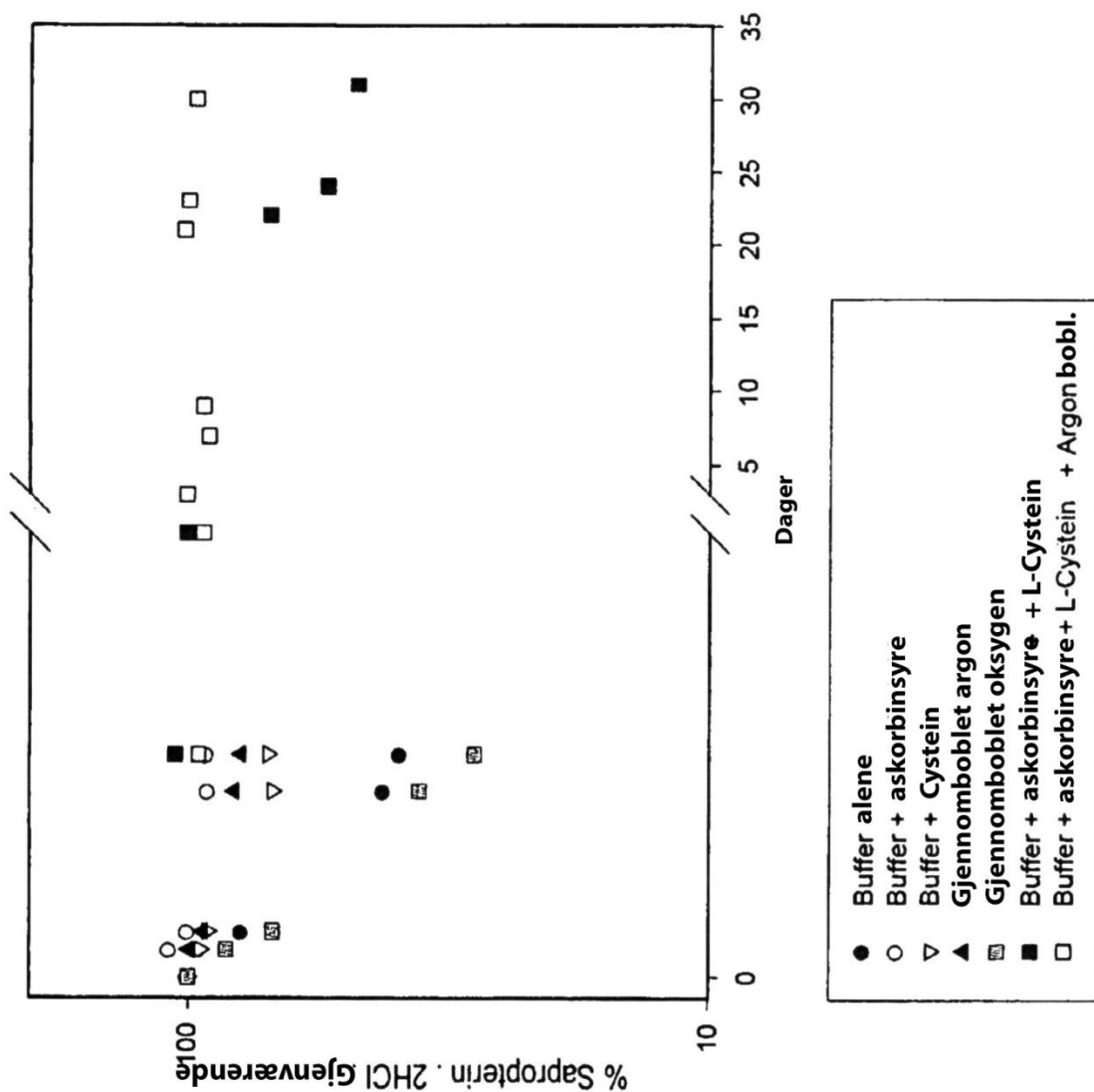


Figur 34

Skjematisk diagram og gassgenererende doseringsform

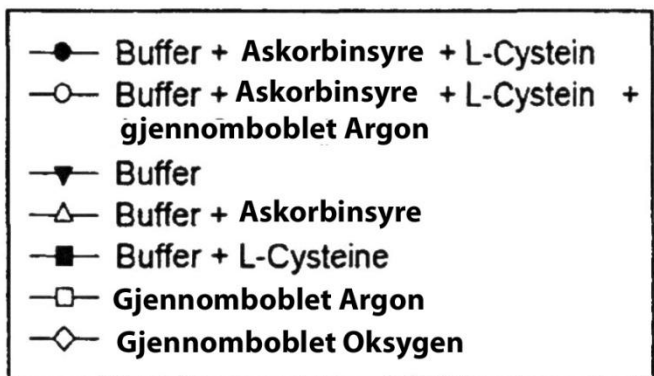
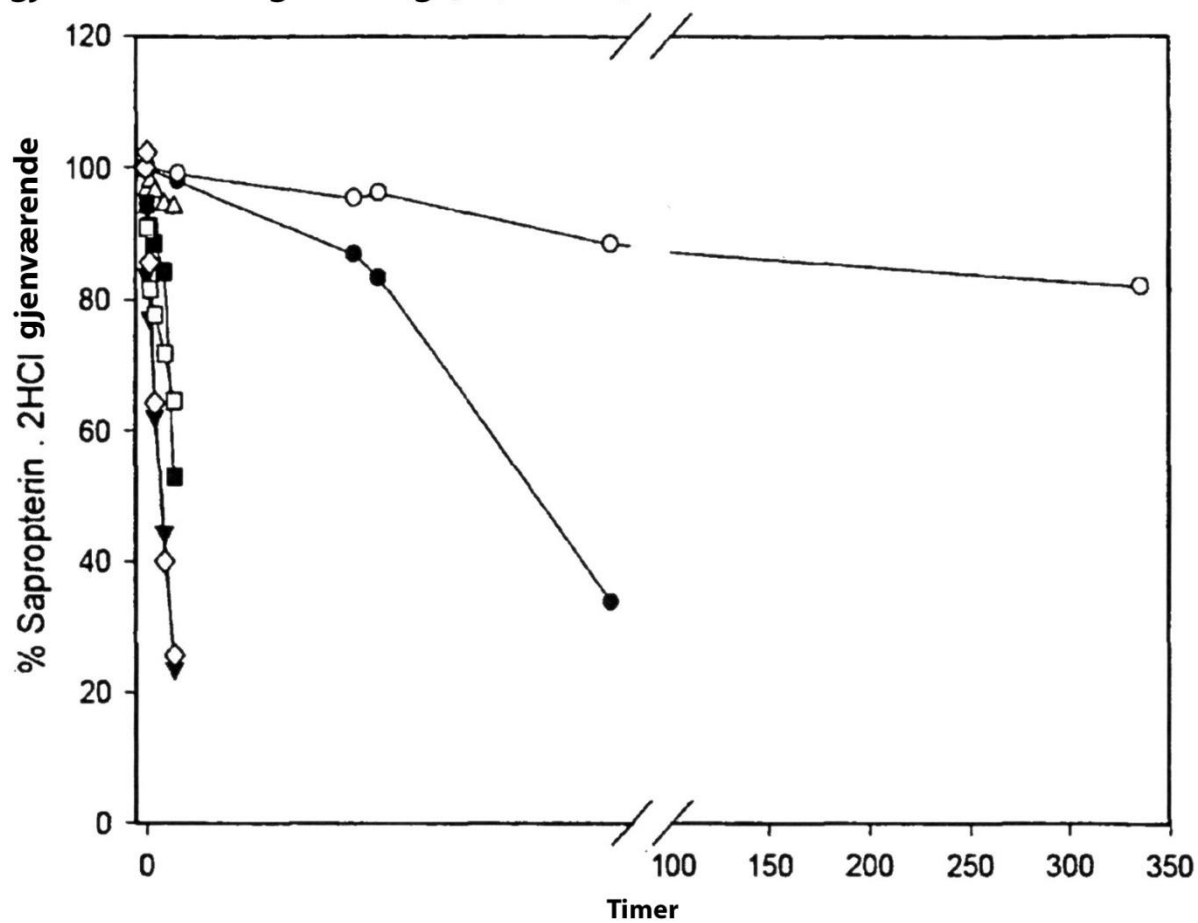


Figur 36
Stabilitet av BH4 i pH 4 buffer i nærvær og fravær av antioksidanter og gjennombobling med argon



Figur 37

Stabilitet av BH4 i pH 7 buffer i nærvær og fravær av antioksidanter og gjennombobling med argon



Figur 38

Stabilitet av BH4 gjenværende i pH 4 bufferløsning over tid som funksjon av konsentrasjon

