



**Università
di Genova**

DIFAR DIPARTIMENTO
DI FARMACIA

SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE
DIPARTIMENTO DI FARMACIA
LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA

Sviluppo e valutazione della stabilità di una sospensione orale
galenica di ruxolitinib per uso pediatrico presso la Farmacia
dell'Ospedale G. Gaslini

Candidata

Chiara D'Amaro

Relatore: Prof.ssa Eleonora Russo

Correlatore: Dott.ssa Stefania Gamba

Anno accademico 2025-2026

Sommario

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Il ruxolitinib	2
1.1.1 Proprietà chimico-fisiche, farmacologiche e farmacocinetiche del ruxolitinib	2
1.1.2 La via JAK-STAT	3
1.1.3 Trial clinici nella GVHD acuta e cronica	5
1.1.4 Il profilo di sicurezza	7
1.2 Forme farmaceutiche del ruxolitinib	9
1.2.1 La formulazione in compresse	10
1.2.2 Le cartine galeniche	11
1.2.3 Le sospensioni orali	12
1.2.4 La soluzione orale industriale Jakavi® 5 mg/mL	15
1.3 Patologia graft-versus-host disease acuta e cronica	18
1.4 Off-label	20
1.5 Obiettivo della tesi	21
2. PARTE SPERIMENTALE	22
2.1 Razionale dello studio	22
2.2 Materiali e metodi	23
2.3 Allestimento galenico di cartine contenenti Jakavi®	24
2.4 Allestimento galenico della sospensione orale di Jakavi®	26
2.5 Studi di stabilità	33
2.5.1 Prime considerazioni sugli studi condotti	33
2.5.2 HPLC	34
2.5.3 Componenti dello strumento	35
2.5.4 Trattamento del campione	38
2.5.5 Dosaggio quantitativo HPLC	40
2.5.6 Stabilità 6°C e 25°C	41
2.5.7 Analisi DAD	41
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	43
3.1 Fotografie dei campioni preparati in laboratorio	43
3.2 Analisi cromatografica HPLC-DAD	44
3.3 Analisi quantitativa mediante HPLC	48
4. CONCLUSIONI	52
5. BIBLIOGRAFIA	54

1. INTRODUZIONE

Il presente capitolo si propone di approfondire le caratteristiche farmacologiche del ruxolitinib, analizzandone la struttura chimica, il meccanismo d'azione, le principali evidenze cliniche e il ruolo terapeutico nella Graft-versus-Host Disease (GvHD) steroideo-refrattaria. Verranno inoltre descritti gli aspetti farmaceutici e formulativi della molecola, con particolare attenzione alle problematiche legate alla somministrazione in età pediatrica, che hanno costituito il razionale per lo sviluppo della preparazione galenica oggetto del presente lavoro di tesi.

Negli ultimi anni la crescente diffusione delle terapie target ha profondamente modificato il trattamento di numerose patologie oncoematologiche e immunomediate. Tra queste, gli inibitori delle Janus chinasi (JAK) rappresentano una delle principali innovazioni terapeutiche, grazie alla capacità di modulare selettivamente la risposta immunitaria e i processi infiammatori alla base di numerose malattie.

Il ruxolitinib è stato il primo inibitore selettivo di JAK1 e JAK2 ad essere introdotto nella pratica clinica e, nel corso degli anni, il suo impiego si è progressivamente esteso dalle neoplasie mieloproliferative fino al trattamento della malattia del trapianto contro l'ospite (Graft-versus-Host Disease, GvHD), una delle complicanze più gravi del trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche.

Parallelamente all'evoluzione delle indicazioni terapeutiche, è emersa la necessità di sviluppare formulazioni farmaceutiche maggiormente adatte alla popolazione pediatrica. La disponibilità esclusiva della forma in compresse ha infatti rappresentato per lungo tempo un importante limite nella gestione dei pazienti più piccoli, rendendo necessario il ricorso a preparazioni galeniche magistrali ottenute mediante riconversione della forma farmaceutica commerciale. In questo contesto, la farmacia ospedaliera assume un ruolo fondamentale nello sviluppo di formulazioni personalizzate, in grado di rispondere a esigenze cliniche non soddisfatte dai medicinali industriali e di garantire continuità terapeutica ai pazienti pediatrici.

1.1 Il ruxolitinib

Il ruxolitinib, nome commerciale Jakavi®, è un principio attivo appartenente alla classe degli inibitori selettivi orali delle Janus chinasi JAK1 e JAK2. Il farmaco, inizialmente autorizzato per il trattamento della mielofibrosi primaria e della policitemia vera nell'adulto, ha successivamente ottenuto l'estensione delle indicazioni terapeutiche alla malattia del trapianto contro l'ospite (GVHD), sia nella forma acuta sia nella forma cronica, anche nella popolazione pediatrica [1,2]. Il ruxolitinib, identificato chimicamente come R) -3-(4-(7H-pirrolo[2,3d] pirimidin-4-yl) -1H-pyrazol-1-yl) -3cyclopentylpropanenitrile phosphate [3], viene formulato sotto forma di sale fosfato per ottimizzarne il profilo di idrosolubilità e di biodisponibilità orale.

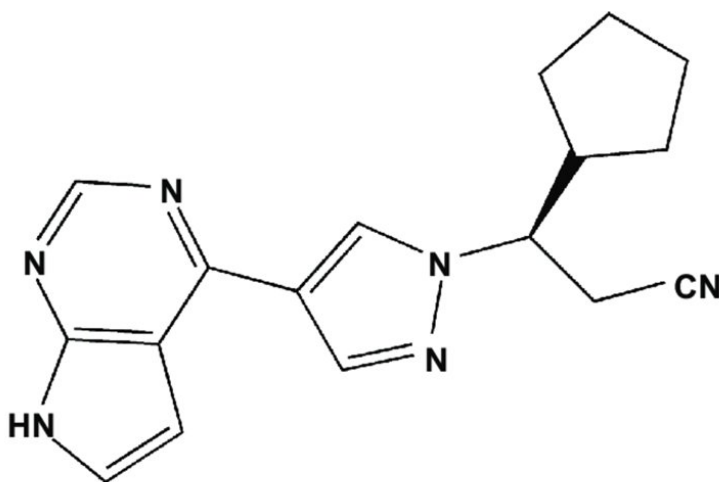


Figura 1. Struttura molecolare del Ruxolitinib

1.1.1 Proprietà chimico-fisiche, farmacologiche e farmacocinetiche del ruxolitinib

Il ruxolitinib è una piccola molecola appartenente alla classe degli inibitori delle protein-chinasi, classificata secondo il sistema Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) con il codice L01EJ01. La molecola viene somministrata per via orale sotto forma di sale fosfato, caratterizzato da una buona biodisponibilità e da un rapido assorbimento a livello gastrointestinale.

Dopo somministrazione orale, il ruxolitinib presenta una biodisponibilità assoluta di circa il 95%, raggiungendo la concentrazione plasmatica massima (C_{max}) entro circa un'ora dall'assunzione [3]. L'assorbimento non risulta significativamente influenzato dalla contemporanea assunzione di alimenti, consentendo la somministrazione indipendentemente dai pasti. Il farmaco mostra una farmacocinetica pressoché lineare nell'intervallo di dosi terapeutiche comunemente impiegate.

Il volume apparente di distribuzione è pari a circa 75 L, indicando un'ampia distribuzione nei tessuti. Il legame alle proteine plasmatiche è elevato (circa 97%) ed interessa prevalentemente l'albumina sierica.

La biotrasformazione del ruxolitinib avviene principalmente a livello epatico ad opera dell'isoenzima CYP3A4 e, in misura minore, del CYP2C9 [3]. Tale caratteristica rende particolarmente rilevanti le possibili interazioni farmacologiche con medicinali in grado di inibire o indurre tali enzimi, rendendo talvolta necessario un aggiustamento della posologia.

L'eliminazione avviene prevalentemente sotto forma di metaboliti inattivi attraverso le urine, mentre solo una minima quota viene escreta immodificata. L'emivita plasmatica terminale è relativamente breve, pari a circa 3 ore, giustificando la necessità di una somministrazione bis in die nella maggior parte delle indicazioni terapeutiche [4].

Nei pazienti con compromissione epatica o con insufficienza renale severa può rendersi necessario un aggiustamento della dose, al fine di limitare il rischio di accumulo del farmaco e l'insorgenza di tossicità ematologica. L'efficacia del ruxolitinib risiede nella capacità di riuscire ad agire come un modulatore della risposta immunitaria, riuscendo ad inibire i recettori chinasi prima che possano trasmettere il segnale al nucleo della cellula. Inoltre, il farmaco agisce direttamente sui meccanismi biologici che regolano l'attivazione dei linfociti T. Per comprendere correttamente l'impatto biologico dell'inibizione esercitata dal farmaco, è prima necessario comprendere il meccanismo biologico naturale della via JAK-STAT nella fisiopatologia della GVHD acuta e cronica [4].

1.1.2 La via JAK-STAT

Le Janus chinasi (JAK) sono componenti di segnalazione intracellulari che agiscono sulle citochine [3]. Sebbene la famiglia delle JAK sia composta da 4 forme distinte, le forme più rilevanti nella malattia del trapianto contro l'ospite sono: JAK1, JAK2 e JAK3.

Nello specifico, si evidenzia che un ruolo fondamentale nella patogenesi della GVHD acuta, è la via di segnalazione JAK-STAT che regola l'evoluzione della malattia fin dal suo esordio.

Il suddetto meccanismo si articola nelle seguenti tre fasi biologiche.

Durante la prima fase della GVHD acuta, il danno tissutale, causato dal regime di condizionamento pre-trapianto, porta all'espressione di citochine infiammatorie, le quali concorrono all'attivazione delle cellule presentanti l'antigene (APCs), processo regolato proprio dalla via JAK-STAT.

Durante la seconda fase della GVHD acuta, l'attivazione e la successiva espansione clonale dei linfociti T del donatore, indotte dall'interazione con le APC, richiedono l'intervento determinante della segnalazione mediata da JAK1 e JAK2.

Infine, nella terza fase, le cellule immunitarie attivate migrano verso i tessuti bersaglio, causando un danno tissutale. Tale fenomeno è governato dal traffico linfocitario chemochina-mediato, nell'ambito del quale la via JAK/STAT assume un ruolo decisivo.

Sebbene la GVHD acuta, così come quella cronica - di cui si parlerà nel seguito - siano riconosciute come complicanze distinte dopo il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche, la fisiopatologia immunitaria ad esse sottostante è simile ed è guidata dall'interazione delle APC con le cellule T del donatore, che innesca una risposta immunitaria contro i tessuti del ricevente.

Le caratteristiche distintive della GVHD cronica, tuttavia, includono: la compromissione della tolleranza immunitaria centrale, un'inadeguata tolleranza periferica dovuta alla riduzione numerica funzionale delle cellule Treg ed infine, la presenza di processi di fibrosi tissutale.

Nel sopradescritto contesto, l'inibizione farmacologica di JAK 1 e JAK2 si rivela una strategia terapeutica chiave: infatti, la via di segnalazione STAT1/STAT3 viene soppressa e contemporaneamente viene ridotta la produzione di citochine pro-infiammatorie chiave (IFN-gamma, IL-6 e IL-2), promuovendo l'espansione e la stabilità fenotipica delle cellule T regolatorie (Treg), ripristinando così la tolleranza immunitaria [5].

Data la centralità del suddetto meccanismo di regolazione delle risposte immunitarie, le isoforme JAK 1 e JAK 2 sono state identificate come bersagli molecolari volti a modulare le patologie autoimmuni [3], con un ruolo che si estende dalle fasi iniziali fino alla completa manifestazione clinica della malattia [3].

Inoltre, l'importanza clinica della cascata JAK/STAT è supportata da studi preclinici, che hanno rilevato come il blocco di essa sia in grado di sopprimere la polarizzazione Th1 e Th17, attenuando il danno infiammatorio tissutale e preservando l'attività del graft-versus-leukemia (GvL) [5]. Tali evidenze identificano JAK1 e JAK 2 come nodo immunologico centrale nella patogenesi delle GVHD e come bersagli terapeutici razionali sia per la forma acuta sia per quella cronica.

Sulla scorta dei menzionati studi, il ruxolitinib è stato testato in pazienti adulti affetti da GVHD acuta e cronica che non rispondevano alla terapia con steroidi (SR GVHD), dimostrandosi in entrambi i casi efficace e sicuro [1].

1.1.3 Trial clinici nella GVHD acuta e cronica

In virtù degli ottimi meccanismi biochimici correlati alla via JAK-STAT, l'applicazione clinica del ruxolitinib si è inizialmente concentrata sulla GVHD acuta steroide-resistente. Tale patologia rappresenta infatti una severa emergenza medica che, richiedendo interventi di salvataggio tempestivi, ha trovato nell'inibizione selettiva di JAK 1 e JAK2 una risposta terapeutica efficace.

A questo riguardo, il merito di aver documentato per la prima volta l'efficacia e i benefici clinici di ruxolitinib è dello studio pilota di Spoerl et al. [33ART1] [3], nel quale sono stati arruolati sei pazienti con GVHD acuta refrattaria agli steroidi con coinvolgimento della cute, del tratto gastrointestinale e del fegato. Ebbene gli esiti hanno evidenziato un effetto clinicamente significativo, con un tempo di risposta rapido, compreso tra 1 settimana a 1,5 settimane.

In seguito, in uno studio retrospettivo multicentrico internazionale più ampio, Zeiser et al [3], sono stati riportati gli esiti su 54 pazienti con GVHD acuta steroide refrattaria, trattati con ruxolitinib come terapia di salvataggio, osservando un tasso di risposta globale (ORR) dell'81.5% (44 pazienti su 54), comprendente 25 risposte complete (46.3%).

I risultati promettenti ottenuti dagli studi retrospettivi sopramenzionati hanno portato allo sviluppo dello studio prospettico REACH1, un trial multicentrico e a braccio singolo, condotto su pazienti di età pari o superiore a 12 anni con GVHD acuta SR [3]. In particolare, i pazienti arruolati hanno mostrato un tasso di risposta globale (ORR) del 73.2% e una risposta completa (CR) nel 56.3% dei casi [1].

I suddetti studi hanno confermato l'efficacia del farmaco, ma hanno anche evidenziato tossicità ematologiche, tra cui anemia, piastropenia e neutropenia.

Successivamente, il consolidamento dello standard terapeutico è arrivato con lo studio di fase III chiamato REACH2, consistente in un trial multicentrico, randomizzato, open-label che confronta ruxolitinib rispetto alla migliore terapia disponibile (BAT, Best Available Therapy) in pazienti con GVHD acuta SR di grado 2-4.

Lo studio REACH 2 si pone come obiettivo primario di confrontare l'efficacia di ruxolitinib rispetto alle terapie convenzionali già in commercio.

In virtù dei dati positivi ottenuti, nel 2019 il ruxolitinib ha ricevuto l'approvazione ufficiale da parte della FDA per il trattamento della malattia del trapianto contro l'ospite acuta resistente agli steroidi, estesa in seguito anche alla forma cronica nei pazienti di età pari ai 12 anni [1].

Successivamente, sono stati eseguiti trial clinici anche su pazienti con GVHD cronica, patologia che si sviluppa in oltre il 70% dei pazienti sottoposti a trapianto allogenico. L'impatto terapeutico di ruxolitinib in questo scenario è stato riportato per la prima volta in uno studio retrospettivo da Zeiser et al. [3], nel quale sono stati raccolti i dati di 95 pazienti con GVHD SR, che avevano

ricevuto una terapia di salvataggio con il farmaco. Gli autori hanno osservato un tasso di risposta globale (ORR) dell'85%, con un 7% dei casi di risposte complete.

In seguito, la letteratura si è arricchita di ulteriori trial multicentrici, tra i quali, lo studio di Gonzalez-Vincent et al. Esso ha valutato l'uso di ruxolitinib in una coorte di pazienti pediatrici sottoposti a trapianto, affetti da GVHD acuta o cronica, mentre un altro studio e cioè quello di Abedin et al. [3] ha posto l'accento sulla sicurezza, segnalando eventuali complicanze infettive nel 42 % dei casi e suggerendo un attento monitoraggio delle misure di riattivazione virale nei pazienti con GVHD trattati con ruxolitinib.

Attualmente è in corso un ampio studio clinico di Fase III, multicentrico, randomizzato e open label chiamato REACH3, che confronta ruxolitinib rispetto alla migliore terapia disponibile (BAT) in pazienti con GVHD cronica SR [3].

Nel seguito, si riporta una tabella riepilogativa degli studi sopracitati.

Tabella 1. Principali studi clinici che hanno valutato l'efficacia e la sicurezza del ruxolitinib nel trattamento della Graft-versus-Host Disease (GvHD) acuta e cronica steroide-refrattaria. Per ciascuno studio sono riportati il numero di pazienti arruolati, il disegno sperimentale, la popolazione studiata, il tasso di risposta globale (Overall Response Rate, ORR) e le principali tossicità osservate durante il trattamento.

Autore	N° pazienti	Studio	Popolazione	ORR	Principali tossicità
Zeiser et al.	159	Studio di fase III (REACH2)	GvHD acuta (adulti)	62.3% a 28 giorni	Trombocitopenia, anemia, neutropenia, infezione da CMV, riattivazione EBV
Zeiser et al.	165	Studio di fase III (REACH3)	GvHD cronica (adulti)	49.7% a 24 settimane	Anemia, trombocitopenia, aumento degli enzimi epatici, incremento della creatinina
González-Vincent et al.	22	Studio retrospettivo monocentrico	GvHD acuta e cronica (adulti e bambini)	Acuta: 77%; Cronica: 89%	Trombocitopenia, infezioni

Contemporaneamente alla ricerca e sviluppo nel paziente adulto, l'interesse scientifico si è focalizzato anche sulla popolazione pediatrica, dove l'utilizzo del ruxolitinib, in pazienti al di sotto dei 12 anni, è stato a lungo guidato da regimi off-label [1]. Una tappa fondamentale è rappresentata dallo studio REACH4, un trial clinico in cui viene valutata l'efficacia e la sicurezza dell'aggiunta di ruxolitinib alla terapia steroidea di prima linea nei pazienti pediatrici [1]. I parametri di arruolamento ammettevano bambini e ragazzi in età compresa tra i 28 giorni fino a meno di 18 anni, con diagnosi conclamata di malattia acuta da rigetto del trapianto contro l'ospite (aGVHD) [6].

Parallelamente, lo studio REACH5 (fase II) ha valutato le stesse proprietà terapeutiche e di sicurezza del farmaco ruxolitinib, focalizzandosi tuttavia su pazienti pediatrici e adolescenti affetti dalla variante cronica della patologia (cGVHD) [7].

1.1.4 Il profilo di sicurezza

Se da un lato gli studi clinici sopra menzionati hanno registrato straordinari tassi positivi di risposta, dall'altro sono emersi diversi effetti collaterali soprattutto in ambito pediatrico.

È fondamentale ricordare, infatti, che tutti i dati sperimentali ottenuti devono essere traslati nella vita quotidiana e quindi non possono prescindere da un'accurata valutazione del profilo di sicurezza del farmaco. Inoltre, i risultati positivi presenti in letteratura si scontrano inevitabilmente con una popolazione intrinsecamente fragile, ovvero quella pediatrica. In questo contesto clinico, gli eventi avversi presentati si configurano come una conseguenza diretta al meccanismo d'azione del ruxolitinib.

L'inibizione delle Janus chinasi, in particolare JAK1 e JAK2, sebbene fondamentale per spegnere la tempesta citochinica che caratterizza la GVHD, impatta sui normali meccanismi fisiologici, quali l'ematopoiesi e la sorveglianza immunitaria. Infatti, le principali tossicità riscontrate nel paziente pediatrico sono:

1. **Citopenie:** La trombocitopenia, l'anemia e la neutropenia sono tra gli effetti avversi di natura ematologica più comuni riscontrati durante il trattamento con ruxolitinib. Nel caso di trombocitopenia è prevista una riduzione del dosaggio del farmaco o la temporanea sospensione del trattamento; in aggiunta, può anche essere necessaria la trasfusione di piastrine [3].

I pazienti che sviluppano anemia possono richiedere emotrasfusioni o modifiche posologiche. La neutropenia di grado severo è generalmente reversibile mediante l'interruzione temporanea del farmaco fino al recupero dei valori.

Pertanto, al fine di garantire la sicurezza del paziente, prima dell'inizio del trattamento è necessario eseguire un esame emocromocitometrico completo con un monitoraggio ogni 2-4 settimane fino alla stabilizzazione del dosaggio.

2. **Complicanze infettive:** Durante la terapia con ruxolitinib si possono verificare infezioni batteriche, micobatteriche, fungine e virali. I pazienti devono essere strettamente monitorati rigorosamente per intercettare tempestivamente la comparsa di sintomi infettivi. Tra le infezioni più comuni si segnalano la riattivazione della tubercolosi e l'insorgenza della leucoencefalopatia multifocale progressiva: in questi casi, la somministrazione di ruxolitinib deve essere immediatamente interrotta e il paziente sottoposto ad opportuni accertamenti. Altre complicanze infettive comprendono la riattivazione dell'Herpes Zoster e il virus dell'epatite B [3].

3. **Neoplasie cutanee non-melanoma:** Il trattamento a lungo termine è stato associato a un aumentato rischio di tumori cutanei non melanoma, inclusi il carcinoma basocellulare, lo squamocellulare e il carcinoma delle cellule di Merkel. Pertanto, i pazienti in terapia con ruxolitinib devono essere sottoposti a esami dermatologici durante il corso della terapia [3].
4. **Incremento dei parametri lipidici:** Sul piano metabolico, si osserva frequentemente l'innalzamento del colesterolo LDL e dei trigliceridi [3].
5. **Epatotossicità:** La molecola può indurre possibili fenomeni di epatotossicità, contraddistinti da aumento degli enzimi epatici (ALT e AST). Tali variazioni enzimatiche sono una tipica alterazione di Grado 1 (fino al 25% dei casi) [3].

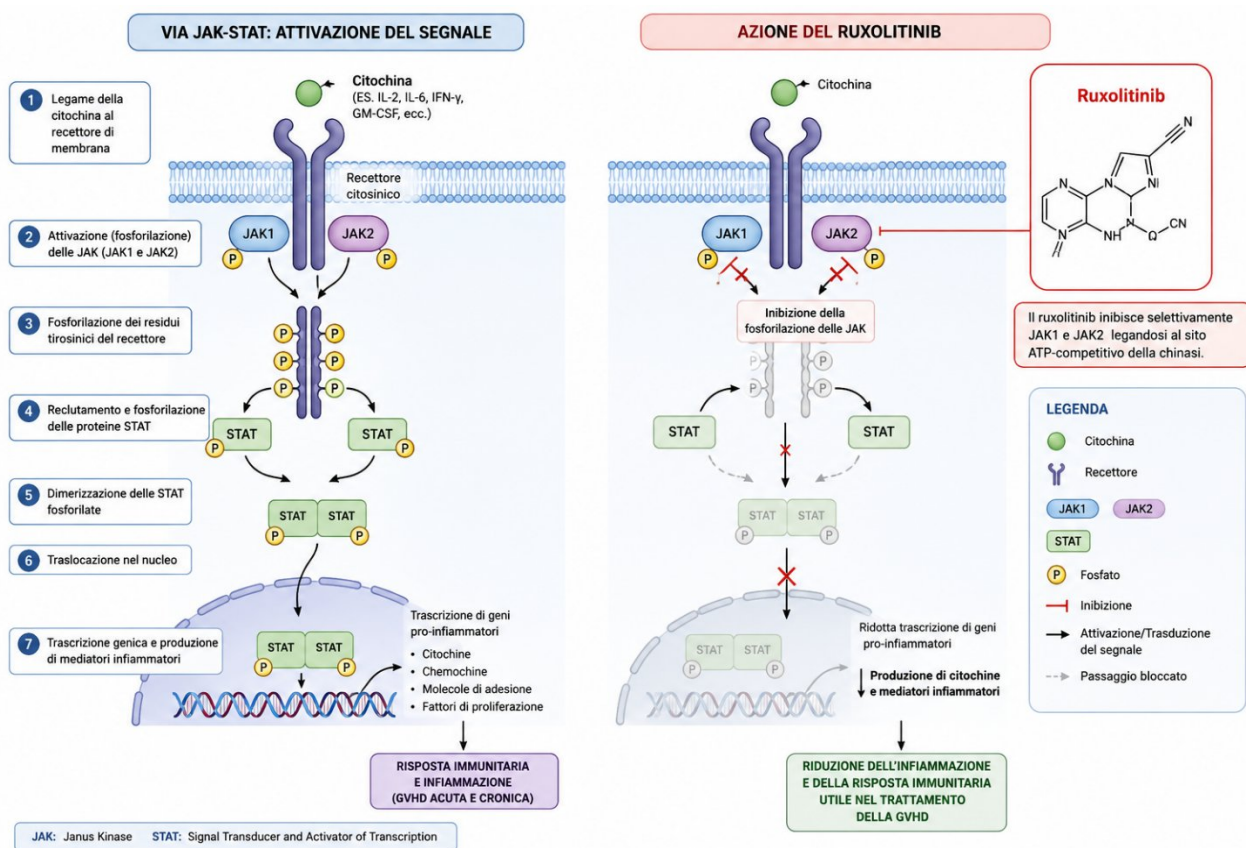


Figura 2. Rappresentazione schematica della via di segnalazione JAK-STAT e del meccanismo d'azione del ruxolitinib. Schema realizzato dall'autrice sulla base della letteratura scientifica e del Riassunto delle Caratteristiche del Prodotto (RCP) di Jakavi®.

1.2 Forme farmaceutiche del ruxolitinib

La scelta della forma farmaceutica rappresenta uno degli aspetti fondamentali dello sviluppo di un medicinale, poiché influenza non soltanto la stabilità del principio attivo, ma anche la modalità di somministrazione, l'accuratezza del dosaggio, l'aderenza terapeutica del paziente e, in ultima analisi, l'efficacia della terapia.

Nel paziente pediatrico tali aspetti assumono un'importanza ancora maggiore. Le profonde differenze fisiologiche rispetto all'adulto, la variabilità del peso corporeo, le limitate capacità di deglutizione e la necessità di frequenti aggiustamenti posologici rendono spesso inadeguate le forme farmaceutiche sviluppate per la popolazione adulta. In questo contesto, la disponibilità di formulazioni flessibili e facilmente personalizzabili costituisce un requisito fondamentale per garantire una terapia sicura ed efficace.

In Italia, il principio attivo ruxolitinib è commercializzato, come già detto, con il nome di Jakavi® ed è attualmente disponibile in diverse formulazioni, sviluppate per rispondere alle differenti esigenze terapeutiche della popolazione adulta e pediatrica. La specialità medicinale è autorizzata per il trattamento della mielofibrosi primaria, della mielofibrosi post-policitemia vera e post-trombocitemia essenziale, della policitemia vera resistente o intollerante all'idrossiurea e della malattia del trapianto contro l'ospite (Graft-versus-Host Disease, GvHD), sia nella forma acuta sia nella forma cronica, nei pazienti adulti e pediatrici secondo le indicazioni riportate nel Riassunto delle Caratteristiche del Prodotto (RCP) [4].

Per molti anni Jakavi® è stato commercializzato esclusivamente sotto forma di compresse rivestite nei dosaggi da 5, 10, 15 e 20 mg. Sebbene tale forma farmaceutica presenti numerosi vantaggi dal punto di vista della stabilità, della precisione posologica e della produzione industriale, essa risulta poco adatta ai pazienti pediatrici, nei quali è frequentemente necessario personalizzare il dosaggio e ricorrere a modalità di somministrazione alternative.

In questo scenario la farmacia ospedaliera ha assunto un ruolo determinante nello sviluppo di preparazioni galeniche personalizzate, in grado di rispondere ad esigenze terapeutiche non soddisfatte dai medicinali industriali. La trasformazione delle compresse in preparazioni magistrali, inizialmente sotto forma di cartine e successivamente di sospensioni orali, ha rappresentato una soluzione indispensabile per garantire la continuità terapeutica nei bambini affetti da GVHD e in tutti i pazienti con difficoltà di deglutizione.

L'evoluzione delle formulazioni del ruxolitinib costituisce un esempio significativo del ruolo della galenica clinica nell'ambito della medicina personalizzata. L'identificazione di un bisogno terapeutico concreto da parte delle farmacie ospedaliere ha infatti anticipato lo sviluppo della nuova formulazione industriale Jakavi® 5 mg/mL soluzione orale, recentemente autorizzata per il trattamento della GVHD nei pazienti pediatrici e nei soggetti con difficoltà di deglutizione.

Tale evoluzione non riduce il valore delle preparazioni galeniche, ma ne conferma l'importanza quale strumento capace di rispondere tempestivamente a bisogni clinici non ancora soddisfatti dall'industria farmaceutica, favorendo successivamente lo sviluppo di formulazioni industriali dedicate.

Alla luce di queste considerazioni, risulta evidente come le differenti forme farmaceutiche del ruxolitinib rappresentino non soltanto modalità alternative di somministrazione del principio attivo, ma strumenti terapeutici complementari, ciascuno caratterizzato da specifici vantaggi, limiti e ambiti di impiego. Nei paragrafi successivi verranno pertanto analizzate le principali formulazioni utilizzate nella pratica clinica, con particolare attenzione agli aspetti tecnologici e formulativi che hanno portato allo sviluppo della sospensione orale oggetto del presente lavoro di tesi.

1.2.1 La formulazione in compresse

Tra le forme farmaceutiche solide orali destinate alla deglutizione, vi sono le compresse che costituiscono tuttora la formulazione d'elezione, ottenute attraverso la compressione meccanica di agglomerati di volumi uguali di particelle. Tale tecnologia garantisce un'elevata accuratezza posologica di farmaco, che avviene mediante una cinetica di rilascio controllata in un arco di tempo ben definito e che possibilmente arrivi al target biologico, in modo tale da evitare eventuali effetti sistemici indesiderati.

Nonostante le caratteristiche positive delle compresse, quali la facilità di impiego, la stabilità chimico-fisica, il mascheramento delle proprietà organolettiche avverse e l'abbassamento dei costi industriali, continuano a persistere criticità legate alla formulazione: difficoltà nella scelta degli eccipienti da utilizzare, oppure complicazioni legati alla disgregazione a causa di una sovra-compattazione, inibendo la corretta liberazione del principio attivo o causando un rilascio localizzato e irritante a livello della mucosa gastrica. Inoltre, l'applicazione clinica di queste forme farmaceutiche rappresenta limiti significativi in popolazioni fragili; se da un lato la compressa rappresenta una elevata compliance negli adulti, dall'altro l'incapacità di deglutizione rende tali forme inadeguate per l'ambito pediatrico.

A quest'ultimo proposito, si evidenzia che nell'anno 2024, presso l'istituto Giannina Gaslini di Genova, è emerso un caso relativo ad un paziente pediatrico di tre anni, affetto da GVHD post-trapianto. In quel periodo la specialità medicinale Jakavi® era disponibile solo in compresse e pertanto la mancanza di una adeguata formulazione farmaceutica ha richiesto un notevole sforzo clinico, per poter individuare vie di somministrazione alternative.

1.2.2 Le cartine galeniche

Per riuscire a colmare il gap terapeutico determinato dall'impossibilità, per alcuni pazienti di assumere la formulazione in compresse, la prima opzione adottata è stata l'allestimento di cartine monodose da 1.6 mg ciascuna. La preparazione veniva allestita sotto cappa a flusso laminare verticale nella stanza Unità Farmaci Antiblastici, poiché il principio attivo è classificato come antineoplastico (classificazione ATC L01EJO1).

Questa preparazione estemporanea prende il nome di "cartine", poiché il preparato prevede l'utilizzo di fogli di carta oleata, che contengono polveri semplici oppure polveri composte; si tratta di forme farmaceutiche monodose solide, preparate e dispensate in farmacia. Tale allestimento è stato pensato per poter ovviare al problema del dosaggio frazionato, non presente in commercio e per poter superare la questione dell'incapacità di deglutire una compressa intera da parte del bambino.

Nell'allestimento di preparazioni galeniche magistrali a base di polveri, è importante assicurare che le dimensioni delle particelle siano sufficientemente fini, con l'obiettivo di ottenere una buona ripartizione in dosi e per migliorare la velocità di dissoluzione.

La triturazione in mortaio rappresenta l'operazione tecnologia maggiormente utilizzata per garantire l'uniformità della granulometria delle particelle, favorendo simultaneamente un'omogenea miscelazione. Successivamente, la preparazione estemporanea prevede il travaso della massa ottenuta su una carta di dimensioni opportune e la ripartizione manuale per caduta sul centro delle singole cartine. Ognuna di esse dovrà contenere la dose unitaria di principio attivo prescritta, garantendo così l'accuratezza del dosaggio e l'uniformità della preparazione.

Al momento della somministrazione, la polvere viene ricostituita con acqua o mescolata con un alimento idoneo, secondo le indicazioni fornite.

Sebbene questa metodica sia molto diffusa in ambito pediatrico, per dosare frazioni di milligrammo, altrimenti non disponibili in commercio, tale procedimento potrebbe generare delle criticità pratiche.

Si consideri, a titolo di esempio, l'esposizione del personale sanitario ad un rischio accidentale di inalazione o contatto con il farmaco durante il processo di triturazione, nonché la potenziale perdita di principio attivo legata all'allestimento di una preparazione estemporanea. In aggiunta a ciò, la polverizzazione delle compresse potrebbe portare anche ad una mancata copertura delle caratteristiche organolettiche sgradevoli del principio attivo, causando una minore aderenza terapeutica al trattamento.

In ultima analisi, né le compresse né le cartine possono garantire una piena efficacia terapeutica: infatti, i vantaggi introdotti da una determinata forma farmaceutica vanno spesso a discapito degli obiettivi raggiunti con un'altra. Di conseguenza, si crea inevitabilmente un circolo vizioso, perché

la risoluzione di una criticità chimico-farmaceutica comporta l'insorgenza di un nuovo limite pratico. Per questo motivo l'alternativa dello sviluppo di una preparazione liquida farmaceutica stabile appare più vantaggiosa. Le preparazioni liquide orali sono infatti raccomandate per i bambini al di sotto dei 6 anni di età e possono essere utilizzate anche per altre fasce della popolazione pediatrica [8].

Dal momento che il dosaggio del farmaco varia in base al volume somministrato, la formulazione liquida orale rappresenta la scelta preferenziale per ridurre il rischio di potenziali errori o imprecisioni terapeutiche e per migliorare la compliance del paziente e del caregiver [8].

1.2.3 Le sospensioni orali

Come riportato dalla Farmacopea Ufficiale le preparazioni liquide per uso orale si presentano generalmente sotto forma di soluzioni, emulsioni o sospensioni, ottenute disperdendo uno o più principi attivi in un veicolo adatto.

Nello specifico, le sospensioni orali sono sistemi bifasici eterogenei, in cui è presente una fase solida, finemente suddivisa e uniformemente dispersa in una fase liquida continua. Il veicolo per ogni preparazione per uso orale è selezionato in funzione della natura del principio attivo presente e dell'ottimizzazione delle caratteristiche organolettiche; condizione necessaria per l'accettabilità del preparato.

Tali formulazioni sono fornite in contenitori unidose o multidose, in questo ultimo caso, la somministrazione viene effettuata per mezzo di un dispositivo adatto a misurare il volume prescritto, in genere si tratta di cucchiari o tazze adeguate a volumi di 5 ml o multipli oppure, preferibilmente, siringhe orali per volumi personalizzati [9].

A seguito di un'accurata revisione della letteratura scientifica, è stato individuato uno studio pubblicato sulla rivista *The Scientific World Journal*, intitolato "Physicochemical Stability Study of Oral Suspension Containing ruxolitinib in Children with Steroid-Refractory Acute Graft-Versus-Host Disease", finalizzato alla formulazione di una sospensione orale di ruxolitinib per uso pediatrico. Lo studio aveva l'obiettivo di valutare la stabilità chimico-fisica della preparazione durante l'arco di 60 giorni, confrontando due diverse condizioni di conservazione: a temperatura ambiente (22-25°C) e in frigorifero (2-8°C); l'allestimento prevedeva la polverizzazione delle compresse di Jakavi® disponibili in commercio e il successivo impiego di InOrpha® come veicolo sospendente.

È importante notare che, l'allestimento della sospensione orale, effettuata presso la farmacia ospedaliera dell'Istituto G. Gaslini, prevede l'impiego della base pronta Syrspend® SF PH4, (la cui composizione è riportata nella sottostante Tabella 2).

Tale approccio differisce da quello descritto nell'articolo preso come riferimento, nel quale veniva utilizzato il veicolo InOrpha® (la cui composizione è riportata nella sottostante Tabella 3).

Tabella 2. Composizione qualitativa di SyrSpend® SF PH4®

COMPOSIZIONE SyrSpend®	Acqua purificata
	Amido di mais modificato
	Sucralosio
	Sodio benzoato (<0,1%)
	Acido citrato
	Simeticone
	Sodio citrato
	Acido malico
	Aroma ciliegia

Tabella 3. Composizione qualitativa di InOrpha®

COMPOSIZIONE Inorpha®	Acqua purificata
	Glicerolo
	Idrossietilcellulosa
	Acido citrico
	Sodio citrato
	Potassio sorbato
	Sucralosio
	Aroma caramello

Il prodotto SyrSpend® SF PH4 è stato selezionato, poiché combina flessibilità di dosaggio, palatabilità e facilità di deglutizione, requisiti fondamentali per un corretto allestimento di forme farmaceutiche liquide orali. Inoltre, tale veicolo è formulato per il mascheramento del sapore, garantendo un gusto gradevole al piccolo paziente.

La formulazione è priva di zucchero, etanolo, lattosio, parabeni e altri eccipienti potenzialmente pericolosi, riducendo i rischi tossicologici e le reazioni allergiche.

Il componente principale responsabile del profilo reologico distintivo di SyrSpend® SF PH4 è l'amido di mais modificato, che conferisce al veicolo un'adeguata viscosità e favorisce il mantenimento delle particelle in sospensione. Inoltre, il sistema sospendente si basa sul

meccanismo “Active Suspending Technology”, il quale conferisce proprietà reologiche e tixotropiche fondamentali per mantenere la qualità del prodotto: infatti, l’elevata viscosità a riposo blocca la sedimentazione del ruxolitinib, mentre l’applicazione di uno sforzo di taglio, come ad esempio una semplice agitazione, permette una facile omogenizzazione della sospensione. Tale dinamica elimina il rischio di sedimentazione irreversibile (caking), garantendo un dosaggio accurato e riproducibile della sospensione orale [10].

Inoltre, la base sospendente SyrSpend® SF PH4 (Figura 3) è specificamente tamponata a pH 4.2 e ciò garantisce la massima compatibilità con il principio attivo evitandone la degradazione e minimizzando le oscillazioni di acidità. Il mantenimento di un ambiente controllato è un requisito fondamentale della formulazione, soprattutto al fine di proteggere il principio attivo da fenomeni di instabilità chimica, che lo andrebbero a degradare qualora il pH della formulazione virasse verso valori alcalini.



Figura 3. SYRSPEND® SF PH4

La recente introduzione in commercio della formulazione in soluzione orale alla concentrazione da 5mg/ml rappresenta una svolta terapeutica significativa. Fino ad ora, infatti, l’assenza di una forma liquida industriale costringeva all’allestimento di preparazioni galeniche magistrali necessariamente off-label. Questa nuova formulazione, indicata esclusivamente per il trattamento della malattia del trapianto contro l’ospite (GVHD), sia in forma acuta che in quella cronica, colma la precedente assenza di una formulazione liquida commerciale, offrendo un’alternativa standardizzata appositamente studiata per pazienti adulti o pediatrici con difficoltà nella deglutizione.

1.2.4 La soluzione orale industriale Jakavi® 5 mg/mL

L'introduzione della formulazione Jakavi® 5 mg/mL soluzione orale rappresenta un'importante evoluzione nello sviluppo farmaceutico del ruxolitinib e costituisce una risposta concreta alla crescente esigenza di disporre di una formulazione idonea alla popolazione pediatrica e ai pazienti con difficoltà di deglutizione. Fino alla sua recente commercializzazione, infatti, il medicinale era disponibile esclusivamente sotto forma di compresse rivestite, rendendo spesso necessario il ricorso a preparazioni galeniche magistrali per consentire la personalizzazione del dosaggio e la somministrazione nei bambini più piccoli.

La nuova formulazione è stata sviluppata specificamente per facilitare la somministrazione orale del ruxolitinib nei pazienti che non sono in grado di deglutire le compresse intere, mantenendo al contempo gli elevati standard qualitativi richiesti per una specialità medicinale industriale. Jakavi® soluzione orale è una soluzione limpida, da incolore a giallo chiaro, con una concentrazione pari a 5 mg/mL di ruxolitinib (come fosfato), confezionata in un flacone di vetro contenente 60 mL di soluzione, corredato da adattatore e due siringhe graduate per la somministrazione orale, che consentono un'accurata misurazione del volume da somministrare.

Dal punto di vista formulativo, la soluzione contiene propilene glicole come cosolvente, oltre a metil- e propil-paraidrossibenzoato come conservanti antimicrobici, eccipienti che contribuiscono alla stabilità microbiologica del preparato durante il periodo di validità del medicinale.

Parallelamente allo sviluppo della nuova formulazione, il ruxolitinib ha ottenuto un'estensione delle indicazioni terapeutiche nella malattia del trapianto contro l'ospite (Graft-versus-Host Disease, GvHD). Attualmente Jakavi® soluzione orale è indicato per il trattamento della GvHD acuta nei pazienti pediatrici di età pari o superiore a 28 giorni e della GvHD cronica nei pazienti pediatrici di età pari o superiore a 6 mesi, nei casi di risposta inadeguata ai corticosteroidi o ad altre terapie sistemiche. La formulazione è inoltre destinata ai pazienti con difficoltà di deglutizione o di gestione delle compresse, indipendentemente dall'età.

Un ulteriore elemento di interesse riguarda la possibilità di effettuare un dosaggio estremamente preciso nei bambini più piccoli. Per i pazienti di età inferiore ai sei anni la dose iniziale viene infatti calcolata in funzione della superficie corporea (Body Surface Area, BSA), consentendo una personalizzazione della terapia difficilmente ottenibile mediante la sola formulazione in compresse. La presenza di una soluzione orale pronta all'uso permette inoltre di ridurre il rischio di errori associati alla manipolazione del medicinale e di migliorare la praticità della somministrazione da parte del caregiver.

L'introduzione della soluzione orale industriale modifica significativamente lo scenario terapeutico del ruxolitinib in ambito pediatrico. Tuttavia, essa non riduce il valore delle preparazioni galeniche sviluppate negli anni precedenti. Al contrario, la disponibilità della nuova

formulazione conferma come l'esigenza clinica che aveva portato allo sviluppo di sospensioni orali magistrali fosse reale e largamente condivisa dalla comunità scientifica. In numerosi centri ospedalieri, infatti, la galenica clinica ha rappresentato per lungo tempo l'unica possibilità per garantire l'accesso alla terapia nei pazienti pediatrici non trattabili mediante le forme farmaceutiche disponibili in commercio.

Viene riportata di seguito la Tabella 4 in cui vengono messe a confronto le principali caratteristiche della sospensione orale galenica sviluppata nell'ambito del presente lavoro di tesi con la nuova formulazione industriale Jakavi® 5 mg/mL soluzione orale. Sebbene entrambe le preparazioni siano finalizzate a consentire la somministrazione orale del ruxolitinib nei pazienti pediatrici e nei soggetti con difficoltà di deglutizione, esse presentano sostanziali differenze dal punto di vista formulativo, regolatorio e applicativo.

La preparazione galenica nasce dall'esigenza di personalizzare la terapia in un periodo in cui non era ancora disponibile una formulazione liquida autorizzata. Essa è ottenuta mediante riconversione della forma farmaceutica commerciale in compresse e utilizza SyrSpend® SF PH4 come veicolo sospendente, consentendo l'allestimento di una sospensione a concentrazione definita e adattabile alle esigenze cliniche del singolo paziente. La qualità della preparazione è garantita dagli studi di stabilità chimico-fisica condotti nell'ambito del presente lavoro sperimentale.

La soluzione orale industriale Jakavi®, invece, rappresenta una formulazione sviluppata e validata dall'industria farmaceutica avvenuta nel maggio 2026, autorizzata dalle autorità regolatorie per il trattamento della GvHD nella popolazione pediatrica. Essa offre il vantaggio di una preparazione standardizzata, pronta all'uso e supportata da dati registrativi relativi a qualità, sicurezza ed efficacia.

Il confronto evidenzia come le preparazioni galeniche e le formulazioni industriali non debbano essere considerate alternative in contrapposizione, bensì strumenti complementari. La galenica ospedaliera continua, infatti, a rivestire un ruolo essenziale nella personalizzazione della terapia, nello sviluppo di soluzioni terapeutiche innovative e nella gestione di situazioni cliniche in cui il medicinale industriale non sia disponibile o non risponda pienamente alle specifiche esigenze del paziente.

Tabella 4. Confronto tra la sospensione orale galenica sviluppata presso la Farmacia dell'Istituto Giannina Gaslini e la soluzione orale industriale Jakavi® 5 mg/mL.

Caratteristica	Sospensione galenica (Gaslini)	Jakavi® soluzione orale
Origine	Preparazione magistrale	Specialità medicinale
Principio attivo	Ruxolitinib da compresse	Ruxolitinib come fosfato
Concentrazione	2 mg/mL	5 mg/mL
Veicolo	SyrSpend® SF PH4	Formulazione industriale brevettata
Indicazione	Personalizzazione della terapia	GvHD pediatrica autorizzata
Studi di stabilità	Eseguiti presso il DIFAR	Validati industrialmente
Personalizzazione	Elevata	Limitata alle concentrazioni disponibili in commercio
Contesto di impiego	Farmacia ospedaliera	Medicinale autorizzato e commercializzato

Il presente lavoro di tesi si inserisce proprio in questo contesto. Lo sviluppo della sospensione orale galenica presso la Farmacia dell'Istituto Giannina Gaslini è stato infatti avviato quando la soluzione orale industriale non era ancora disponibile (maggio 2025). La successiva commercializzazione di Jakavi® 5 mg/mL costituisce pertanto non una smentita del lavoro svolto, bensì la conferma dell'importanza della ricerca galenica ospedaliera nell'identificare precocemente bisogni terapeutici non soddisfatti e nel contribuire allo sviluppo di soluzioni formulative innovative.

1.3 Patologia graft-versus-host disease acuta e cronica

La GVHD rappresenta la principale complicanza immunogenica consecutiva al trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (HCT), configurandosi come la causa più comune di mortalità sia nella popolazione pediatrica sia in quella adulta. Tale condizione scaturisce da una risposta immunitaria alloreattiva, nella quale i linfociti T maturi del donatore riconoscono i tessuti dell'ospite come estranei e li attaccano.

La condizione patologica si presenta in due varianti, acuta e cronica, ciascuna caratterizzata da tratti fenotipici ben definiti. La variante acuta interessa principalmente la cute, il fegato e il tratto gastro intestinale; mentre la forma cronica, che si presenta più tardivamente, è governata da meccanismi fibrotici e autoimmuni che colpiscono gli occhi, i polmoni, la mucosa orale e altri organi [5].

Attualmente, la fisiopatologia della forma acuta si articola in tre differenti processi biologici:

1. Il trattamento di condizionamento, che determina l'infiammazione dei tessuti (infiammazione dei tessuti indotta dal condizionamento).
2. L'interazione iniziale tra le cellule presentanti l'antigene (APC) e le cellule T allogeniche, che porta all'attivazione delle cellule T (attivazione dei linfociti T).
3. La migrazione delle cellule immunitarie e il danno tissutale (migrazione cellulare e danno tissutale).

Lo stadio iniziale scaturisce dal danno tissutale del paziente provocato congiuntamente dalla malattia sottostante, dalle alterazioni del microbiota e dal regime di condizionamento pre-trapianto [3], ovvero quel processo intensivo di chemioterapia e/o radioterapia, somministrato prima dell'infusione delle cellule del donatore. Tale trattamento porta al rilascio di citochine pro-infiammatorie, come il fattore di necrosi tumorale (TNF) e l'interleuchina 1 (IL1) [3]. Nella seconda fase della malattia, proprio queste citochine attivano le cellule presentanti l'antigene dell'ospite (APCs), le quali successivamente innescano la risposta delle cellule T mature del donatore [3].

Si arriva così alla terza fase, quella in cui le cellule T effettrici e le citochine infiammatorie attaccano le cellule epiteliali della cute, del fegato e del tratto gastrointestinale (GI). In aggiunta, prodotti microbici come i lipopolisaccaridi (LPS), rilasciati durante il condizionamento, filtrano attraverso la mucosa intestinale e la pelle danneggiate e stimolano i macrofagi a secernere mediatori proinfiammatori, portando all'amplificazione e alla propagazione di una tempesta citochinica [3].

La biologia della GVHD cronica può essere, analogamente, divisa in tre fasi distinte [3]. Nella fase precoce della malattia cronica, il danno tissutale correlato al condizionamento e ad una precedente GVHD acuta e/o a infezioni, porta al rilascio in circolo e nello spazio extracellulare di

mediatori infiammatori come i DAMPs (pattern molecolari associati al danno) e i PAMPs (pattern molecolari associati ai patogeni). Attraverso i recettori toll-like i suddetti stimoli vengono rilevati e successivamente si verifica un aumento della presentazione dell'antigene da parte di cellule infiammatorie, cellule B, cellule dendritiche, macrofagi e monociti [3].

A seguito alla presentazione dell'antigene mediata dalle APCs, si verifica l'attivazione delle cellule immunitarie effettrici, in particolare i linfociti T e B, segnando l'inizio della seconda fase della malattia del trapianto contro l'ospite.

Giunti a questo stadio, nel centro germinativo le cellule B subiscono ipermutazione somatica e producono anticorpi patogeni, propagando la GVHD cutanea, la bronchiolite e il danno epatico [3]. Il condizionamento pre-trapianto arreca un insulto timico e di conseguenza, viene compromesso il processo di selezione negativa delle cellule T alloreattive. Tale disfunzione nei processi di delezione timica permette il rilascio di cloni di cellule T CD4⁺ autoreattive che invadono i tessuti.

Infine, nella fase terminale della malattia cronica, si assiste alla secrezione di peptidi fibrogenici, come il fattore di crescita trasformante beta (TGF- β) e il fattore di crescita derivato dalle piastrine alfa (PDGF- α), i quali promuovono l'attivazione dei fibroblasti e la sintesi di collagene della matrice extracellulare, conducendo alla deposizione massiva di tessuto fibroso [3].

1.4 Off-label

“L’uso off-label di un medicinale è definito dalle linee guida comunitarie come l’utilizzo terapeutico intenzionale di un medicinale per uno scopo non previsto dal riassunto delle caratteristiche del prodotto autorizzato [11].”

Nell’ambito pediatrico questo fenomeno è da sempre particolarmente diffuso, trattandosi di un settore storicamente penalizzato, poiché da sempre esistono meno farmaci, specialmente per il trattamento delle patologie gravi e rare.

Spesso, infatti, si registra la mancanza di un’adeguata forma farmaceutica o la mancanza di dosaggi correttamente calibrati alle esigenze del piccolo paziente. Tale criticità deriva non solo da un fattore di tipo economico, ma anche dalle oggettive difficoltà di riuscire ad arruolare una popolazione pediatrica idonea ad effettuare un trial clinico controllato.

In questo contesto, la storia del ruxolitinib è un perfetto esempio di utilizzo off label di un medicinale. Il farmaco, infatti, inizialmente autorizzato per pazienti affetti da mielofibrosi e policitemia vera, ha esteso il suo razionale d’uso alla malattia del trapianto contro l’ospite (GVHD), proprio attraverso questo regime di prescrizione al di fuori delle normali condizioni di utilizzo. Questa modalità prescrittiva prevede e consente di poter utilizzare un farmaco formulato per una specifica affezione in determinati contesti clinici, posologie o fasce d’età differenti da quelle originariamente autorizzate dalle autorità regolatorie competenti, rappresentando frequentemente una risorsa terapeutica di salvataggio indispensabile.

Una volta chiarito il ruolo chiave ricoperto dalla via di segnalazione JAK/STAT nella cascata citochinica della GVHD, la centralità del ruxolitinib è diventata sempre più importante.

La molecola comincia così ad essere utilizzata in modalità off-label, superando i limiti sia di patologia sia di età e in seguito, il successo ottenuto da queste prime esperienze pionieristiche ha generato buoni studi retrospettivi, ponendo le basi per l’iter di registrazione ufficiale.

Ad oggi il ruxolitinib, commercializzato con il nome di Jakavi®, è approvato dagli enti regolatori per il trattamento della GVHD steroideo refrattaria acuta e cronica, sia nella popolazione adulta che in quella pediatrica. Tale evoluzione rappresenta l’emblema di un perfetto riposizionamento farmacologico, una strategia basilare che sottolinea l’importanza di investigare sui meccanismi d’azione dei farmaci, in modo tale da poter sfruttare appieno le potenzialità chimico-farmacologiche in tutte le loro sfaccettature.

1.5 Obiettivo della tesi

Nel presente lavoro viene esaminata la sospensione orale galenica a base di ruxolitinib ottenuta a partire dalla forma farmaceutica commerciale in compresse. Sulla formulazione ottenuta sono stati successivamente condotti studi di stabilità finalizzati alla valutazione delle caratteristiche chimico-fisiche nel tempo, al fine di definirne la qualità e l'idoneità all'utilizzo clinico.

In commercio il ruxolitinib è disponibile principalmente sotto forma di compresse rivestite, destinate alla popolazione adulta. Tuttavia, l'impiego del farmaco in ambito pediatrico è in progressivo aumento, soprattutto nel trattamento di patologie rare e condizioni oncoematologiche pediatriche. In questi pazienti la somministrazione della forma solida presenta numerose criticità legate alla difficoltà di deglutizione, alla necessità di personalizzare il dosaggio in funzione del peso corporeo e all'assenza di formulazioni pediatriche autorizzate.

Per tali motivi, la preparazione di formulazioni galeniche liquide rappresenta una strategia fondamentale per garantire una terapia sicura, accurata e facilmente somministrabile. La trasformazione della forma farmaceutica solida commerciale in sospensione orale consente infatti di modulare il dosaggio alle esigenze cliniche del paziente pediatrico, migliorando l'aderenza terapeutica e la praticità di somministrazione.

2. PARTE SPERIMENTALE

2.1 Razionale dello studio

Il presente lavoro sperimentale è stato sviluppato presso il **DIFAR** e la **Farmacia dell'Istituto Giannina Gaslini di Genova**, in collaborazione con il Centro Trapianti di Midollo Osseo Pediatrico, con l'obiettivo di sviluppare una formulazione galenica liquida di ruxolitinib destinata alla somministrazione orale nei pazienti pediatrici.

Al momento dell'avvio del progetto, il medicinale Jakavi® era disponibile esclusivamente sotto forma di compresse rivestite. Tale formulazione risultava poco idonea nei bambini di età inferiore ai sei anni e nei pazienti incapaci di deglutire forme solide, rendendo necessario l'allestimento di preparazioni magistrali personalizzate.

Lo studio è stato quindi articolato in tre fasi principali:

- Sviluppo della formulazione galenica della sospensione orale.
- Definizione del protocollo di preparazione.
- Valutazione della stabilità chimico-fisica della formulazione mediante metodica HPLC-DAD.

L'obiettivo finale era verificare se la sospensione ottenuta a partire dalle compresse commerciali fosse in grado di mantenere nel tempo adeguati requisiti di qualità, uniformità e contenuto di principio attivo, così da poter rappresentare una valida opzione terapeutica per la popolazione pediatrica.

2.2 *Materiali e metodi*

Reagenti, reattivi e solventi impiegati nel corso della realizzazione del progetto tesi:

- Acetonitrile per HPLC (grado HPLC, $\geq 99.9\%$; Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germania).
- Acqua deionizzata.
- Jakavi® compresse 5 mg.
- SyrSpend® SF liquido (Fagron)
- Aroma lampone (Farmalabor S.r.l., Canosa di Puglia, BT, Italia).
- Acqua Pura di Tipo 2 grado FU.
- Ruxolitinib (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germania).

Apparecchiature utilizzate nel corso dello svolgimento del progetto di tesi:

- Agitatore a vibrazione per provette IKA™ VORTEX 2
- HPLC (Hewlett-Packard HP1100 equipaggiata con un rilevatore DAD e una colonna LiChroCART Purospher Star RP18-e column (250 mm $\times$ 4.6 mm i.d.) (5 μ m) (Merck, Darmstadt, Germany) combinata con una precolonna: Merck LiChroCART 4-4 LiChrospher 100 RP18 (5 μ m).
- Pipetta per viscosi BRAND® Transferpettor (Merk, Milan, Italy).
- Filtri a siringa sterili Millex® (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) con membrana da 0.22 μ m.
- Siringa monouso in plastica: siringa sterile in polipropilene (PP), capacità 1 mL (PIC Solution®, Artsana S.p.A., Italia).
- Siringa microlitica per HPLC Hamilton® da 500 μ L (Hamilton Company, Reno, NV, USA)
- Bilancia analitica AS 60/220.R2 (Radwag)

2.3 Allestimento galenico di cartine contenenti Jakavi®

Come già illustrato nel precedente capitolo, al fine di poter superare le difficoltà del piccolo paziente nella deglutizione delle compresse, prima dell'allestimento della sospensione orale contenente ruxolitinib, si è scelto di ricorrere alla preparazione galenica di cartine monodose a partire dalla specialità medicinale Jakavi® in compresse.

L'allestimento galenico delle cartine monodose viene eseguito presso l'Unità Farmaci Antitumorali, sotto cappa a flusso laminare verticale, poiché il ruxolitinib è un principio attivo classificato come antineoplastico. La preparazione prevede la pesatura delle compresse di Jakavi® 5 mg, seguita dal loro trasferimento in un mortaio.

Si procede quindi, alla triturazione delle compresse, fino a ottenere una polvere finemente dispersa visivamente omogenea; in questa fase non è prevista l'aggiunta di eccipienti, in quanto la specialità medicinale di Jakavi® contiene già gli eccipienti necessari.

Una volta ottenuta una polvere omogenea, si procede alla disposizione sul tavolo delle cartine sul piano di lavoro, collocate in modo embricato. La polvere viene quindi trasferita dal mortaio su una cartina di idonee dimensioni, preventivamente piegata a metà lungo il lato maggiore; e da questa, per caduta, viene ripartita in maniera uniforme al centro di ciascuna cartina.

Una volta verificata l'uniformità di peso delle cartine, ognuna di queste viene chiusa accuratamente per evitare eventuali perdite di contenuto e garantire una corretta somministrazione dell'intera dose.

Infine, le cartine monodose così ottenute vengono confezionate all'interno di una busta, di dimensioni idonee a contenerle. Trattandosi di una preparazione galenica a dosaggio personalizzato, sia ogni cartina, sia la busta esterna devono essere corredate di un'etichetta riportante tutte le informazioni per il corretto utilizzo, tra cui l'identificazione del paziente, il dosaggio, le modalità di somministrazione, le condizioni di conservazione e la data di scadenza.

In conformità a quanto previsto dalla Farmacopea Ufficiale vigente, alla preparazione viene attribuito un periodo di validità pari a sei mesi dalla data di allestimento.

In seguito, si riportano l'etichetta (Figura 4) e il foglio di lavoro (Figura 5).

RUXOLITINIB
(JAKAVI)
1 mg
Per 1 c. Tall XX
Prep. 148 Sc. 19.09.2025
FARMACIA IGG

FARMACIA IGG

Figura 4. Etichetta da apporre sul confezionamento primario e sul confezionamento secondario.

 SERVIZIO DI FARMACIA	FOGLIO DI LAVORO n.		Pagina 1 di 1
	JAKAVI (RUXOLITINIB) ____ MG CARTINE MONODOSE		
Approvato da	Responsabile di Settore		
OCCORRENTE: LOTTO -SCADENZA N° CPR DI JAKAVI DA MG 5 _____ EQUIVALENTI A _____ MG DI RUXOLITINIB N° _____ CARTINE N°CPR ELIMINATE _____ N° CARTINE CONSEGNATE _____			
PREPARAZIONE	NR _____ DEL _____ SCADENZA _____		
ALLESTITA DA			
VERIFICATA DA			
SCARICO	🏠 DIMISSIONE A DOMICILIO (SCARICO IN DIRETTA) 🏠 SCARICO AL REPARTO (SCARICO ANTIBLASTICI) SCARICARE N. _____ COMPRESSE DA _____ MG SCARICO N. _____ DEL _____		
Correzioni/Note			

Figura 5. Foglio di lavoro per l'allestimento di cartine

2.4 Allestimento galenico della sospensione orale di Jakavi®

Lo sviluppo della preparazione magistrale estemporanea è stato preceduto da un'accurata revisione della letteratura scientifica, al fine di individuare i dati bibliografici necessari per l'impostazione dello studio in oggetto.

Il protocollo di allestimento e la scelta del veicolo sospendente (SyrSpend® SF PH4) sono stati poi definiti prendendo come riferimento lo studio pubblicato su *The Scientific World Journal*, intitolato "Physicochemical Stability Study of Oral Suspension Containing Ruxolitinib in Children with Steroid-Refractory Acute Graft-Versus-Host Disease". Questo lavoro ha rappresentato il punto di partenza per impostare la preparazione della sospensione orale a base di ruxolitinib.

Nello studio citato è stata sviluppata e valutata una formulazione orale di ruxolitinib utilizzando il veicolo sospendente InOrpha®. Dopo aver analizzato la composizione qualitativa del veicolo impiegato dagli autori, è stato effettuato un confronto con le caratteristiche del SyrSpend® SF, individuato come possibile alternativa per l'allestimento della preparazione galenica. Sulla base di tale confronto, il protocollo descritto in letteratura è stato opportunamente adattato alle caratteristiche del SyrSpend® SF, mantenendo, ove possibile, gli stessi criteri formulativi e procedurali.

L'allestimento galenico della sospensione orale ottenuta a partire dalla specialità medicinale Jakavi® è stato eseguito presso la Farmacia Ospedaliera dell'Istituto Giannina Gaslini di Genova. Poiché il principio attivo utilizzato è classificato come antineoplastico, la preparazione è stata eseguita all'interno dell'Unità Farmaci Antiblastici (UFA), sotto cappa a flusso laminare verticale, nel rispetto delle procedure di sicurezza previste per la manipolazione di tali medicinali. L'allestimento della sospensione orale è stato condotto in conformità alle Norme di Buona Preparazione (NBP) della Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana XII edizione, attualmente in vigore.

Prima di procedere all'allestimento, è stata redatta la scheda di preparazione, documento nel quale sono riportate in modo dettagliato tutte le fasi operative, i calcoli da eseguire necessari per l'allestimento e i controlli da effettuare durante il processo.

Nella scheda di preparazione, sotto riportata, sono inoltre riportati i dispositivi di protezione individuale (DPI) obbligatori per la manipolazione del farmaco antiblastico:

- Guanti sterili antiblastici.
- Mascherina filtrante FFP2.
- Camice rinforzato per la manipolazione di farmaci antiblastici.

La scheda tecnica di preparazione prevede l'allestimento di una sospensione orale, con una concentrazione finale pari a 2mg/ml. Considerando quindi un volume totale di 50 ml la composizione quantitativa è la seguente:

- Ruxolitinib (Jakavi®) cpr 5 mg: 20 compresse, corrispondenti a un quantitativo totale di principio attivo pari a 100 mg
- Aroma lampone: due gocce
- SyrSpend® SF diluito al 90% con acqua depurata: quantità sufficiente (q.b.) per raggiungere un volume finale di 50 mL.



SERVIZIO DI FARMACIA

SCHEDA DI PREPARAZIONE

Pagina 1
di 64

RUXOLITINIB 2 MG/ML SOSPENSIONE ORALE

Responsabili di Settore:

OCCORRENTE:

- Ruxolitinib (Jakavi®) 5mg cpr
- Syrspend® SF
- Aroma lampone
- Acqua pura di tipo ii

DPI: guanti sterili antiblastici, mascherina ffp2, camice rinforzato per antiblastici
Da allestire sotto cappa a flusso laminare verticale in UFA

COMPOSIZIONE:

	100 ml
Ruxolitinib cpr	200mg
Aroma lampone	IV gtt
Syrspend® sf diluito al 90% in acqua	A 100 ml

PREPARAZIONE

Preparare una soluzione diluita al 90% di syrspend® sf liquido, miscelando in un cilindro 90ml di syrspend con 10 ml di acqua (per allestimento di sospensione q.b a 100ml).
Triturare le compresse di ruxolitinib nel mortaio fino a completa polverizzazione.
Bagnare la polvere con una piccola quantità di syrspend® sf e lavorare fino ad ottenere un composto viscoso, liscio ed uniforme.
Aggiungere geometricamente syrspend® sf, miscelando accuratamente dopo ogni aggiunta.
Aggiungere l'aroma al lampone.
Trasferire la sospensione in cilindro di idonea capacità.
Portare a volume con la soluzione di syrspend® sf al 90%.
Coprire il cilindro con il parafilm e miscelare per inversione fino ad omogeneità della sospensione.
Trasferire la sospensione in flacone in vetro ambrato di idonea capacità.

CONTROLLO QUALITÀ

OMOGENEITÀ
DELLA
SOSPENSIONE.

STABILITA'

DA VALUTARE IN SEGUITO AGLI STUDI.

ETICHETTA: BIANCA

Istituto Giannino Gaslini - U.O.C. Farmacia Direttore Dr.ssa Paola Barabino Via Gaslini 5, 16147 - Genova - Tel. 01056362257	
Pz/Rep	Allestito il <u>20/04/20</u>
RUXOLITINIB 2mg/ml SOSPENSIONE ORALE	
Ruxolitinib (Jakavi®)	100 mg
SyrSpend® SF diluito con acqua	q.b. a 50 ml
CONSERVARE A TEMPERATURA COMPRESA TRA +2 °C e +8 °C AGITARE BENE PRIMA DELL'USO	
Prep. n° _____	Scade il <u>20/04/20</u>

USO: TERAPIA OFF LABEL DELLA MALATTIA ACUTA DEL TRAPIANTO CONTRO L'OSPITE REFRATTARIA AGLI STEROIDI

NOTE:

[13] MELANIE HINTERLANG, MARIA SEBTL, CAMILLE COTTERET, FABRICE VIDAL, BÉNÉDICTE NEVEN, SALVATORE CISTERNINO, JOËL SCHLATTER, PHYSICOCHEMICAL STABILITY STUDY OF ORAL SUSPENSION CONTAINING RUXOLITINIB IN CHILDREN WITH STEROID-REFRACTORY ACUTE GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE, THE SCIENTIFIC WORLD JOURNAL, VOLUME 2022, 1-6.

Figura 6. Scheda di preparazione

Per quanto riguarda l'allestimento della sospensione, la prima fase del procedimento ha previsto la preparazione di una soluzione costituita da SyrSpend® SF liquido diluito al 90% con acqua depurata. Questa soluzione si ottiene miscelando accuratamente in un cilindro graduato, 40 mL di base pronta SyrSpend® SF liquido e 10 mL di acqua depurata, al fine di ottenere un volume finale di 50 mL.

In seguito, sono state utilizzate 20 compresse di Jakavi®, ciascuna avente un contenuto nominale di 5 mg di ruxolitinib, per un quantitativo totale di principio attivo pari a 100 mg. Le compresse sono state trasferite in un mortaio e triturate con un pestello fino ad arrivare alla completa polverizzazione delle compresse e ad una granulometria visivamente accettabile; la polvere ottenuta è stata quindi bagnata con una piccola aliquota di veicolo precedentemente diluito al 90%. Questa operazione è di fondamentale importanza al fine di ottenere una corretta dispersione del principio attivo e un composto viscoso, liscio, uniforme e privo di agglomerati, garantendo l'uniformità della sospensione finale.

La restante aliquota di SyrSpend® SF è stata incorporata secondo il metodo della diluizione geometrica, mediante aggiunte progressive e controllate per mantenere l'omogeneità del sistema, miscelando accuratamente dopo ogni aggiunta.

Al fine di migliorare la palatabilità della sospensione e quindi la compliance del paziente, sono state aggiunte due gocce di aroma al lampone.

Nel passaggio seguente la sospensione è stata trasferita in un cilindro graduato di capacità adeguata, nel caso specifico era da 50 mL. Successivamente, si è proseguito con il lavaggio del mortaio e del pestello con piccole aliquote della soluzione di SyrSpend® SF al 90%, trasferendo ogni volta il liquido di lavaggio nel cilindro. Tale operazione è stata effettuata più volte, in modo tale da ridurre al minimo la perdita di farmaco.

Una volta raggiunto il volume finale di 50 mL, sul cilindro è stato apposto il parafilm e la sospensione è stata miscelata manualmente per inversione per ottenere omogeneità della sospensione. Infine, la sospensione è stata trasferita in un flacone di vetro ambrato di idonea capacità, scelto per proteggere il principio attivo da eventuali fenomeni di degradazione dovuti all'esposizione alla luce.

Alla termine della preparazione del prodotto galenico, il farmacista responsabile è tenuto ad effettuare, i controlli di qualità previsti dalla Farmacopea Ufficiale. Tali verifiche devono essere eseguite, indipendentemente dalla tipologia e dalla quantità del preparato, da un operatore diverso da quello che ha eseguito l'allestimento della sospensione orale [12].

I controlli da effettuare sul prodotto finito sono i seguenti:

- Verifica della corretta esecuzione delle procedure eseguite di preparazione.
- Controllo dell'aspetto del preparato.
- Controllo dell'integrità del confezionamento e della sua tenuta.
- Verifica della corretta compilazione dell'etichetta e delle modalità di conservazione [12].

Dal momento che, si tratta di una preparazione galenica personalizzata è necessario predisporre un'etichetta bianca, da apporre sul confezionamento primario, riportante tutte le informazioni previste dalla normativa vigente:

Pz/Rep

Allestito il __.__.____

RUXOLITINIB 2mg/ml

SOSPENSIONE ORALE

Ruxolitinib (Jakavi®)	100 mg
Aroma lampone	II gtt
SyrSpend® SF diluito in acqua p	q.b. a 50 ml

CONSERVARE A TEMPERATURA COMPRESA TRA +2 °C e +8 °C

AGITARE BENE PRIMA DELL'USO

Prep. n° _____

Scade il __.__.____

Figura 7. Etichetta da apporre sul confezionamento primario della sospensione orale di ruxolitinib

Il confezionamento primario deve essere selezionato tra le diverse tipologie previste dalla Farmacopea vigente, deve essere certificato dal fabbricante, deve essere idoneo alle caratteristiche del preparato e deve garantire la qualità della preparazione per tutto il suo periodo di validità.

Inoltre, se necessario, il confezionamento primario dovrebbe avere una chiusura a prova di bambino, ma allo stesso tempo deve essere utilizzabile con facilità, in modo tale da assicurare un corretto prelievo del medicinale.

Prima di iniziare la preparazione contenente ruxolitinib, si procede alla compilazione del foglio di lavoro, documento obbligatorio per l'allestimento di preparati magistrali e officinali, per garantire la tracciabilità delle operazioni eseguite e la conformità alle Norme di Buona Preparazione (NBP).

Il suddetto documento deve riportare:

- Data di preparazione
- N° di richiesta
- Quantità allestita
- Composizione quali-quantitativa completa
- Numero di riferimento interno
- Riferimento delle procedure operative
- Data limite di utilizzazione
- Contenitore utilizzato
- Copia dell'etichetta
- Nome e firma del preparatore
- Numero di lotto
- Verifiche effettuate [13]

Nel seguito si riporta un esempio del foglio di lavoro.

 Istituto Giannina Gaslini U.O.C. Farmacia Responsabile Dott.ssa P. Barabino	<u>FOGLIO DI LAVORO</u> RUXOLITINIB 2MG/ML SOSPENSIONE ORALE												
Responsabile di Settore:													
RICHIESTA N° ☐ FARMACIA													
QUANTITA' ALLESTITA: n° flaconi da Ml													
OCCORRENTE: - RUXOLITINIB (JAKAVI®) 5 MG CPR EQUIVALENTI AD RUXOLITINIB - AROMA LAMPONE - SYRSPEND® SF AL 90% SOL.NE ACQUOSA:	QUANTITA' _____ _____ MG _____ GTT _____ ML	LOTTO - SCADENZA: _____ _____ _____ _____	VERIFICA: Đ Đ Đ Đ										
SYRSPEND® SF AL 90% SOL.NE ACQUOSA: - SYRSPEND® SF - ACQUA PURA DI TIPO 2 FU Q.B.	QUANTITA': _____ ML _____ ML	LOTTO-SCADENZA: _____ _____	Đ Đ										
COMPOSIZIONE: <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 5px;"> <tr> <td style="width: 60%;">50 ml</td> <td style="width: 40%;"></td> </tr> <tr> <td>Ruxolitinib (jakavi®) cpr 5 mg</td> <td>20 cpr</td> </tr> <tr> <td>Pari a</td> <td>100 mg</td> </tr> <tr> <td>Aroma lampone</td> <td>Il gtt</td> </tr> <tr> <td>Syrspend® sf al 90% sol.ne acquosa</td> <td>q.b. a 50 ml</td> </tr> </table>				50 ml		Ruxolitinib (jakavi®) cpr 5 mg	20 cpr	Pari a	100 mg	Aroma lampone	Il gtt	Syrspend® sf al 90% sol.ne acquosa	q.b. a 50 ml
50 ml													
Ruxolitinib (jakavi®) cpr 5 mg	20 cpr												
Pari a	100 mg												
Aroma lampone	Il gtt												
Syrspend® sf al 90% sol.ne acquosa	q.b. a 50 ml												
PREPARAZIONE N° _____ DEL _____ SCADE IL _____													
ALLESTITA DA													
VERIFICATA DA													
IL FARMACISTA													
CONTROLLO DI QUALITÀ													
CORREZIONI/NOTE													

Figura 8. Foglio di lavoro

Poiché non erano disponibili studi di stabilità relativi al principio attivo ruxolitinib disperso nel veicolo SyrSpend® SF, si è ritenuto necessario sottoporre la formulazione a un approfondito studio di stabilità, al fine di valutarne le caratteristiche chimico-fisiche e di garantirne la qualità, la sicurezza e l'efficacia durante il periodo di conservazione previsto. Le modalità di esecuzione e i risultati dello studio sono stati illustrati nel paragrafo successivo.

2.5 Studi di stabilità

2.5.1 Prime considerazioni sugli studi condotti

Gli studi di stabilità sono stati condotti presso il Laboratorio di Tecnologia del DIFAR sede S. Martino di cui è responsabile la Prof.ssa Eleonora Russo. Una volta allestita la sospensione orale di ruxolitinib, sono state svolte delle prove per studiare la stabilità nel tempo del principio attivo e della forma farmaceutica utilizzata. Gli studi di stabilità sono stati condotti sia sul farmaco puro, ovvero lo standard di riferimento, sia sulla preparazione galenica allestita all'istituto G. Gaslini. Rispetto al campione di sospensione orale, lo standard contiene solo il principio attivo puro sciolto nella fase mobile utilizzata nella HPLC, quindi nel nostro caso, in acetonitrile e acqua.

La preparazione galenica allestita è stata successivamente divisa in due aliquote, che sono state conservate in due condizioni di temperatura controllate diverse:

- Temperatura ambiente: 22-25°C.
- Temperatura frigorifero: 6-8°C.

Le misurazioni sono state eseguite in duplicato e la stabilità del principio attivo è stata monitorata in diversi intervalli di tempo: 24h, 48h, 7 giorni, 14 giorni, 21 giorni, 30 giorni e 60 giorni.

Questi studi sono stati condotti utilizzando come strumento analitico l'HPLC (High Performance Liquid Chromatography), assicurando una valutazione adeguata e precisa dei parametri chimico-fisici del principio attivo e della sua formulazione.

Durante lo studio, ogni cromatogramma è stato controllato a tutte le lunghezze d'onda per rilevare l'eventuale presenza di prodotti di degradazione. Le preparazioni sono state considerate stabili se le caratteristiche fisiche sono rimaste invariate e se la concentrazione del farmaco si è mantenuta superiore al 95% della concentrazione iniziale.

2.5.2 HPLC

Le prime versioni di HPLC sono state introdotte tra il 1959 e il 1964, nello specifico, questa tecnologia analitica viene utilizzata per identificare i componenti di una miscela, sfruttando le diverse affinità degli analiti nei confronti di una fase mobile e di una fase stazionaria.

La sua popolarità è soprattutto associata alla sua grande versatilità; infatti, l'HPLC ha la capacità di riuscire a separare e ad analizzare qualsiasi campione che può essere disciolto, nonché di risolvere numerosi problemi. Successivamente, attraverso continui metodi di ottimizzazione, si è arrivati fino ad oggi, in cui la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) è una tecnica analitica di fondamentale importanza molto utilizzata nel campo delle analisi quantitative dei principi attivi contenuti nelle forme farmaceutiche.

Prima della metà degli anni Sessanta, riuscire ad ottenere separazioni in tempi ragionevoli rappresentava un limite tecnologico notevole ed è per tale ragione, che l'introduzione di una nuova metodologia analitica riesce a prendere popolarità e grande utilizzo quasi fin da subito.

Tuttavia, prima di poter arrivare all'utilizzo odierno, è prima dovuta avvenire una notevole evoluzione, anche perché spesso inizialmente le prime apparecchiature erano imprecise e in particolare, i rivelatori utilizzati prima del 1975 risultavano essere l'anello debole del sistema HPLC [14].

Successivamente, l'introduzione sul mercato di rivelatori a lunghezza d'onda fissa e variabile ha segnato un cospicuo cambiamento, ma la necessità di ottenere delle rilevazioni sempre più selettive e sensibili porterà alla creazione di rivelatori più precisi come per esempio: i rivelatori a serie di diodi, elettrochimici a fluorescenza e a spettroscopia di massa.

In aggiunta, anche i sistemi di pompaggio subiranno un notevole miglioramento dopo il 1970, infine, la massima evoluzione avviene con l'introduzione di apparecchiature sempre più innovative, controllate da computer e integrate a sistemi di gestione dei dati, i quali hanno fornito una qualità migliore dei dati finali, oltre a una maggiore automazione. Nel panorama odierno l'HPLC è una tecnica determinante per la ricerca e sviluppo in ambito farmaceutico, per la caratterizzazione dei metaboliti oppure per identificare impurezze e prodotti di degradazione generati dall'invecchiamento accelerato.

2.5.3 Componenti dello strumento

I componenti dell'HPLC sono:

- Fase mobile contenuta all'interno dei contenitori per i solventi
- Degasatore
- Sistema di pompe
- Iniettore
- Colonna cromatografica con fase stazionaria
- Rivelatore
- Software HPLC per elaborazione dei dati

Il punto di partenza dell'architettura dell'HPLC sono i contenitori posti sulla sommità dello strumento, che contengono i solventi che andranno a costituire la fase mobile. Quest'ultima andrà ad attraversare il degasatore e il sistema di pompe. Questo passaggio è fondamentale perché altrimenti si assisterebbe alla formazione di bolle d'aria; la loro mancata rimozione, infatti, potrebbe alterare il flusso, generando problemi nella lettura del cromatogramma [15].

Successivamente, l'eluente raggiunge il sistema di pompaggio che serve fondamentalmente per controllare il flusso e per consentire una corretta eluizione dei solventi. Questa può essere di due tipi: isocratica, ovvero la fase mobile è costituita da un solvente o una miscela di solventi a composizione costante, oppure l'eluizione può essere fatta secondo gradiente, ciò significa che la miscela è composta da almeno 2 solventi, le cui concentrazioni variano durante la separazione.

In seguito a tale passaggio, si può procedere con l'iniezione del campione, che viene introdotto tramite una siringa collegata ad una valvola di iniezione, la quale presenta due opzioni: carica (load) e inietta (inject). Durante l'iniezione del campione la valvola dovrà essere posizionata su carica e, una volta completato l'inserimento di tutto il contenuto, con la siringa ancora inserita nell'iniettore, si ruota la valvola nella posizione di inietta, in modo tale che il campione possa entrare nel circuito e arrivi alla colonna.

In Figura 9 viene illustrata la fase di caricamento del campione, eseguita durante l'attività di tesi sperimentale presso il laboratorio di Tecnologia del Dipartimento di Farmacia (DIFAR).



Figura 9. Caricamento del campione.

La colonna cromatografica è costituita da un tubo di acciaio inossidabile, anche se in caso di pressioni di lavoro inferiori a 600 psi, possono essere utilizzate colonne di vetro. L'impaccamento più comune è dato dal gel di silice, ma esistono anche altri possibili materiali di impaccamento come ad esempio: l'allumina, i polimeri porosi e le resine a scambio ionico.

La cromatografia può essere condotta in fase normale o in fase inversa ed è quest'ultimo caso quello che abbiamo utilizzato nel laboratorio di Tecnologia; quindi, significa che la fase stazionaria è più apolare rispetto alla fase mobile.

La colonna a fase inversa più utilizzata è la C18, chiamata così perché le particelle impaccate di gel di silice presentano in superficie un gruppo idrocarburico costituito da 18 atomi di carbonio. In questo caso gli eluenti utilizzati sono miscele acquose di solventi organici come ad esempio acetonitrile, eluente utilizzato nel nostro specifico caso.

Arrivati a questo punto, la colonna è collegata a un rivelatore, che ha la funzione di produrre un segnale misurabile corrispondente alla concentrazione.

Ad oggi uno dei rivelatori più utilizzati è quello di assorbanza Uv-visibile, questo perché un buon numero di composti assorbono nella regione UV visibile, cioè da 190 nm a 600 nm.

La concentrazione del campione, espressa come assorbanza è determinata dalla legge di Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon l C$$

- A è l'assorbanza (adimensionale)
- ε coefficiente di assorbimento ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)
- l è il cammino ottico (cm)
- C= molarità della soluzione (mol/L)

Esistono diversi tipi di rivelatori UV:

- Rivelatori a lunghezza d'onda fissa.
- Rivelatori a lunghezza d'onda variabile.
- Rivelatori a serie di diodi (DAD).

Il primo tipo di rivelatore si basa su lunghezze d'onda specifiche, mentre gli ultimi due citati in precedenza si focalizzano sull'utilizzo di una o più lunghezze d'onda generate da un ampio spettro. I rivelatori a lunghezza d'onda variabile possono essere sintonizzati per operare al massimo di assorbanza di un analita e possono essere programmati per cambiare la lunghezza durante una corsa cromatografica [15].

L'ultimo rivelatore citato nell'elenco, ovvero quello a matrice di diodi, consiste in un rivelatore con un cammino ottico simile a quelli dell'UV-VIS, con la possibilità di inviare simultaneamente nella cella di lettura fasi di radiazione luminosa a diverse lunghezze d'onda. In questo caso, la luce passa attraverso la cella di flusso prima di colpire il reticolo, consentendole di diffondere lo spettro su una matrice di diodi. Si tratta di un rivelatore non distruttivo e che si basa sull'assorbimento della luce UV da parte dell'analita.

Infine, il sistema di raccolta dei dati consiste in un computer che supporta un apposito programma, nel nostro caso specifico si chiama HP ChemStation (Figura 10), il quale prevede di acquisire i segnali e permette di raccogliere i dati ottenuti che saranno analizzati in seguito. Utilizzando un computer è possibile gestire tutte le operazioni cromatografiche, con il vantaggio di poter intervenire anche sulle operazioni a posteriore per modificarle.

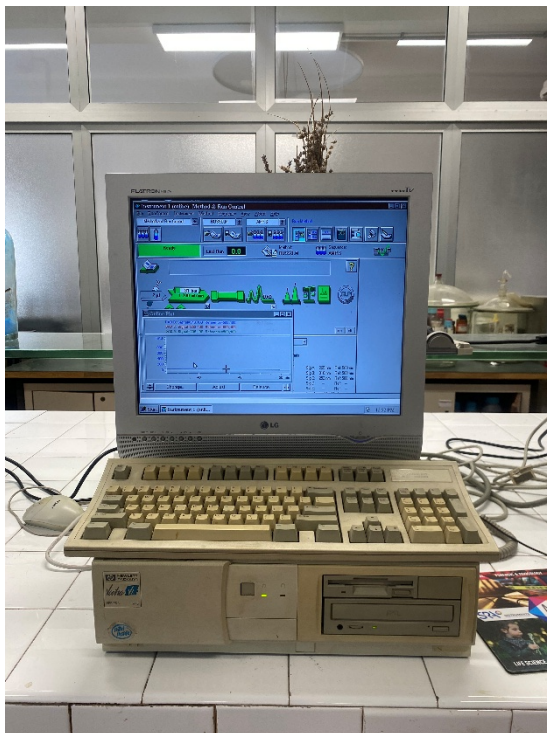


Figura 10. Fotografia dello schermo PC del software utilizzato presso il laboratorio di Tecnologia DIFAR

2.5.4 Trattamento del campione

Il contenuto di ruxolitinib è stato determinato utilizzando il metodo di cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC). Il trattamento dei campioni analitici, conservati a temperatura ambiente, che precede ciascuna determinazione cromatografica, è stato eseguito con le seguenti modalità:

1. **Preparazione standard:** è stato preparato lo standard puro di riferimento contenente 3.2 mg di ruxolitinib polvere puro, ovvero senza eccipienti, disciolto in 20 mL di fase mobile il tutto contenuto in un matraccio da 20 mL al fine di ottenere una soluzione di riferimento con una concentrazione finale di 160 μL /mL.
2. **Campionamento dell'aliquota:** aspirazione di un'aliquota di 300 μL della sospensione orale mantenuta a temperatura ambiente tramite una micropipetta adatta per i composti ad alta viscosità.
3. **Aggiunta di fase mobile:** dopo aver depositato la precedente aliquota aspirata sul fondo della provetta, sono stati addizionati 2.7 mL di fase mobile costituita da acetonitrile e acqua (40:60 v/v), posizionata sulle pareti della provetta contenete la sospensione aspirata in precedenza. Si è ottenuta una provetta contenente 100 μL /mL, perché è stata effettuata una diluizione 1:10.
4. **Agitazione con vortex e precipitazione:** si è sottoposta la miscela ad agitazione meccanica tramite il Vortex; questo passaggio permette di far precipitare sul fondo della provetta gli eccipienti della compressa.

5. **Prelievo della fase liquida:** un'aliquota di contenuto viene aspirato con una siringa monouso con ago.
6. **Filtrazione:** allontanamento dell'ago dalla siringa e successivo posizionamento di un filtro a membrana da 0.2 μm all'estremità della siringa e si è proceduto lentamente e con cura fino a completa filtrazione.
7. **Sigillatura del campione:** la provetta contenente la soluzione appena filtrata viene coperta con il parafilm.

La suddetta procedura è stata poi ripetuta una seconda volta, ma con l'aliquota conservata nel frigorifero.

Una volta che i due campioni sono risultati pronti, si è proceduto con la prima iniezione della soluzione standard, assicurandosi tuttavia che lo strumento abbia raggiunto la pressione adeguata, che nel nostro caso specifico si trattava di una pressione di 195 bar.

Lo standard puro è stato poi ricoperto con alluminio e conservato alla temperatura di 6-8°C ed è stato iniettato per ogni tempo di analisi, prima di procedere con l'analisi dei campioni, di cui sopra. Tra un'iniezione e l'altra la siringa utilizzata per iniettare è stata opportunamente lavata, ovvero ripulita dalle eventuali impurità, con la fase mobile.

Gli studi di stabilità sono stati condotti a intervalli di tempo, dal giorno dell'allestimento (giorno 0) fino ad arrivare al sessantesimo giorno, come segue:

- **1° ANALISI:** Sospensione al tempo 0: analisi dello standard puro e della sospensione a temperatura ambiente.
- **2° ANALISI:** Sospensione RUX24 (tempo 24 ore), analisi dei campioni conservati a temperatura ambiente e a temperatura da frigo.
- **3° ANALISI:** Sospensione RUX48 (tempo 48 ore), analisi dei campioni conservati a temperatura ambiente e a temperatura da frigo.
- **4° ANALISI:** Sospensione RUX7 (tempo 7 giorni), analisi dei campioni conservati a temperatura ambiente e a temperatura da frigo.
- **5° ANALISI:** SOSPENSIONE RUX14 (tempo 14 giorni), analisi dei campioni conservati a temperatura ambiente e a temperatura da frigo.
- **6° ANALISI:** sospensione RUX 21 (tempo 21 giorni), analisi dei campioni conservati a temperatura ambiente e a temperatura da frigo.
- **7° ANALISI:** sospensione RUX30 (tempo 30 giorni), analisi dei campioni conservati a temperatura ambiente e a temperatura da frigo.
- **8° ANALISI:** sospensione RUX60 (tempo 60 giorni), analisi dei campioni conservati a temperatura ambiente e a temperatura da frigo.

I parametri analitici esaminati nello studio sono stati: il tempo di ritenzione (min), l'area sottesa al picco e la concentrazione di ruxolitinib (mg/mL).

2.5.5 Dosaggio quantitativo HPLC

Le analisi cromatografiche sono state eseguite attraverso analisi HPLC, utilizzando un sistema Hewlett-Packard HP1100 (Palo Alto, CA, USA) costituito da una pompa quaternaria, degasatore a vuoto continuo, dotato di iniettore manuale Rheodyne 7125 e rilevatore a diodi array UV-vis Hewlett-Packard (DAD).

Per l'acquisizione e la gestione dei dati è stato utilizzato il sistema HP ChemStation. Le separazioni cromatografiche sono state effettuate utilizzando una colonna di LiChroCART Purospher Star RP18-e (250mm x 4.6 mm di diametro interno) (5 µm) (Merck, Dramstadt, Germania), combinata con una colonna di protezione Merck LiChroCart 4-4 LiChrospher 100 RP18 (5 µm). L'eluizione è stata condotta isocraticamente con una fase mobile costituita da 40% di acetonitrile e 60% di acqua, ad un flusso di 1.8 mL/min e un volume di iniezione di 20 µL.

La rilevazione e l'acquisizione cromatografica sono state effettuate a $\lambda = 295$ nm, mentre gli spettri dei picchi sono stati registrati impostando il rilevatore a diodi array (DAD) nel range 190-500 nm. I parametri misurati sono stati il tempo di ritenzione, ovvero il tempo che impiega una sostanza per essere eluita, e l'area della curva del picco cromatografico, cioè l'area sottesa alla curva che è proporzionale alla quantità di sostanza eluita. In tali condizioni sperimentali la pressione in colonna è stata mantenuta in media a 195 bar. La miscela di acetonitrile e acqua (40:60 v/v) è stata identificata come la migliore fase mobile per gli scopi dello studio.

Dopo ogni analisi la colonna con gel di silice C18 è stata lavata con una miscela di acqua e acetonitrile sempre (60:40 v/v) per 10 minuti a un flusso di 1.8 mL/min, mentre la temperatura della colonna era sempre di 25°C.

2.5.6 Stabilità 6°C e 25°C

Riassumendo, lo studio di stabilità valutato la sospensione orale allestita presso l'istituto G. Gaslini di Genova, con l'obiettivo di individuare anche le condizioni di conservazione ottimali della preparazione.

La stabilità della sospensione, come già detto nei precedenti paragrafi, è stata studiata a due diverse condizioni di temperatura: conservazione in frigorifero (6-8°C) e lo stoccaggio a temperatura ambiente (25°C). Il lavoro ha previsto la valutazione del farmaco tramite lo studio con HPLC, precedentemente descritto, mantenendo i campioni alle due diverse temperature di conservazione, con lo scopo di testare l'eventuale presenza di prodotti di degradazione o di variazioni significative di concentrazione nel tempo.

Per lo studio è stata presa in considerazione anche la soluzione standard, che è stata analizzata all'inizio di tutte le analisi cromatografiche. I campioni, sia a temperatura ambiente che a temperatura refrigerata, sono stati analizzati seguendo il progetto di stabilità progettato a partire dal giorno dell'allestimento fino a un periodo di 2 mesi dalla preparazione.

2.5.7 Analisi DAD

Il rivelatore a serie di diodi (DAD, Diode Array Detector) è uno strumento analitico altamente adoperato nella cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) e in tale panorama si posiziona come un apparecchio di fondamentale importanza, che rappresenta tutt'oggi una modalità innovativa di rilievo rispetto ai tradizionali rivelatori UV-VIS, che controllano l'eluato a una o poche lunghezze d'onda.

Sebbene inizialmente i DAD non risultassero essere altamente sensibili quanto i rivelatori UV-Vis a singola lunghezza d'onda, questa divergenza è stata colmata rapidamente grazie alle innovative modalità tecnologiche che ne hanno permesso un repentino sviluppo. Si tratta di uno strumento analitico molto utilizzato per misurare l'assorbanza lungo l'intervallo di lunghezze d'onda del campo UV-Vis. Questo rivelatore consente di acquisire in simultanea dei segnali di assorbanza lungo tutto lo spettro del visibile, fornendo una buona e alta quantità di informazioni analitiche [15].

Tutti i DAD funzionano secondo gli stessi principi generali e presentano un cammino ottico simile a quello dei rivelatori a lunghezza d'onda variabile, con la differenza che la luce passa attraverso la cella di flusso prima di colpire il reticolo di diffrazione e questo permette di separare lo spettro su una serie di fotodiodi [16].

Nello specifico, la sorgente genera una luce policromatica, che viene diretta verso una cella di flusso in cui scorre l'eluato e le molecole dell'analita all'interno assorbono selettivamente le lunghezze d'onda specifiche della loro struttura chimica. La radiazione trasmessa colpisce

successivamente un reticolo di diffrazione, il quale scompone la luce policromatica nelle diverse lunghezze d'onda ed infine, queste ultime vengono indirizzate su una serie di diodi fotosensibili. Dopodiché, il segnale viene elaborato dal software, che permette di ottenere dati cromatografici in tridimensionale, che sono: assorbanza, lunghezza d'onda e tempo di ritenzione.

Tra i vantaggi del DAD troviamo la capacità di monitorare l'omogeneità e la purezza dei picchi di eluizione, di fondamentale utilità durante lo sviluppo del metodo.

L'apparecchio, inoltre, può fungere anche come rivelatore UV-VIS multi-lunghezza d'onda, registrando uno spettro completo ed esaustivo. Inoltre, gli spettri raccolti possono essere utilizzati per creare una libreria che, a sua volta, può essere impiegata per confrontare gli spettri successivi a scopo di identificazione, inoltre, le bande spettrali raccolte lungo tutto il picco in corrispondenza di ciascun punto possono essere confrontate per valutare l'omogeneità e la purezza del picco stesso.

In sintesi, il rivelatore a serie di diodi si posiziona come uno strumento dotato di elevata precisione e versatilità nello scenario della cromatografia liquida ad alta prestazione. Proprio per tali ragioni, lo strumento HPLC-DAD è stato scelto per sviluppare il presente progetto della tesi al fine di analizzare il profilo di stabilità della sospensione orale contenente, come principio attivo, ruxolitinib.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 *Fotografie dei campioni preparati in laboratorio*

In questo sottocapitolo, viene illustrata la caratterizzazione visiva, documentata attraverso immagini (Figura 11 e Figura 12) mostrate in seguito nel dettaglio, dei campioni di sospensione orale contenente ruxolitinib, presi in esame prima della loro iniezione nella colonna cromatografica.

L'inclusione di questa analisi permette di effettuare un paragone preliminare per rispondere alle necessità di fornire una valutazione visiva immediata, fondamentale per valutare lo stato fisico della sospensione orale in termini di omogeneità, variazioni cromatiche o formazione di aggregati.

Nello specifico, la Figura 11 mostra il campione di sospensione orale conservato a temperatura ambiente fino al sessantesimo e ultimo giorno di analisi.

La Figura 12, invece, mostra la medesima formulazione conservata, però, alla temperatura di refrigerazione, anch'essa campionata al sessantesimo giorno di analisi.

In entrambe le immagini si nota una separazione netta di fase che dopo semplice agitazione tramite *vortex*: ritorna come sospensione omogenea, questo indica che nei 60 gg non si presentano fenomeni di separazione di fase irreversibile.

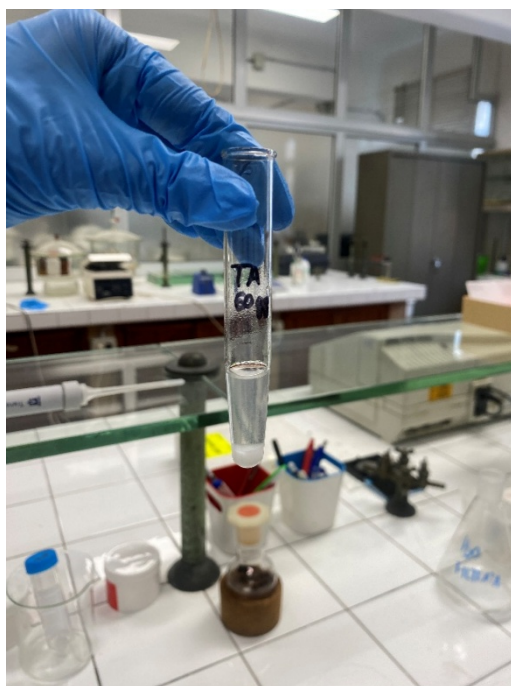


Figura 11. Campione di sospensione orale conservato a temperatura ambiente (Ta) dopo 60 gg.



Figura 12. Campione di soluzione orale conservato a temperatura di refrigerazione (Tf) dopo 60 gg.

3.2 Analisi cromatografica HPLC-DAD

L'analisi cromatografica mediante HPLC-DAD è stata impiegata per valutare la stabilità della sospensione orale di ruxolitinib durante il periodo di conservazione. I cromatogrammi ottenuti hanno consentito di verificare la corretta identificazione del principio attivo, la costanza del tempo di ritenzione nel tempo e l'eventuale comparsa di prodotti di degradazione nelle diverse condizioni di conservazione.

Il cromatogramma dello standard di ruxolitinib ha evidenziato la presenza di un unico picco cromatografico ben definito, caratterizzato da un tempo di ritenzione medio pari a 2.98 ± 0.06 minuti, in accordo con quanto riportato nella Tabella 5.

Il profilo cromatografico risulta simmetrico e privo di interferenze significative, confermando l'idoneità del metodo analitico per l'identificazione del principio attivo.

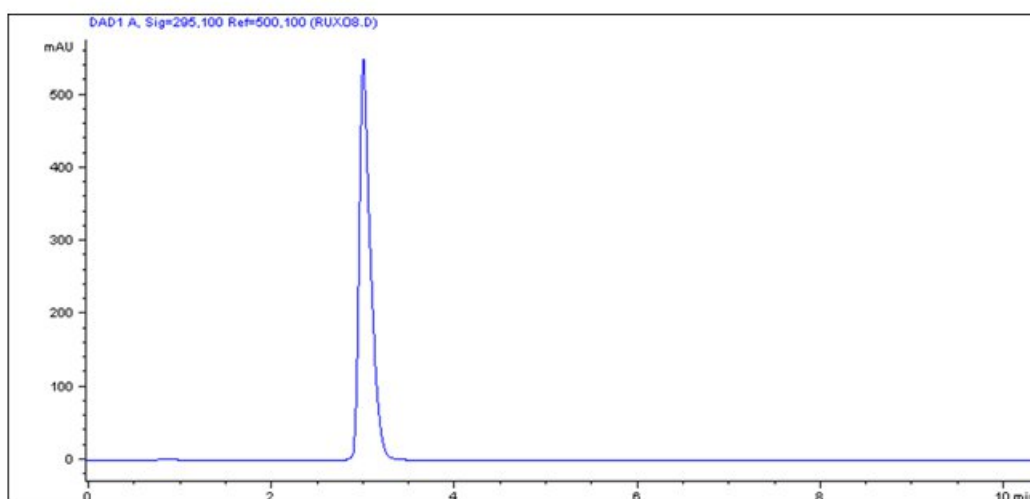


Figura 13. Cromatogramma HPLC-DAD dello standard puro di ruxolitinib.

La sovrapposizione del cromatogramma dello standard con quello della sospensione orale a T0 ha mostrato una completa corrispondenza del principale picco cromatografico. L'assenza di spostamenti del tempo di ritenzione conferma che il principio attivo presente nella sospensione corrisponde al ruxolitinib e che il processo di allestimento galenico non ha modificato le caratteristiche cromatografiche della molecola. Inoltre, non sono stati osservati picchi significativi che possono essere ricondotti a prodotti di degradazione, alcuni picchi di entità trascurabile sono presenti all'inizio del cromatogramma e sono dovuti agli eccipienti presenti nella formulazione.

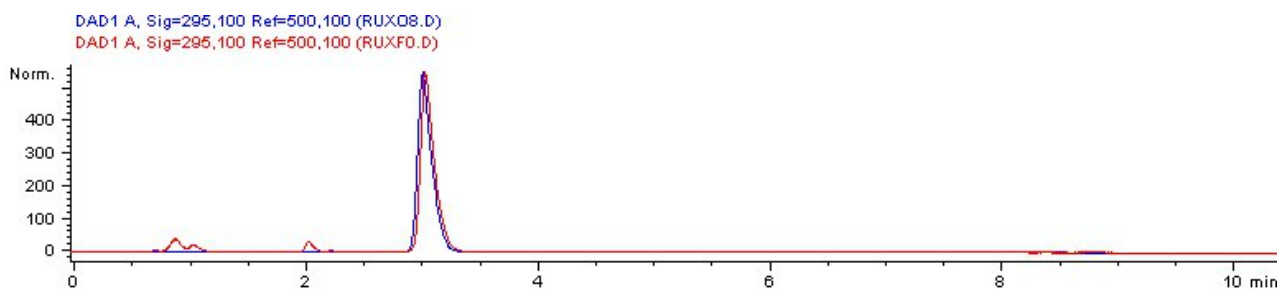


Figura 14. Sovrapposizione dei cromatogrammi dello standard puro e del campione di sospensione orale contenente ruxolitinib a T0.

La sovrapposizione dei cromatogrammi ottenuti dai campioni conservati a temperatura ambiente (20–25 °C) mostra il mantenimento del principale picco cromatografico del ruxolitinib durante l'intero periodo di osservazione. Sebbene si osservi una progressiva riduzione dell'intensità del segnale, attribuibile alla diminuzione della concentrazione del principio attivo nel tempo, il tempo di ritenzione rimane sostanzialmente costante e non si evidenzia la comparsa di nuovi picchi riconducibili a fenomeni di degradazione.

Tali risultati indicano che il processo degradativo interessa prevalentemente la quantità di principio attivo piuttosto che la formazione di specie secondarie cromatograficamente rilevabili.

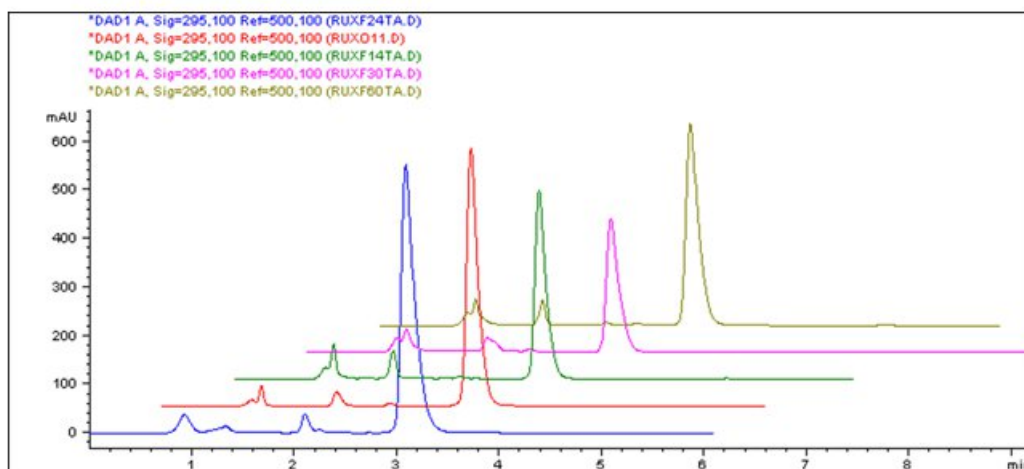


Figura 15. Sovrapposizione dei cromatogrammi dei campioni conservati a temperatura ambiente a 24 ore, 7, 14, 30 e 60 giorni.

Anche i campioni conservati a temperatura refrigerata (6–8 °C) hanno evidenziato un comportamento analogo. Il picco del ruxolitinib mantiene un tempo di ritenzione sovrapponibile a quello dello standard durante tutto il periodo di studio. Analogamente a quanto osservato nei campioni conservati a temperatura ambiente, non si rilevano nuovi picchi cromatografici indicativi della formazione di prodotti di degradazione. La conservazione in frigorifero appare tuttavia associata ad una migliore conservazione del contenuto di principio attivo, come evidenziato dai dati quantitativi riportati nella Tabella 5.

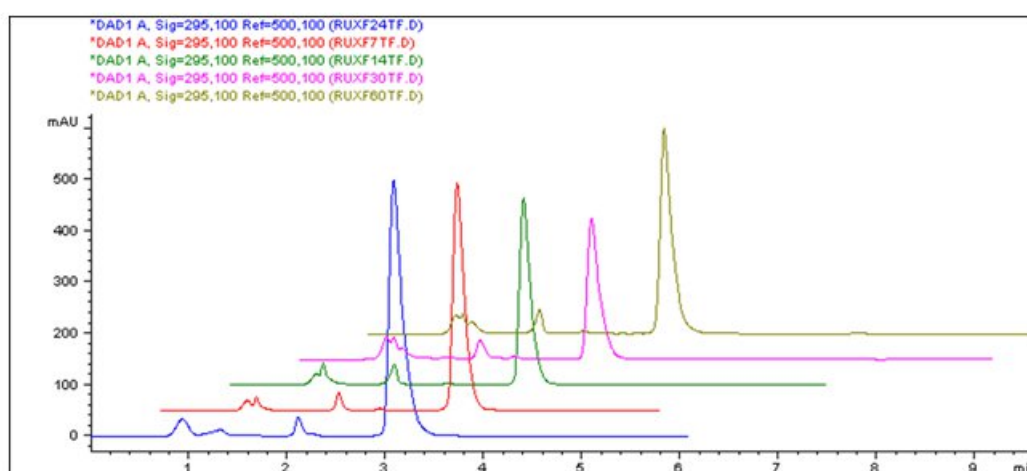


Figura 16. Sovrapposizione dei cromatogrammi dei campioni conservati a temperatura refrigerata a 24 ore, 7, 14, 30 e 60 giorni.

Il confronto tra i cromatogrammi ottenuti dopo 60 giorni di conservazione a temperatura ambiente e a temperatura refrigerata evidenzia una sostanziale sovrapponibilità del profilo cromatografico. In entrambe le condizioni il principale picco del ruxolitinib risulta chiaramente identificabile, senza comparsa di ulteriori segnali cromatografici attribuibili a prodotti di degradazione. Le differenze osservate riguardano prevalentemente l'area del picco, coerentemente con la diversa concentrazione residua del principio attivo determinata mediante analisi quantitativa.

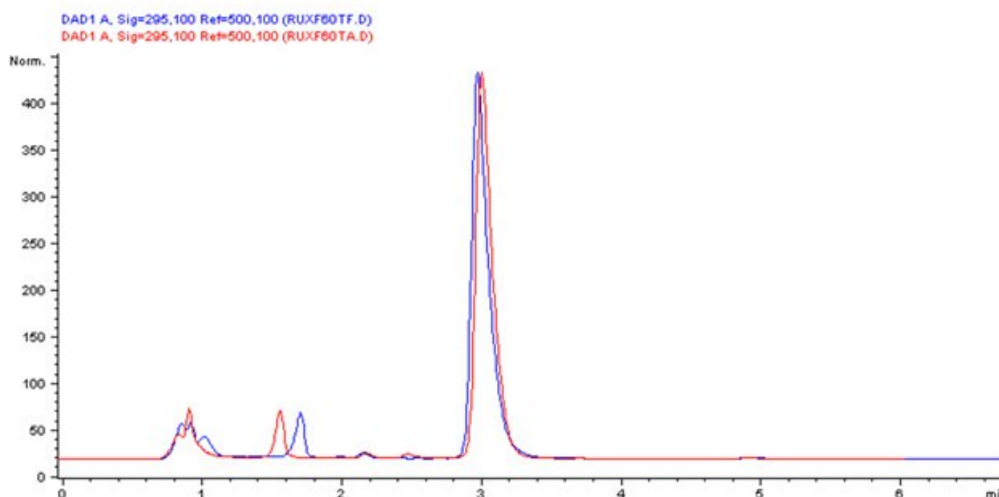


Figura 17. Confronto cromatografico tra i campioni conservati per 60 giorni a temperatura ambiente e a temperatura refrigerata.

L'analisi mediante rivelatore DAD ha consentito di acquisire lo spettro UV associato al picco cromatografico del ruxolitinib. Lo spettro ottenuto risulta costante nei diversi campioni analizzati e perfettamente sovrapponibile a quello dello standard di riferimento, confermando l'identità del principio attivo durante tutto il periodo di conservazione. La costanza dello spettro UV rappresenta un ulteriore elemento a supporto dell'assenza di modificazioni strutturali significative della molecola e conferma la selettività del metodo analitico impiegato.

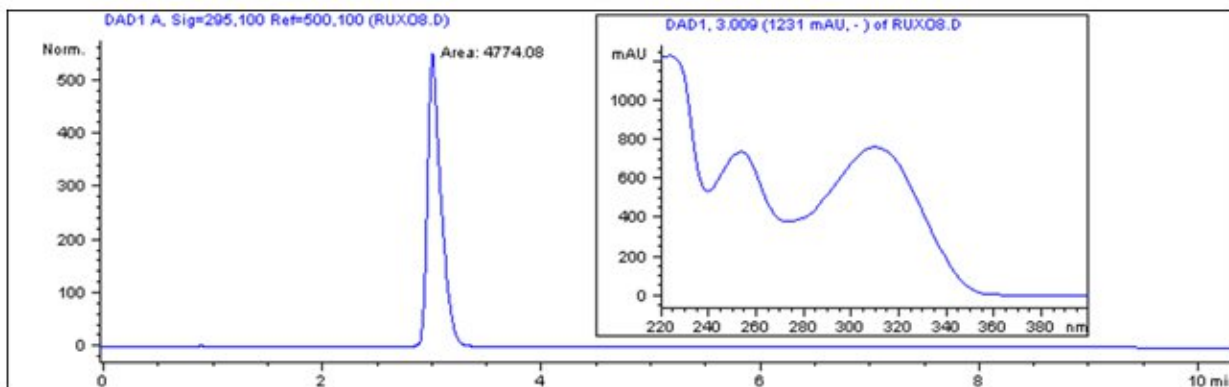


Figura 18. Cromatogramma HPLC-DAD dello standard di ruxolitinib. Sono riportati il principale picco cromatografico, il relativo valore dell'area e lo spettro di assorbimento UV, utilizzati per confermare l'identità del principio attivo e la selettività del metodo analitico.

Nel complesso, i risultati ottenuti mostrano che il tempo di ritenzione del ruxolitinib rimane sostanzialmente costante durante tutto il periodo di osservazione (2.92–3.05 min), confermando la stabilità cromatografica del principio attivo. Le variazioni dell'area del picco risultano coerenti con la progressiva riduzione della concentrazione del farmaco nel tempo, mentre l'assenza di nuovi picchi e la costanza dello spettro UV suggeriscono che il processo di degradazione non comporti la formazione di prodotti secondari rilevabili nelle condizioni cromatografiche adottate.

3.3 Analisi quantitativa mediante HPLC

I dati riportati nella Tabella 5 rappresentano i risultati ottenuti dall'analisi quantitativa della sospensione orale di ruxolitinib mediante HPLC-DAD. Per ciascun tempo di campionamento, i campioni conservati a temperatura ambiente (20–25 °C) e a temperatura refrigerata (6–8 °C) sono stati analizzati in duplicato e i valori riportati in Tabella 5 rappresentano la media delle due determinazioni. Per ciascun campione sono stati determinati il tempo di ritenzione, l'area del picco cromatografico e la concentrazione del principio attivo, calcolata mediante confronto con lo standard di riferimento.

Tabella 5. Risultati dell'analisi cromatografica HPLC-DAD dello standard di ruxolitinib e dei campioni della sospensione orale durante lo studio di stabilità.

Nome Campione	Tempo	Condizione TA (20–25 °C) TF (6–8 °C)	Tempo di ritenzione (min)	Area HPLC	Concentrazione Ruxolitinib (mg/mL)
STD puro	-	TF	2.977± 0.060	3869.2 ± 313.6	0.160
RUX24	24 h	TA	3.048	5088.7	0.210
RUX24	24 h	TF	3.040	4798.6	0.198
RUX48	48 h	TA	3.022	4236.2	0.175
RUX48	48 h	TF	3.011	4559.5	0.189
RUX7	7 gg	TA	2.975	4153.0	0.172
RUX7	7 gg	TF	2.981	3716.0	0.154
RUX14	14 gg	TA	2.931	2953.0	0.122
RUX14	14 gg	TF	2.950	2864.7	0.118
RUX21	21 gg	TA	2.919	3379.1	0.140
RUX21	21 gg	TF	2.922	2760.9	0.114
RUX30	30 gg	TA	2.923	2502.4	0.103
RUX30	30 gg	TF	2.934	2592.4	0.107
RUX60	60 gg	TA	2.998	3438.2	0.142
RUX60	60 gg	TF	2.969	3396.2	0.140
MEDIA			2.973	3602.8	0.150

L'analisi dei dati evidenzia come il tempo di ritenzione rimanga sostanzialmente costante durante tutto il periodo di osservazione, con valori compresi tra 2.919 e 3.048 minuti e un valore medio di 2.973 minuti, perfettamente sovrapponibile a quello dello standard puro (2.977 ± 0.060 minuti). La costanza del tempo di ritenzione rappresenta un importante indice della stabilità cromatografica del principio attivo e conferma che il ruxolitinib mantiene inalterate le proprie caratteristiche durante la conservazione della sospensione orale.

L'analisi delle aree cromatografiche mostra un andamento coerente con le concentrazioni determinate nei diversi tempi di studio. Le concentrazioni misurate risultano comprese tra 0.103 e 0.210 mg/mL, con un valore medio complessivo pari a 0.150 mg/mL.

Sebbene si osservino alcune oscillazioni della concentrazione nel corso dello studio, tali variazioni non seguono un andamento di progressiva diminuzione e risultano analoghe sia nei campioni conservati a temperatura ambiente sia in quelli mantenuti in frigorifero. Considerando che ogni campione è stato analizzato in duplicato, le differenze osservate possono essere attribuite principalmente alla fisiologica variabilità associata al campionamento di una sospensione orale, preparazione per sua natura eterogenea, nella quale una completa ridispersione del principio attivo rappresenta un requisito fondamentale prima di ogni prelievo analitico.

Di particolare interesse risulta il confronto tra i campioni conservati nelle due diverse condizioni di temperatura. Nel periodo compreso tra 14 e 30 giorni le concentrazioni determinate risultano sostanzialmente sovrapponibili, suggerendo che, nelle condizioni sperimentali adottate, la temperatura di conservazione non abbia influenzato in maniera significativa il comportamento cromatografico della formulazione.

L'assenza di ulteriori picchi nei cromatogrammi e la costanza dello spettro UV acquisito mediante rivelatore DAD indicano inoltre che durante l'intero periodo di osservazione non si sono formati prodotti di degradazione rilevabili con il metodo analitico impiegato. Tale evidenza, associata alla stabilità del tempo di ritenzione, conferma il mantenimento dell'identità chimica del ruxolitinib durante la conservazione della sospensione orale.

Nel complesso, i risultati ottenuti dimostrano che il metodo HPLC-DAD si è rivelato idoneo per il monitoraggio della qualità della formulazione e supportano una buona stabilità chimico-fisica della sospensione orale nelle condizioni sperimentali investigate.

Al fine di agevolare l'interpretazione dei risultati ottenuti mediante analisi HPLC-DAD, di seguito viene riportato un grafico riassuntivo (Figura 19) che consente di visualizzare l'andamento della concentrazione di principio attivo durante il periodo di conservazione della sospensione orale.

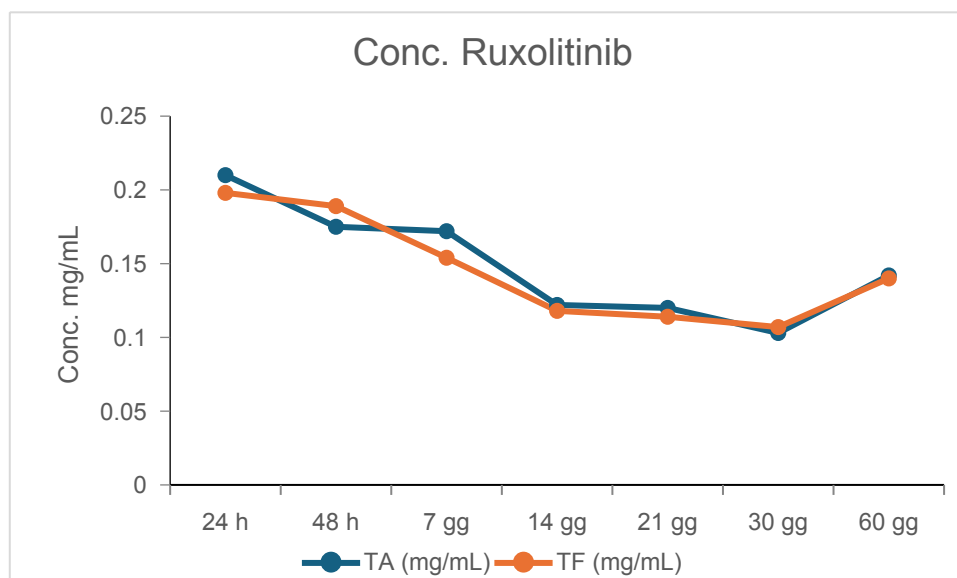


Figura 19. Andamento della concentrazione del ruxolitinib nella sospensione orale durante lo studio di stabilità.

In particolare, i campioni conservati a temperatura ambiente (20–25 °C) e a temperatura refrigerata (6–8 °C) presentano un andamento sostanzialmente sovrapponibile, suggerendo che la temperatura di conservazione non abbia influenzato in maniera significativa la stabilità della formulazione nelle condizioni sperimentali adottate.

In entrambe le condizioni si osserva una progressiva diminuzione della concentrazione del principio attivo fino al trentesimo giorno di conservazione. Tuttavia, il valore determinato al sessantesimo giorno risulta leggermente superiore rispetto a quello rilevato a 30 giorni. Tale incremento non deve essere interpretato come un reale aumento della concentrazione del ruxolitinib, bensì come una conseguenza della natura eterogenea della preparazione.

La formulazione studiata è infatti una sospensione orale, nella quale il principio attivo è disperso sotto forma di particelle solide all'interno del veicolo. Nonostante un'accurata agitazione prima del campionamento, la ridispersione delle particelle può non risultare perfettamente riproducibile ad ogni prelievo, determinando una fisiologica variabilità nella quantità di principio attivo effettivamente analizzata.

A tale variabilità formulativa si aggiunge quella intrinseca della metodica analitica HPLC, legata alle operazioni di preparazione del campione, filtrazione, iniezione e integrazione del picco cromatografico. L'insieme di questi fattori può giustificare le modeste oscillazioni osservate nella concentrazione del principio attivo durante il periodo di studio.

L'assenza di variazioni significative del tempo di ritenzione, la costanza dello spettro UV acquisito mediante rivelatore DAD e la mancata comparsa di ulteriori picchi cromatografici suggeriscono

che tali oscillazioni non siano attribuibili a fenomeni di degradazione del ruxolitinib, ma riflettano principalmente la normale variabilità analitica e formulativa tipica delle sospensioni orali.

4. CONCLUSIONI

La personalizzazione della terapia farmacologica rappresenta uno dei principali obiettivi della moderna pratica farmaceutica, assumendo un ruolo particolarmente rilevante nell'ambito pediatrico, dove la limitata disponibilità di formulazioni autorizzate rende frequentemente necessario il ricorso a preparazioni galeniche magistrali. In questo contesto, il farmacista ospedaliero riveste un ruolo fondamentale nello sviluppo di formulazioni in grado di rispondere alle esigenze cliniche del singolo paziente, contribuendo a garantire continuità terapeutica, appropriatezza prescrittiva e sicurezza della terapia.

Il presente lavoro di tesi ha avuto come obiettivo lo sviluppo di una sospensione orale galenica di ruxolitinib ottenuta a partire dalle compresse commerciali di Jakavi®, destinata alla somministrazione nei pazienti pediatrici affetti da Graft-versus-Host Disease (GvHD). La formulazione è stata sviluppata utilizzando SyrSpend® SF PH4 quale veicolo sospendente e successivamente sottoposta a uno studio di stabilità mediante analisi HPLC-DAD, finalizzato alla valutazione delle caratteristiche cromatografiche e del mantenimento del principio attivo nel tempo.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che la metodica analitica impiegata è risultata idonea per il monitoraggio della qualità della formulazione.

Durante l'intero periodo di osservazione il tempo di ritenzione del ruxolitinib è rimasto pressoché costante, lo spettro UV è risultato sovrapponibile a quello dello standard di riferimento e non sono stati evidenziati ulteriori picchi cromatografici riconducibili alla formazione di prodotti di degradazione. Le variazioni quantitative osservate durante lo studio sono risultate compatibili con la fisiologica variabilità analitica e con la natura eterogenea della sospensione orale, senza evidenze di alterazioni significative dell'identità chimica del principio attivo.

Dal punto di vista formulativo, la preparazione sviluppata ha dimostrato di possedere caratteristiche adeguate alla somministrazione pediatrica, consentendo una maggiore flessibilità posologica rispetto alla formulazione in compresse e facilitando la personalizzazione della terapia in funzione delle esigenze cliniche del paziente.

Un aspetto particolarmente significativo del presente lavoro è rappresentato dal contesto temporale nel quale esso è stato sviluppato. All'avvio del progetto sperimentale, infatti, il ruxolitinib era disponibile esclusivamente sotto forma di compresse rivestite e la preparazione galenica costituiva l'unica possibilità per ottenere una formulazione orale adatta ai pazienti pediatrici con difficoltà di deglutizione.

Durante lo svolgimento della tesi è stata successivamente introdotta sul mercato la nuova formulazione industriale Jakavi® 5 mg/mL soluzione orale, autorizzata per il trattamento della GvHD nella popolazione pediatrica. Tale evoluzione non riduce il valore scientifico del presente studio; al contrario, conferma come il bisogno clinico individuato dalla farmacia ospedaliera fosse reale e condiviso, tanto da essere successivamente recepito nello sviluppo industriale del medicinale.

Questo lavoro evidenzia come la galenica clinica non rappresenti soltanto uno strumento per sopperire temporaneamente all'assenza di medicinali commerciali, ma costituisca un'importante attività di ricerca applicata, capace di individuare precocemente bisogni terapeutici non soddisfatti e di contribuire allo sviluppo di nuove strategie formulative.

In questo senso, il ruolo del farmacista ospedaliero assume una valenza che va oltre il semplice allestimento del preparato, estendendosi alla progettazione della formulazione, alla valutazione della stabilità, al controllo della qualità e alla collaborazione multidisciplinare con il personale medico.

In conclusione, il presente studio conferma l'importanza della ricerca galenica nell'ambito della farmacia ospedaliera e sottolinea il contributo che essa può offrire allo sviluppo di una terapia sempre più personalizzata, sicura e accessibile, in particolare per i pazienti pediatrici affetti da patologie rare e complesse. L'esperienza maturata dimostra come la stretta collaborazione tra farmacisti ospedalieri, clinici e laboratori di analisi rappresenti un elemento essenziale per favorire l'innovazione terapeutica e migliorare la qualità dell'assistenza al paziente.

5. BIBLIOGRAFIA

- [1] Gottardi F, Leardini D, Muratore E, Baccelli F, Cerasi S, Venturelli F, Zanaroli A, Belotti T, Prete A and Masetti R (2023) Treatment of steroid-refractory graft versus host disease in children. *Front. Transplant.* 2:1251112.
- [2] Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA). *Jakavi® 5 mg/mL soluzione orale. Riassunto delle Caratteristiche del Prodotto (RCP)*. Banca Dati Farmaci AIFA. Disponibile da: <https://medicinali.aifa.gov.it>. Consultato il 6 luglio (2026).
- [3] Haris Ali, Amandeep Salhotra, Badri Modi & Ryotaro Nakamura (2020) Ruxolitinib for the treatment of graft-versus-host disease, *Expert Review of Clinical Immunology*, 16:4, 347-359, DOI: 10.1080/1744666X.2020.1740592.
- [4] Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA). *Jakavi® 5 mg compresse (ruxolitinib). Riassunto delle Caratteristiche del Prodotto (RCP)*. Banca Dati Farmaci AIFA. Disponibile da: <https://medicinali.aifa.gov.it>. Consultato il 6 luglio (2026).
- [5] Amoozgar, B., Bangolo, A., Mohamed, A., Mansour, C., Elias, D., Cho, C., & Reddy, S. (2025). JAK2 Inhibitors and Emerging Therapies in Graft-Versus-Host Disease: Current Perspectives and Future Directions. *Biomedicines*, 13(7), 1527. <https://doi.org/10.3390/biomedicines13071527>.
- [6] Locatelli F, Kang HJ, Bruno B, Gandemer V, Rialland F, Faraci M, Takahashi Y, Koh K, Bittencourt H, Cleary G, Rosko C, Li X, St Pierre A, Prahallad A, Diaz-de-Heredia C. Ruxolitinib for pediatric patients with treatment-naïve and steroid-refractory acute graft-versus-host disease: the REACH4 study. *Blood*. (2024) Nov 14;144(20):2095-2106. doi: 10.1182/blood.2023022565. PMID: 39046767.
- [7] Locatelli F, Antmen B, Kang HJ, Koh K, Takahashi Y, Kupesiz A, Dias Matos MGA, Chopra Y, Bhat S, Im HJ, Güngör T, Lu MY, Stefanelli T, Rosko C, St Pierre A, Burock K, Smith Y, Sinclair K, Diaz-de-Heredia C. Ruxolitinib in treatment-naïve or corticosteroid-refractory paediatric patients with chronic graft-versus-host disease (REACH5): interim analysis of a single-arm, multicentre, phase 2 study. *Lancet Haematol.* (2024) Aug;11(8): e580-e592. doi: 10.1016/S2352-3026(24)00174-1. Epub 2024 Jul 10. Erratum in: *Lancet Haematol.* 2024 Dec;11(12): e886.
- [8] Hinterlang, Mélanie, Sebti, Maria, Cotteret, Camille, Vidal, Fabrice, Neven, Bénédicte, Cisternino, Salvatore, Schlatter, Joël, Physicochemical Stability Study of Oral Suspension Containing Ruxolitinib in Children with Steroid-Refractory Acute Graft-Versus-Host Disease, *The Scientific World Journal*, (2022), 1931118, 6 pages, (2022).
- [9] Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali. (2008). *Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana* (12^a ed.). Roma: Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato.

- [10] Fagron. SyrSpend® SF: Product Brochure. Rotterdam, The Netherlands: Fagron; **(2021)**. Available from: <https://www.fagron.com/brands/oral-vehicles/>
- [11] Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA). I rischi e le opportunità dell'uso di farmaci fuori indicazione. Disponibile da: <https://www.aifa.gov.it/-/i-rischi-e-le-opportunita-dell-uso-di-farmaci-fuori-indicazione>. Consultato il 6 luglio **(2026)**.
- [12] Controllo di qualità: Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali. **(2008)**. *Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana* (12^a ed.). Roma: Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato.
- [13] Norme di Buona Preparazione, Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali. **(2008)**. *Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana* (12^a ed.). Roma: Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato.
- [14] Schieppati, D., Patience, N. A., Campisi, S., & Patience, G. S. **(2021)**. Experimental methods in chemical engineering: High performance liquid chromatography—HPLC. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 99(8), 1663–1682.
- [15] Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. **(2010)**. Introduction to Modern Liquid Chromatography (3rd ed.). Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.”
- [16] Michael Swartz **(2010)** Hplc Detectors: A Brief Review, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 33:9-12, 1130-1150,

