



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2187741 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.

A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

Patentstyret

- | | | |
|------|---|---|
| (21) | Oversettelse publisert | 2012.07.23 |
| (80) | Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet | 2012.03.14 |
| (86) | Europeisk søknadsnr | 08795303.0 |
| (86) | Europeisk innleveringsdag | 2008.08.14 |
| (87) | Den europeiske søknadens Publiseringsdato | 2010.05.26 |
| (30) | Prioritet | 2007.08.15 US 955939 P |
| (84) | Utpekete stater | AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR
HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT
RO SE SI SK TR |
| (60) | Utskilt fra | 12153605.6 |
| (73) | Innehaver | Reata Pharmaceuticals, Inc., 2801 Gateway Drive, Suite 150, Irving, TX 75063-2648, USA |
| (72) | Oppfinner | WALLING, John, 6908 Parkridge Blvd. 130, Irving, TX 75063, USA
PARENT, Stephan, D., 2120 Cumulus Court, W. Lafayette, IN 47906, USA
JONAITIS, David, T., 225 Perrin Avenue, Lafayette, IN 47901, USA
KRAL, Robert, M., 2405 Brittany Lane, Grapevine, Texas 76051, USA |
| (74) | Fullmektig | Plougmann & Vingtoft, Postboks 1003 Sentrum, 0104 OSLO, Norge |

-
- | | | |
|------|-----------------------|---|
| (54) | Benevnelse | Nye former av cddo-metylester |
| (56) | Anførte publikasjoner | DE-A1-102005 041 613 B1, US-A- 5 064 823 B1, US-A1- 2003 119 732 B1, US-A1- 2005 276 836 B1, WO-A-2007/069895 B1, PLACE ET AL.: 'The Novel Synthetic Triterpenoid, CDDO-Imidazolid, Inhibits Inflammatory Response and Tumor Growth in Vivo' CLINICAL CANCER RESEARCH vol. 9, July 2003, pages 2798 - 2806, XP008131340 |

KRYSSREFERANSE TIL BESLEKTEDE PATENTSØKNADER

Denne søknaden krever prioritet fra US provisorisk søknad 60/955,939, inngitt 15. august 2007.

5

OPPFINNELSENS BAKGRUNN

Triterpenoider biosyntetiseres i planter ved cycliseringen av skvalen. Selv om de er kandidater for medisinsk anvendelse, viser disse naturlig forekommende
10 molekylene relativt svak biologisk aktivitet. Følgelig har kjemikere søkt å syntetisere analoger med forbedret potens (Honda *et al.*, 1997 & 1998).

Flere syntetiske analoger er rapportert å undertrykke *de novo*-dannelsen av iNOS og COX-2 i makrofager som har blitt stimulert av IFN- γ eller LPS (Suh *et al.*,
15 1998; Honda *et al.*, 2002). Et annet syntetisk triterpenoid, 2-cyano-3,12-dioksoleana-1,9(11)-dien-28-oat (CDDO), fremviser antiinflammatorisk og anti-proliferativ aktivitet (Honda *et al.*, 1998 & 2000).

Under undersøkelse av metylesteren av CDDO, som er metyl 2-cyano-3,12-dioksoleana-1,9(11)-dien-28-oat (CDDO-metylester), bestemte Bore *et al.* (2002)
20 en krystallstruktur. I den formen, som er hydratisert, koordinerer vann interaksjoner som forårsaker en spesiell krystallpakking og -strukture.

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

25

I én utførelsesform av foreliggende oppfinnelse tilveiebringes en ikke-vannholdig krystallinsk form av CDDO-metylester. Den ikke-vannholdige krystallformen har fortrinnsvis en romgruppe $P4_3 2_1 2$ med enhetscelledimensjoner på $a=14,2 \text{ \AA}$, $b=14,2 \text{ \AA}$ og $c=81,6 \text{ \AA}$. Oppfinnelsen ser også på en farmasøytisk sammensetning
30 i fast doseringsform, omfattende (i) en terapeutisk effektiv mengde av en ikke-vannholdig krystallinsk form av CDDO-metylester med (ii) en spiselig bærer.

I tillegg er foreliggende oppfinnelse innbefattet i en glassaktig fast form av CDDO-metylester, som har et røntgenpulverdiffraksjonsmønster med en halo-topp ved
35 omtrent $13,5^\circ 2\theta$, som vist i figur 2C, og en glasstransisjonstemperatur (T_g). I

spesielle utførelsesformer kan T_g strekke seg fra omkring 120 °C til omkring 135 °C. I andre utførelsesformer strekker T_g seg fra omkring 125 °C til omkring 130 °C. Den glassaktige faste formen av CDDO-metylester kan ha et PDF-spektrum med lignende topper som figur 28 fra omkring 5 Å til omkring 20 Å.

5

- Videre tilveiebringer oppfinnelsen en farmasøytisk sammensetning i fast doseringsform, som omfatter (i) en terapeutisk effektiv mengde av en glassaktig fast form av CDDO-metylester med (ii) en spiselig bærer. I dette henseendet er én anvendelse av oppfinnelsen en metodologi for behandling av en cancerpasient,
- 10 omfattende: å administrere en slik farmasøytisk sammensetning til en cancerpasient. En anvendelse av oppfinnelsen ser også på administrering av den glassaktige formen av CDDO-metylester i kombinasjon med et annet anticancermedikament. For eksempel kan anticancermedikamentet være gemcitabin og canceren kan være pankreascancer. En anvendelse av oppfinnelsen omfatter også
- 15 en metodologi for behandling av sykdommer eller lidelser som involverer akutt eller kronisk oksidativt stress og inflammasjon, spesielt de kjennetegnet delvis ved overekspresjon av induserbar nitrogenoksidsyntase (iNOS) eller induserbar cyklooksygenase (COX-2).
- 20 I tillegg er oppfinnelsen rettet mot en dimetanolsolvatform av CDDO-metylester, som har et røntgenpulverdiffraksjonsmønster med karakteristiske topper som vist i tabell 18 og et DSC-mønster som vist i figur 24. I samsvar med oppfinnelsen kan dimetanolsolvatformen anvendes som et intermediat i fremstillingen av en glassaktig fast form av CDDO-metylester. En fremgangsmåte for fremstillingen av den
- 25 glassaktige faste formen av CDDO-metylester, via dimetanolsolvatformen, omfatter å fremstille en dimetanolsolvatform av CDDO-metylester og tørke dimetanolsolvatformen.

- I overensstemmelse med en annen utførelsesform er oppfinnelsen rettet mot en
- 30 fremgangsmåte for å dyrke en krystall av CDDO-metylester-dimetanolat, omfattende å fremstille en løsning av rensset CDDO-metylester i varm vannfri metanol, tilsette den varme løsningen til en beholder med avkjølt metanol og filtrere de resulterende krystallene.

- 35 I overensstemmelse med en annen utførelsesform er oppfinnelsen rettet mot en

farmasøytisk sammensetning omfattende (i) en terapeutisk effektiv mengde av CDDO-metylester og (ii) en eksipiens som er en glassdanner, slik at sammensetningen har en T_g .

- 5 Eksipiensen kan velges, for eksempel, fra gruppen bestående av (A) et karbohydrat, karbohydratderivat eller karbohydratpolymer, (B) en syntetisk organisk polymer, (C) et organisk syresalt, (D) et protein, polypeptid eller peptid og (E) et høymolekylært polysakkarid. Illustrerende for klassen med syntetiske organiske polymereksipienser er en hydrokspropylmetylcellulose, slik som
- 10 hydrokspropylmetylcellulose-ftalatester, et poly[1-(2-okso-1-pyrrolidiny)etylen eller kopolymer derav, slik som PVP/VA, og en metakrylsyrekopolymer, slik som metakrylsyre-etylakrylatkopolymer (1:1).

- En annen mønstergyldig eksipiens i dette henseendet er kopovidon, som er 1-
- 15 vinyl-2-pyrrolidon-vinylacetatkopolymer (3:2).

KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

Figur 1 beskriver den kjemiske strukturen til CDDO-metylester.

20

Figur 2 presenterer XRPD-mønsteret av Form A (topp) og Form B (bunn). Fra topp til bunn: umikronisert Form A; mikronisert Form A og Form B.

Figur 3 viser DSC- og TG-kurven til CDDO-metylester (Form A).

25

Figur 4 viser varmeobjektbordsanalysen av Form A - umikronisert.

Figur 5 viser den dynamiske dampsorpsjonsisotermen til Form A - umikronisert.

30 Figur 6 viser SEM-bilder av Form A - umikronisert.

Figur 7 viser Form A før (topp) og etter (bunn) stress ved 195 °C.

Figur 8 viser NMR-spektrumet av Form A - umikronisert.

Figur 9 viser MDSC-kurven av Form B CDDO-metylester.

Figur 10 viser Form B CDDO-metylester før (topp) og etter (bunn) termisk
5 belastning ved 200 °C/omgivelses RH i 60 minutter.

Figur 11 viser NMR-spektrumet av Form B CDDO-metylester.

Figur 12 viser en ORTEP-tegning av et enkelt Form A-molekyl med merking.
10 Atomer er representert ved 50 % sannsynlighet anisotropiske termiske ellipsoider.

Figur 13 viser en ORTEP-tegning av rominnholdet til den asymmetriske enheten
av Form A krystaller. Atomer er representert ved 50 % sannsynlighet
anisotropiske termiske ellipsoider.
15

Figur 14 viser et pakningsdiagram av Form A-krystaller sett ned den
krystallografiske *a*-aksen.

Figur 15 viser et pakningsdiagram av Form A-krystaller sett ned den
20 krystallografiske *b*-aksen.

Figur 16 viser et pakningsdiagram av Form A-krystaller sett ned den
krystallografiske *c*-aksen.

25 Figur 17 viser det beregnede røntgenpulvermønsteret av Form A.

Figur 18 viser det eksperimentelle XRPD av Form A.

Figur 19 presenterer en sammenligning av de beregnede og de eksperimentelle
30 XRPD-mønstre for Form A CDDO-metylester.

Figur 20 viser en representativ graf av arealet under kurven for Form A og Form
B, etter en 4,1 mg/kg oral administrasjon til cynomolgus-aper. Hvert datapunkt
representerer den gjennomsnittlige plasmakonsentrasjon av CDDO-metylester i 8
35 dyr. Feilstolper representerer standardavviket innenfor prøvepopulasjonen.

Figur 21 viser en sammenligning av plasmakonsentrasjon av Form B CDDO-metylester versus Form A i dyr #505M (toppfelt) og dyr #507F (bunnfelt).

- 5 Figur 22 presenterer en sammenligning av plasmakonsentrasjon av Form B CDDO-metylester versus Form A mellom dyr #508F (toppfelt) og dyr #502M (bunnfelt).

Figur 23 beskriver termogrammer av CDDO-metylester-hemibenzensolvat.

10

Figur 24 viser termogrammer av CDDO-metylester-dimetanolsolvat.

Figur 25 beskriver TGIR-data relatert til CDDO-metylester-dimetanolsolvat.

- 15 Figur 26 presenterer XRPD-mønstre av CDDO-metylester-dimetanolsolvat, før (topp) og etter (bunn) TGIR-analyse (opp til 140 °C).

Figur 27 er en overleggsfremstilling av PDF-data for Form A vs. Form B. Lokal sekvens er nesten lik fra omkring 5 Å til omkring 20 Å.

20

Figur 28 er en overleggsfremstilling av røntgenamorfe mønstre for forskjellige preparater av Form B, som viser betydelig uniformitet blant preparatene.

Figur 29 er en skjematisk fremstilling av romgruppe $P4_32_12$ (#96).

25

Figur 30 viser de gjennomsnittlige blodkonsentrasjonene av CDDO-metylester etter enkle orale administrasjoner av CDDO-metylester-kapsler til Cynomolgus-hann aper (fase 2 og 3).

30 **DETALJERT BESKRIVELSE AV DE FORETRUKNE UTFØRELSESFORMER**

Som kjent har studien av triterpenoider som undertrykkere av iNOS-aktivitet, og spesielt i hemmingen av NO-produksjon, demonstrert den høye potensen til CDDO og CDDO-metylester ($IC_{50} < 1$ nM-nivå). Se Honda *et al.* (2000). Disse studiene
35 fokuserte på solubilisert CDDO-metylester, og ga lite karakterisering av en fast

CDDO-metylester. Arbeidet til Bore *et al.* (2002) kastet lys over en struktur, den første publisert for et triterpenoid, av en enkelt, solvatisert krystallinsk form av CDDO-metylester.

- 5 For å forstå det terapeutiske potensialet til CDDO-metylester, beskrevet i figur 1 (kjemisk struktur) og i figur 12 (ORTEP-tegning), undersøkte de nåværende oppfinnerne andre former av forbindelsen som innehadde egenskaper, slik som større vandig løselighet og kjemisk stabilitet, som er fordelaktig for utvikling av et medisinsk produkt med passende farmakokinetikk. Derfor oppdaget oppfinnerne
- 10 to former av CDDO-metylester, som skiller seg fra krystallformen belyst av Bore *et al.* (2002), som har slike egenskaper og følgelig er kandidater for legemiddelutvikling i kraft av seg selv.

- Oppfinnerisk "Form A" av CDDO-metylester er usolvatisert (ikke-vannholdig) og er
- 15 karakterisert ved en distinktiv krystallstruktur, med en romgruppe $P4_3 2_1 2$ (nr. 96), vist i figur 29, enhetscelledimensjoner på $a = 14,2 \text{ \AA}$, $b = 14,2 \text{ \AA}$ og $c = 81,6 \text{ \AA}$, og ved en pakningsstruktur, tegnet i figur 14-16, hvorved tre molekyler er pakket på helisk måte ned den krystallografiske b -aksen. Tabell 10 under spesifiserer ytterligere krystalldata for Form A, sammen med krystallografiske
- 20 datainnsamlingsparametere.

- Den andre "Form B" av oppfinnelsen er i en enkelt fase, men mangler en slik definert krystallstruktur. Snarere er Form B eksemplifisert ved et røntgenpulverdiffraksjons- (XRPD) spektrum som skiller seg fra det til Form A (se figur 2, *inter*
- 25 *alia*). Videre viser Form B en biotilgjengelighet som er overraskende bedre enn den til Form A (se eksempel 7).

- Metodologi for syntesen av CDDO-metylester har blitt publisert. Se US patent nr. 6,326,507, Honda *et al.* (1998) og Honda *et al.* (2000). Oppfinnerne har oppdaget
- 30 at både Form A og Form B av CDDO-metylester lett fremstilles fra en rekke løsninger av forbindelsen, illustrert ved de spesifisert i tabell 3-5, *infra*. Spesielt kan Form B fremstilles ved hurtig fordamping eller langsom fordamping i MTBE, THF, toluen eller etylacetat. Likeledes kan Form A fremstilles via hurtig fordamping, langsom fordamping eller langsom avkjøling av en CDDO-metylester-
- 35 løsning i etanol eller metanol. Preparater av CDDO-metylester i aceton kan

frembringe enten Form A, ved å anvende hurtig fordamping, eller Form B, ved å anvende langsom fordamping. Ytterligere fremgangsmåter for fremstilling er beskrevet under, inkludert tabellene tilveiebrakt der.

- 5 Siden den ikke har en definert krystallstruktur, mangler Form B likeledes distinkte XRPD-topper, slik som de som eksemplifiserer Form A, og er istedenfor karakterisert ved et generelt "halo" XRPD-mønster. Spesielt faller den ikke-krystallinske form B i kategorien "røntgenamorfe" faste stoffer fordi dens XRPD-mønster fremviser tre eller færre primære diffraksjonshaloer (se figur 10, for
- 10 eksempel). Innenfor denne kategorien er Form B et "glassaktig" materiale: som vist ved PDF stemmer de nærmest nabo atom-atominteraksjonene overens med det som er observert for krystallinsk form A, men oppfatningen av en gjennomsnittlig enhetscelle gjelder ikke fordi ingen langtrekkende sekvens er manifestert.
- 15 Ulikt Form A viser derfor prøver av Form B ingen langtrekkende molekyllær korrelasjon, dvs. over omtrent 20 Å (se figur 27). Videre viser termisk analyse av Form B-prøver en glasstransisjonstemperatur (T_g). Derimot viser ikke et uregelmessig nanokrystallinsk materiale en T_g , men istedenfor kun en smelte-temperatur (T_m), over hvilken krystallinsk struktur blir en væske.
- 20 Den foreliggende beskrivelse karakteriserer også en CDDO-metylester-dimetanol-solvatform som kan anvendes for å fremstille Form B (se eksempel 9). Også karakterisert her er en CDDO-metylester-hemibenzenat-form (se eksempel 8).
- 25 Selv om mikronisering av andre krystallinske materialer har blitt funnet å påvirke XRPD-spektra, resulterer XRPD-analyse av mikronisert Form A i et spektrum lignende umikronisert Form A. Se figur 2 for en side om side sammenligning av umikronisert Form A, mikronisert Form A og Form B CDDO-metylester.
- 30 Forskjellige måter for karakterisering kan anvendes sammen for å skjelne Form A og Form B CDDO-metylester fra hverandre og fra andre former av CDDO-metylester. Illustrerende for teknikkene egnet for dette formål er faststoff kjernemagnetisk resonans (NMR), røntgenpulverdiffraksjon, røntgenkrystallografi, differensial skanning kalorimetri (DSC), dynamisk dampсорpsjon/desorpsjon

(DVS), Karl Fischer-analyse (KF), varmeobjektbordsmikroskopi, modulert differensial skanning kalorimetri, FT-IR og Raman-spektroskopi.

Spesielt kan analyse av XRPD- og DSC-data skille Form A, Form B og

5 hemibenzenatformer av CDDO-metylester.

Egenskapene til de oppfinneriske CDDO-metylesterformer er både distinktive, som nevnt over, og bidragende til deres anvendelse som medisinske midler. For eksempel varierte biotilgjengeligheten av Form B og Form A CDDO-metylester i
10 aper da apene mottok ekvivalente doseringer av de to formene oralt, i gelatinkapsler. Se eksempel 7. I tillegg vil stabiliteten til de nylig identifiserte CDDO-metylesterformene være nyttige i produksjonen av farmasøytisk sammen-setninger. På lignende måte for å skille Form A og Form B CDDO-metylester fra hverandre og fra andre former av CDDO-metylester, kan CDDO-metylester
15 dispersjoner som bibeholder "røntgenamorf" karakter, som beskrevet i større detalj under, skilles fra dispersjoner som inneholder krystallinsk form A CDDO-metylester ved en rekke teknikker, inkludert XRPD- og DSC-analyse. Således viser dispersjoner som inneholder Form A krystallinsk CDDO-metylester typisk diskrete
20 toppe karakteristisk for den rene Form A CDDO-metylester, spesielt de som finnes ved omtrent 13,35 og 8,78 ($^{\circ}2\theta$) (se for eksempel tabell 17, *infra*).

Egenskapene til en CDDO-metylester-polymereksipiensdispersjon av oppfinnelsen er både distinktive og bidragende til deres anvendelse som medisinske midler. For eksempel varierte biotilgjengeligheten til utvalgte CDDO-metylester-dispersjoner,
25 formulert med ytterligere inaktive additiver, i aper da apene mottok ekvivalente doseringer av dispersjonene i gelatinkapsler. Se Eksempel 7, *infra*, studiefase 2 og 3. I flere tilfeller frembrakte formuleringer inneholdende CDDO-metyl-polymer-eksipiensdispersjoner overraskende ytterligere forbedringer i biotilgjengelighet, selv relativt til formuleringer fremstilt fra ren Form B CDDO-metylester.

30

Nærværet av multiple former, inkludert polymorfer, i farmasøytiske faste stoffer har blitt beskrevet tidligere, for eksempel, av Cui (2007). De krystallinske og amorfe formene av en forbindelse kan forevise forskjellige fysiske og kjemiske karakteristika. For eksempel kan amorfe former ha høyere løselighet relativt til
35 den krystallinske formen. Hver forbindelse er imidlertid unik i dette henseendet,

og graden med hvilken et amorph materiale vil skille seg fra den krystallinske tilstanden må undersøkes på en sak-til-sak basis og kan ikke forutsies *a priori*. I tillegg er noen amorfe materialer tilbøyelige til omkrystallisering.

- 5 I denne sammenhengen kan variabilitet i datainnsamling oppstå på grunn av en myriade av faktorer. Følgelig bruker denne beskrivelsen uttrykkene "omkring" eller "omtrent" for å indikere variasjoner i data brukt for å beskrive CDDO-metylesterformene. For eksempel kan en smeltetemperatur variere basert på instrumentering eller betingelser. Med hensyn til en målings nøyaktighet slår USP
- 10 <891> fast at "In the case of melting, both an "onset" and a "peak" temperature can be determined objectively and reproducibly, often to within a few tenths of a degree". Praktisk erfaring indikerer at dette ikke er riktig for måling av et materiales T_g . T_g vil avhenge av mange faktorer: hvordan prøven ble fremstilt, prøvens termiske historie (relaksasjon), restløsningsmiddel som kan eller ikke kan
- 15 fordunste før T_g , instrumentet, prøvepreparering (prøvemasse, partikkelstørrelse, pakking, fortynningsmidler), parameterne brukt for å måle T_g (spesielt skanningshastighet), parameterne brukt for å bestemme stedfestingen av T_g (begynnelses-temperatur, midtpunkttemperatur, infleksjonspunkttemperatur eller offset-temperatur), om en relaksasjonsendoterm er nærværende ved T_g og andre
- 20 faktorer. Noen faktorer vil minske T_g (plastisering grunnet restvann/løsningsmiddel), mens andre vil øke T_g (raskere skanningshastighet, relaksasjon) og kan gjøre det med så mye som 10-15 °C. Endringen i varmekapasitet ved T_g (ΔC_p) kan være viktig, som rapportert av Zhou et al., J. Pharmaceutical Sciences 91: 1863-72 (2002).

25

Foreliggende beskrivelse snakker om forskjellige mønster hva gjelder deres "karakteristiske" topper. Samlingen eller gruppen med slike topper er unik for en gitt polymorf form, innenfor usikkerheten som kan tilskrives henholdsvis individuelle instrumenter og eksperimentelle betingelser.

30

For hver av de krystallinske formene er en gruppe med fem karakteristiske topper listet i tabell 17-19 under. Typisk variasjon kan være $\pm 0,1^\circ 2\theta$, men toppposisjon kan variere opp til $\pm 0,2^\circ 2\theta$ eller mer i noen eksperimenter.

Tabell 17 - Form A

Topp-posisjon ($^{\circ}2\theta$)
13,35
8,78
17,4
12,94
14,18

Tabell 18 - Dimetanolat

Topp-posisjon ($^{\circ}2\theta$)
8,87
11,26
16,63
16,9
13,72

Tabell 19 - Hemibenzenat

Topp-posisjon ($^{\circ}2\theta$)
14,17
9,25
16,32
14,62
17,11

- 5 XRPD-mønsteret til det glassaktige materialet (Form B) viser en bred halo-topp ved omtrent $13,5^{\circ}2\theta$, som synes å være karakteristisk for Form B. Andre haloer er ikke så veldefinerte, og formen/posisjonen til dette mønsteret kan forandres som en funksjon av instrumentet og de eksperimentelle betingelsene. Variasjon i posisjonen til denne brede toppen vil være større enn den til de karakteristiske
- 10 toppene til de respektive krystallinske formene. Spesielt kan variabilitet på opptil $\pm 1^{\circ}2\theta$ for den brede toppen i Form B forventes i visse instrumenter.

XRPD-mønsteret til glassaktige materialer fremstilt som CDDO-metylester-eksipiensdispersjoner viser også en bred halo-topp, typisk sentrert ved omtrent 13,5 °2θ. Disse materialene viser likeledes en T_g ved modulert differensial skanning kalorimetri (mDSC). Likt ren Form B CDDO-metylester-prøver, kan
5 formen og posisjonen til XRPD-mønsteret til en eksipiensdispersjon endres som en funksjon av det anvendte instrumentet, de eksperimentelle betingelsene og den spesifikke eksipiensen anvendt for å fremstille dispersjonene.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre henholdsvis Form A, Form B og
10 glassaktig, XRPD-amorfe eksipiensdispersjoner av CDDO-metylester, for anvendelse i behandling av sykdommer forbundet med inflammasjon, inkludert en cancertilstand og forskjellige patologier som påvirker sentralnervesystemet. En anvendelse av oppfinnelsen inkluderer behandling av disse sykdommene som omfatter å administrere en effektiv mengde av de nye CDDO-metylesterformene
15 listet her til et individ som trenger det. Disse forbindelsene har anvendbarhet for å bedre eller forebygge inflammasjon involvert i cancers etiologi, Alzheimers sykdom (AD), Parkinsons sykdom (PD), multippel sklerose (MS), amyotrofisk lateralsklerose (ALS), revmatoid artritt (RA) og andre autoimmune sykdommer, inflammatorisk tarmsykdom, og andre patologiske tilstander knyttet til usedvanlig
20 stor produksjon av enten nitrogenoksid eller prostaglandiner.

Som tidligere bemerket har den aberrante eller usedvanlig store ekspresjonen av enten cyklooksygenase-2 (COX-2) eller induserbare nitrogenoksid syntase (iNOS) blitt implisert i patogenesen til mange sykdomsforløp, inkludert karsinogenese i
25 kolon. Flere syntetiske analoger av triterpenoider, inkludert CDDO-metylester, har blitt rapportert å undertrykke iNOS-ekspresjon. Relaterte studier har vist triterpenoid-supresjon av både iNOS- og COX-2-ekspresjon i makrofager som har blitt stimulert med IFN-γ eller LPS (Suh *et al.*, 1998; Honda *et al.*, 2002). Derfor er behandlinger ved å administrere CDDO-metylesterformer forventet å påvirke
30 iNOS- og COX-2-supresjon.

Overekspresjon av genet for COX-2 er en tidlig og sentral hendelse i kolon-karsinogenese (Prescott og White, 1996; Dubois *et al.*, 1996). Mus med defekter i APC- (adenomatøs polypose coli) genet utvikler store antall intestinale polypper i
35 en tidlig alder, og markerte forhøyelser i COX-2-enzymnivåer har blitt funnet i

disse polyppene. Disse funnene i dyr korrelerer med funnet av forhøyede nivåer av COX-2 mRNA og protein i mange humane primære koloncancere og koloncancercellelinjer (Prescott og White, 1996), og det er antatt at denne forhøyelsen i COX-2 fører til en supresjon av apoptose, som vanligvis ville føre til død av pre-
5 neoplastiske celler (Tsuji og DuBois, 1996). Den funksjonelle relevans av COX-2 for intestinal tumorigenese har blitt demonstrert ved knockout av COX-2-genet (Oshima *et al.*, 1996). Mus som bærer denne knockout ble paret med polyppdannende mus som bærer lesjoner i APC-genet; COX-2-knockout forårsaket en dramatisk reduksjon i antall polypper i avkommet. Videre har behandling av
10 forsøksdyr med enten selektive COX-2-inhibitorer eller ikke-selektive COX-1/COX-2-inhibitorer blitt rapportert å være en potent tilnærming til kjemoforebygging av intestinal cancer (Mamett, 1992; Oshima *et al.*, 1996; Boolbol *et al.*, 1996; Reddy *et al.*, 1996; Sheng *et al.*, 1997). Hva gjelder iNOS rolle i karsinogenese, er det klart at NO er et potent mutagen (Tamir og Tannebaum, 1996) og at nitrogen-
15 oksid også kan aktivere COX-2 (Salvemini *et al.*, 1993, 1994). Det er også en markert økning i iNOS i rottekolontumorer induert av karsinogenet, azoksymetan (Takahashi *et al.*, 1997). Likeledes har overekspresjon av iNOS i humane tumorer blitt rapportert som en negativ prognostisk faktor (f.eks., Ekemekcioglu *et al.*, 2006).

20

Inflammatoriske signalbaner og andre sykdomsassosierte signalbaner, slike som er induert av angiotensin II, stimulerer ofte usedvanlig stor produksjon av reaktive oksygen- eller nitrogentyper (RONS), inkludert superoksid, hydrogenperoksid, nitrogenoksid og peroksynitritt. CDDO-metylester har blitt vist å være
25 en potent fremkaller av antioksidant aktivitet og en potent inhibitor av inflammatoriske prosesser i mange forskjellige celletyper (Dinkova-Kostova *et al.*, 2005; Liby *et al.*, 2006; Ahmad *et al.*, 2006; Shishodia *et al.*, 2006). Alvorlig, akutt inflammasjon som skyldes en rekke årsaker inkludert infeksjon, traume, forbrenninger og kjemiske eksponering kan være livstruende og kan forårsake
30 leversvikt, nyresvikt, respirasjonssvikt eller hjertesvikt. Kronisk inflammasjon og det assosierte oksidative stress bidrar til patologien i mange viktige sykdommer inkludert autoimmune sykdommer (f.eks. revmatoid artritt, lupus, psoriasis og multippel sklerose), kardiovaskulære sykdommer (f.eks. aterosklerose og hjertesvikt), diabetes (type I og type II), respiratoriske sykdommer (f.eks. kronisk
35 obstruktiv lungesykdom og astma), kronisk nyresykdom, nyresvikt, leversvikt og

smertesyndromer (f.eks. nevropatisk smerte, fibromyalgi og migrene). I tillegg har triterpenoider blitt vist å hemme replikasjonen av HIV-1 i makrofager (Vazquez *et al.*, 2005) og kan slik være nyttige i behandlingen av virale sykdommer, spesielt de hvor signifikant morbiditet forårsakes av organ- eller

5 vevsinflammasjon (f.eks. viral hepatitt, influensa, herpes simplex).

MS er kjent for å være en inflammatorisk tilstand i sentralnervesystemet (Williams, Ulvestad og Hickey, 1994; Merrill og Beneviste, 1996; Genain og Nauser, 1997). Inflammatoriske, oksidative eller immunmekanismer kan være

10 involvert i patogenesen av MS, AD, PD og ALS (Bagasra *et al.*, 1995; Griffin *et al.*, 1995; McGeer og McGeer, 1995; Good *et al.*, 1996; Simonian og Coyle, 1996; Kaltschmidt *et al.*, 1997). Både reaktive astrocytter og aktiverte mikroglia har blitt implisert i årsakssammenhengen ved NDD/NID; det har vært en spesiell vektlegging av mikroglia som celler som syntetiserer både NO og prostaglandiner

15 som produkter av de respektive enzymer, iNOS og COX-2. De novo dannelse av disse enzymene kan bli drevet av inflammatoriske cytokiner slik som interferon-gamma eller interleukin-1. På sin side kan usedvanlig stor produksjon av NO føre til inflammatoriske kaskader og/eller oksidativ skade i celler og vev i mange organer, inkludert nevroner og oligodendrocytter i nervesystemet, med følgende

20 manifestasjoner i AD og MS, og muligens PD og ALS (Coyle og Puttfarcken, 1993; Goodwin *et al.*, 1995; Beal, 1996; Good *et al.*, 1996; Merrill og Benvenist, 1996; Simonian og Coyle, 1996; Vodovotz *et al.*, 1996). Epidemiologiske data indikerer at kronisk bruk av NSAID'er, som blokkerer syntese av prostaglandiner fra arakidonat, markert senker risikoen for utvikling av AD (McGeer *et al.*, 1996;

25 Stewart *et al.*, 1997). Følgelig bør Form A og Form B av CDDO-metylester, som midler som blokkerer dannelse av NO og prostaglandiner, være nyttige i terapeutiske tilnærminger for å behandle eller forebygge NDD.

Som beskrevet over har CDDO-Me i en rekke prekliniske studier demonstrert en

30 evne til å hemme ekspresjonen av COX-2 og iNOS, som er enzymer assosiert med både inflammasjon og karsinogenese. CDDO-Me ble også vist å hemme aktiveringen av nukleær faktor-kappa B (NF-KB) og signaltransduser og aktivator av transkripsjon 3 (STAT3), transkripsjonsfaktorer assosiert med inflammasjon, tumorprogresjon og tumorresistens for terapi. Innledende studier viste at CDDO-

35 Me hemmet veksten av mange cancercellelinjer; den gjennomsnittlige IC₅₀-

verdien for CDDO-Me i NCI-60-tumorcellelinjegruppen var omtrent 35 nM. *In vivo*-studier bekreftet at CDDO-Me i realiteten hemmet veksten av tumorer dannet av humane tumorcellelinjer implantert i gnagere eller syngeneiske cancercellelinjer implantert i gnagere (tabell 16). Doser brukt i disse studiene var
5 generelt i området fra 10 til 100 mg/kg/dag, avhengig av arten, stammen og administrasjonsmåten.

Studier spesifisert under gir humane data som reflekterer den fordelaktig virkning av CDDO-metylester på pasienter som lider av en cancertilstand. Se eksempel 10.
10

I lys av det foregående omfatter foreliggende oppfinnelse stabile, kontrollerte doseringsformer med frigivelse som inneholder en CDDO-metylesterform. En doseringsform ifølge oppfinnelsen kan være for en gang-per-dag administrasjon, for forsinket frigivelse eller for pulserende frigivelse, for derved å optimalisere
15 terapi ved å avstemme farmakokinetisk ytelse med farmakodynamiske behov.

Enhver av Form B, Form A og formuleringer som inneholder ekspiensdispersjoner av CDDO-metylester kan administreres oralt. Den aktive forbindelsen kan være belagt i et materiale for å beskytte forbindelsen fra virkningen av syrer og andre
20 naturlige betingelser som kan inaktivere forbindelsen. Andre administrasjonsmåter, slik som topisk, subkutan, intravenøs og intraperitoneal er også del av den gjeldende oppfinnelsen.

For å administrere den terapeutiske forbindelsen kan det være nødvendig å
25 belegge forbindelsen med eller å ko-administrere forbindelsen med et materiale for å forhindre dens inaktivering. Således kan både Form B og Form A CDDO-metylester administreres til et individ i en passende bærer, slik som liposomer, eller i et fortynningsmiddel. Farmasøytisk akseptable fortynningsmidler inkluderer saline og vandige bufferløsninger. Liposomer inkluderer vann-i-olje-i-vann CGF-
30 emulsjoner samt konvensjonelle liposomer. Se, f.eks., Strejan et al., J. Neuroimmunol. 7: 27(1984).

Den terapeutiske forbindelsen kan administreres oralt med inerte fortynningsmidler, additiver eller en spiselig bærer, for å danne en farmasøytisk sammen-
35 setning. I denne hensikt kan den terapeutiske forbindelsen ifølge oppfinnelsen,

med andre ingredienser, være innesluttet i en hard eller myk gelatinkapsel, sammenpresset i tabletter eller innlemmet direkte i individets diett. For oral terapeutisk administrasjon kan Form A eller Form B være inkorporert med eksipienser og anvendes i form av svelgbare tabletter, bukkale tabletter, pastiller, kapsler, eliksirer, suspensjoner, siruper, kjeks og lignende. Likeledes kan en eksipiensdispersjon av foreliggende oppfinnelse tilbys i en rekke doseringsformtyper, inkludert de beskrevet her for Form A eller Form B. Prosentdelen av den terapeutiske forbindelsen i sammensetningene og preparatene kan varieres, i overensstemmelse med konvensjonell praksis, for å bevirke en passende dosering av det aktive midlet.

I tillegg vedrører foreliggende oppfinnelse en farmasøytisk sammensetning som omfatter en effektiv mengde av Form B CDDO-metylester eller Form A, sammen med én eller flere ikke-toksiske, farmasøytisk akseptable bærere og/eller fortynningsmidler og, hvis ønsket, andre aktive ingredienser. Som bemerket over kan den aktive forbindelsen fremstilles som en homogen eksipiensdispersjon, startende fra enten Form B eller Form A. En slik CDDO-metylester-eksipiensdispersjon er en fast løsning og kan anses som en homogen dispersjon på det molekylære nivået. Slike dispersjoner kan fordelaktig formuleres sammen med andre farmasøytisk akseptable additiver, for å stabilisere den aktive forbindelsen og, i noen tilfeller, for å tilveiebringe ytterligere forbedringer i biotilgjengelighet.

Ved formulering av CDDO-metylester som en eksipiensdispersjon styres valget av en eksipiens for dispersjonen av kriteriene at eksipiensen både skal være en god "glassdanner" og farmasøytisk akseptabel. Mer generelt bør eksipiensen danne en stabil, homogen glassaktig matris, som stabiliserer dispersjonen ved å gi en T_g som er over typiske, omgivelsestemperatur lagringsbetingelser. Et ytterligere kriterium i dette henseendet er at eksipiensen anvendt for dispersjonen bør være kjemisk kompatibel med andre additiver, slik som bindemidler, fyllstoffer, smøremidler, glidemidler og lignende, som kan anvendes i sluttformuleringen for å gi ønskede funksjonelle egenskaper.

For å tilfredsstille disse kriteriene, kan en eksipiens velges, i henhold til oppfinnelsen, fra en rekke forbindelser karakterisert ved passende høye T_g -verdier, slik som (A) karbohydrater, karbohydratderivater og karbohydratpolymerer, (B)

syntetiske organiske polymerer, (C) organisk syresalter, (D) proteiner, polypeptider og peptider, og (E) høymolekylære polysakkarider slik som heparin, som er et sulfatert polysakkarid, og hyaluronsyre, et mukopolysakkarid.

- 5 Illustrerende for klasse (A) er: cellulosederivater, slik som hydroksypropylcellulose (HPC), hydroksypropylmetylcellulose (HPMC) og etylcellulose; polysakkarider, slik som raffinose, maltotriose, stachyose, dekstriner (inkludert maltodekstriner og cyclodekstriner, *inter alia*), dekstraner og løselig stivelse; alditoler, slik som mannitol, xylitol og sorbitol; og disakkarider, slik som laktose, trehalose, maltose
10 og sukrose. En foretrukket eksipiens fra denne klassen er hydroksypropylmetylcellulose-ftalester (HPMC-P).

- Klasse (B) er eksemplifisert ved poly[1-(2-okso-1-pyrrolidiny)etylen, *a/k/a* povidon eller polyvinylpyrrolidon (PVP) og beslektede kopolymerer, slik som
15 PVP/VA, med varierende molekylvekter. Også inkludert i denne klassen er metakrylsyrefamilien av kopolymerer, slik som metakrylsyrekopolymer Type C (USP/NF).

- Klasse (C) er illustrert ved salter, slik som natrium-, kalium-, kalsium- og
20 magnesiumsalter, av henholdsvis melkesyre, askorbinsyre, maleinsyre, oksalsyre, malonsyre, eplesyre, ravsyre, sitronsyre, glukonsyre og glutaminsyre. Således er representative salter i dette henseendet natriumcitrat, natriumlaktat, natriummaleat, magnesiumglukonat og natriumaskorbat.

- 25 Mønstergyldige klasse (D) eksipienser er: humant serumalbumin; en polyamino-syre, f.eks., polyalanin, polyarginin, polyglysin og polyglutaminsyre; kasein; kollagen; gelatin og rensede gelatinproteiner; og visse farmakologisk aktive forbindelser, slik som insulin.

- 30 Eksipienser kan endre noen av de fysiske karakteristikaene til de farmasøytiske formuleringene, som bemerket. For eksempel kan dispersjon innenfor de forskjellige polymere eksipienser føre til en reduksjon i den observerte T_g til formuleringen. Vanligvis er T_g en additiv egenskap basert på proporsjoner av involverte materialer. Følgelig er det, når det anvendes polymerer med T_g -verdier
35 som er mindre enn de til den amorfe Form B, en forventning om en reduksjon i

- observert T_g for dispersjonene (blandingene). I tillegg er ofte fuktighet eller spor av residualt organisk løsningsmiddel til stede, som tenderer til å redusere T_g også. For formålet å generere en fast CDDO-Me-dispersjon, må det optimale valg av eksipiens typisk bestemmes empirisk. For eksempel frembrakte forsøk på å
- 5 fremstille glassaktige, XRPD-amorfe dispersjoner ved å anvende polyetylenglykol- (PEG) familien av eksipienser, slik som PEG 6000, blandinger inneholdende karakteristiske topper assosiert med nærværet av Form A CDDO-metylester. Lignende resultater ble oppnådd ved å anvende Vitamin E - TPGS, en eksipiens fremstilt ved å forestere d-alfa-tokoferylsyresuccinat med polyetylenglykol 1000,
- 10 samt ved å anvende etylenoksid-propylenoksidkopolymerer slik som Pluronic®. Som eksemplene under illustrerer, viser visse polymere eksipienser anvendt for å danne dispersjoner med CDDO-Me, ifølge oppfinnelsen, overraskende forbedringer i oral biotilgjengelighet relativt til den rene Form B legemiddelsubstans.
- 15 Fremgangsmåter kan variere for fremstilling av homogen, glassaktig, røntgen-amorfe dispersjoner av CDDO-Me med farmasøytisk akseptable eksipienser, og eksemplene presentert her anvender spraytørking for å frembringe slike dispersjoner. Andre fremgangsmåter for fremstilling kan anvendes for å fremstille dispersjoner ifølge oppfinnelsen med ekvivalente egenskaper og anvendbarhet. Se
- 20 Repka *et al.*, 2002, og referanser sitter deri. Slike andre fremgangsmåter inkluderer, men er ikke begrenset til løsningsmiddelfordamping og ekstrusjon, slik som varm smelteekstrusjon.

- I tillegg til en eksipiens, kan andre additiver inkluderes for å bistå i stabilitet av
- 25 den aktive ingrediens, for å justere pH (dvs. et bufferingsmiddel), for å forbedre dispersjonsevne, for å bistå i å tilveiebringe ensartethet i levering og for å oppnå andre karakteristika ønsket for en farmasøytisk formulering.

- Den administrerte kvantitet av forbindelsen eller sammensetningen ifølge
- 30 foreliggende oppfinnelse vil variere, avhengig av pasienten og administrasjons-måten, og kan være enhver effektiv mengde.

- Et gitt behandlingsregime for administrasjonen av en sammensetning ifølge foreliggende oppfinnelse kan utvikles gjennom normal og rutine preklinisk og
- 35 klinisk testing, hvis detaljer er en funksjon av den terapeutiske indikasjonen,

blant andre faktorer. Kvantiteten av det aktive midlet administrert kan variere over et vidt område, for derved å tilveiebringe, i en enhetsdosering, en farmakologisk effektiv mengde basert på kroppsvekt til pasienten per dag, for å oppnå den ønskede virkningen. Den ønskede doseringen kan også variere i

5 henhold til tilstanden som behandles. For eksempel kan behandling av akutt cancer kreve en signifikant høyere dose enn behandling av en inflammatorisk tilstand slik som artritt.

Spesielt fremstilles en sammensetning ifølge foreliggende oppfinnelse som en

10 enhetsdose og tas fortrinnsvis fra 1 til 3 ganger daglig, mest foretrukket en gang daglig for å oppnå den ønskede virkningen.

I tillegg kan en sammensetning ifølge den gjeldende oppfinnelsen tas annenhver dag, hver tredje dag, hver fjerde dag, hver femte dag, hver sjette dag eller en

15 gang i uken.

Sammensetningene ifølge gjeldende oppfinnelse kan dessuten administreres alene eller i kombinasjon med andre legemidler basert på en pasients spesielle behov. Spesielt kan sammensetningene ifølge gjeldende oppfinnelse administreres med

20 anticancermidler som del av et behandlingsregime. For eksempel kan CDDO-metylester administreres med gemcitabin, eller andre midler, under behandlingen av en cancer, slik som pankreascancer.

Generelt fremstilles farmasøytiske sammensetninger ifølge oppfinnelsen ved å

25 anvende konvensjonelle materialer og teknikker, slik som miksing, blanding og lignende. Videre kan et medikament som inneholder Form A eller Form B også inneholde andre komponenter inkludert, men ikke begrenset til, passende adjuvantia, bærere, eksipienser og stabilisatorer, etc. En terapeutisk formulering ifølge oppfinnelsen er fortrinnsvis en fast, men kan, i prinsippet, være en væske,

30 slik som en suspensjon eller emulsjon.

Ifølge oppfinnelsen er den orale vedlikeholdsdosen typisk mellom omkring 0,1 mg og omkring 1000 mg, fortrinnsvis gitt en gang daglig. Doseringen kan varieres eller avstemmes mot et individs vekt. Typiske doseringer kan være fra omkring

0,01 mg/kg til 100 mg/kg, der de foretrukne enhetsdoseringsformer inkluderer tabletter og kapsler.

- De følgende eksemplene er kun illustrerende og er ikke tenkt å begrense
- 5 foreliggende oppfinnelse. Materialene og fremgangsmåtene anvendt i eksemplene er skissert under:

a. Materialer

- 10 Løsningsmidler og andre reagenser ble kjøpt fra kommersielle leverandører og var enten HPLC- eller ACS-kvalitet.

b. Eksperimentelle metoder

15 i. Approksimativ løselighet - Løsningsmiddeltilsetningsmetode

- En veid prøve ble behandlet med alikvoter av testløsningsmiddel ved rom-temperatur. Fullstendig oppløsning av testmaterialet ble bedømt ved visuell inspeksjon. Oppløselighet ble estimert basert på det totale løsningsmidlet anvendt
- 20 for å gi fullstendig oppløsning. Den faktiske oppløseligheten kan være høyere enn den beregnede verdien på grunn av anvendelsen av løsningsmiddelaliquoter som ble for store eller på grunn av en langsom oppløsningshastighet. Oppløseligheten uttrykkes som "mindre enn" hvis oppløsning ikke fant sted under eksperimentet. Hvis fullstendig oppløsning ble oppnådd som et resultat av kun én alikvot-
- 25 tilsetning, uttrykkes oppløseligheten som "høyere enn".

ii. Polymorfundersøkelse

- Både termodynamiske og kinetiske krystallisasjonsteknikker ble anvendt. Disse
- 30 teknikkene er beskrevet i mer detalj under. Så snart faste prøver ble høstet fra krystallisasjonsforsøkene, ble de enten undersøkt under et mikroskop for morfologi eller observert med det blotte øye. Enhver krystallinsk form ble notert, men noen ganger foreviste det faste materialet ukjent morfologi, på grunn av liten partikkelstørrelse. Faste prøver ble deretter analysert ved XRPD, og

mønstrene ble sammenlignet med hverandre for å identifisere nye krystallinske eller ikke-krystallinske former.

(i) Kald presipitasjon (CP)

5

Løsninger ble fremstilt i forskjellige løsningsmidler ved hevet temperatur.

Løsningene ble deretter filtrert gjennom et 0,2 µm nylon- eller PTFE-filter i et antiløsningsmiddel ved sub-romtemperatur. Nærværet eller fraværet av faste stoffer ble notert. Hvis det ikke var noen faste stoffer til stede, eller hvis mengden
10 av faste stoffer ble vurdert som for liten for XRPD-analyse, ble flasken plassert i en fryser. De resulterende faststoffer ble isolert ved filtrering og tørket før analyse.

(ii) Hurtig fordamping (FE)

15

Løsninger ble fremstilt i forskjellige løsningsmidler og sonikert mellom alikvot-tilsetninger for å bistå i oppløsning. Så snart en blanding nådd fullstendig oppløsning, som bedømt ved visuell observasjon, ble løsningen filtrert gjennom et 0,2 µm nylonfilter. Den filtrerte løsningen ble tillatt å fordampe ved romtemperatur i
20 en åpen flaske. Faststoffene som ble dannet ble isolert og analysert.

(iii) Frysetørking (FD)

1,4-dioksanløsninger ble fremstilt, filtrert gjennom et 0,2 µm nylonfilter og frosset
25 ved å anvende tørris. Den frosne prøven ble lyofilisert ved å anvende FTSsystems Flexi-Dry. Lyofiliseringstemperaturen ble ikke kontrollert.

(iv) Mikronisering

30 Mikronisering av materialer kan gjennomføres i fluidenergimøller og kan redusere partikkelstørrelse til 1 til 20 mikron. Ytterligere beskrivelse av disse prosessene kan bli funnet i PERRY'S CHEMICAL ENGINEERS' HANDBOOK, 7. utg. (McGraw Hill, 1998).

(v) Finmaling

En fast prøve ble plassert i en malingsrotor av rustfritt stål med en liten metallball. Noen prøver hadde en liten mengde vann tilsatt (våtoppmaling).

- 5 Prøven ble deretter malt ved 30 Hz på en Retesh type MM220 blandemølle i omtrent 20 minutter. De resulterende faste stoffer ble isolert og analysert.

(vi) Kryofinmaling

- 10 En fast prøve ble plassert i en finmalingskrukke av rustfritt stål med en oppmalingsstav. Prøven ble deretter malt ved 15 Hz på en SPEX Certiprep modell 6750 kryomølle i en fastsatt tidslengde. Finmalingskrukken ble senket ned i et bad av flytende nitrogen under eksperimentet. De faste stoffene ble isolert og analysert.

15

(vii) Smelte/avkjøle

- En fast prøve ble plassert på et objektglass av glass og jevnet ut. Objektglasset ble deretter plassert på en varmeplate ved en fastsatt temperatur inntil det faste stoffet smeltet. Ved smelting ble objektglasset fjernet fra varmeplaten og plassert på en kald benkeplate for å avkjøle raskt. De resulterende faststoffene ble tørket under nitrogen og analysert.

(viii) Rotasjonsfordamping

25

Løsninger ble fremstilt i forskjellige løsningsmidler og filtrert gjennom et 0,2 µm nylonfilter. Prøven ble plassert på rotasjonsinndamperen og fjernet da den var tørr. De resulterende faststoffene ble isolert og analysert.

30 (ix) Langsom fordamping (SE)

- Løsninger ble fremstilt i forskjellige løsningsmidler og sonikert mellom alikvottilsetninger for å bistå i oppløsning. Så snart en blanding nådde fullstendig oppløsning, som bedømt ved visuell observasjon, ble løsningen filtrert gjennom et 0,2 µm nylonfilter. Den filtrerte løsningen ble tillatt å fordampe ved rom-
- 35

temperatur eller under nitrogen i en flaske dekket med aluminiumsfolie perforert med nålehull. Det således dannede faststoff ble isolert og analysert.

(x) Langsom avkjøling (SC)

- 5 Mettede løsninger ble fremstilt i forskjellige løsningsmidler ved omtrent 60 °C og filtrert gjennom et 0,2 µm nylonfilter inni en åpen flaske mens den fremdeles var varm. Flasken ble dekket og tillatt å avkjøle langsomt til romtemperatur. Nærværet eller fraværet av faststoff ble notert. Hvis det ikke var noen faste stoff til stede, eller hvis mengden av faststoff ble bedømt for liten for XRPD-analyse,
- 10 ble flasken plassert i et kjøleskap. Igjen ble nærværet eller fraværet av faststoff notert og, hvis det ikke var noe, ble flasken plassert i en fryser. Faste stoff som ble dannet ble isolert ved filtrering og tillatt å tørke før analyse.

(xi) Slemmingeksperimenter

- 15 Løsninger ble fremstilt ved å tilsette nok faststoff til et gitt løsningsmiddel slik at overskudd faststoff var til stede. Blandingen ble deretter agitert i en forseglet flaske ved romtemperatur. Etter enten 7 eller 10 dager, ble faststoff isolert ved vakuumfiltrering og analysert.

20

(xii) Stresseksperimenter

- Faststoff ble belastet under forskjellige temperatur og/eller relativ fuktighet (RH) miljøer i en målt tidsperiode. Spesifikke RH-verdier ble oppnå ved å plassere
- 25 prøvene på innsiden av forseglede kammere som inneholdt mettede saltløsninger eller på innsiden av ESPEC-temperatur og fuktighetskabinetter. Saltløsningene ble valgt og fremstilt ved å følge en ASTM-standardprosedyre. Prøver ble analysert ved XRPD umiddelbart etter fjerning fra stressmiljøet.

30 iii. Enkeltkrystallstrukturbestemmelse

(i) Prøvepreparering

- En mettet løsning av CDDO-metylester ble preparert i metanol ved ~60 °C og
- 35 filtrert gjennom et 0,2 µm filter inn i en åpen flaske mens den fremdeles var

varm. Flasken ble dekket og tillatt å avkjøle langsomt til romtemperatur.
Nærværet av pyramidale tabletter ble observert etter 1 dag.

(ii) Datainnsamling

- 5 En fargeløs plate av CDDO-Me ($C_{32}H_{43}NO_4$) med omtrentlige dimensjoner på to sider på $0,01 \times 0,01$ mm, ble montert på en glassfiber i tilfeldig orientering. Preliminær undersøkelse og datainnsamling ble utført med Mo K_α -stråling ($\lambda = 0,71073$ Å) på et Nonius KappaCCD diffraktometer utstyrt med en grafitt krystall, innfallende stråle monokromator. Raffinering ble utført på en LINUX PC ved å
- 10 anvende SHELX97 (Sheldrick, 1997) [1].

- Cellekonstanter og en orienteringsmatriks for datainnsamling ble oppnådd fra minste kvadraters raffinering ved å anvende innstillingsvinklene til 46742 refleksjoner i området $2^\circ < \theta < 22^\circ$. Den raffinerte mosaikiteten fra
- 15 DENZO/SCALEPACK [2] var $0,32^\circ$ som indikerer god krystallkvalitet. Romgruppen ble bestemt med programmet XPREP [3]. Fra det systematiske nærværet av de følgende betingelser: $h00 \ h=2n$, $00l \ l=4n$, og fra etterfølgende minste kvadraters raffinering, ble romgruppen bestemt å være $P4_32_12$ (nr. 96).
- 20 Dataene ble innsamlet til en maksimal 2θ verdi på $44,43^\circ$, ved en temperatur på 150 ± 1 K.

(iii) Datareduksjon

- 25 Enkeltbilder ble integrert med DENZO-SMN [2]. Totalt 46742 refleksjoner ble samlet, hvorav 9168 var unike. Lorentz- og polariseringskorreksjoner ble anvendt på dataene. Den lineære absorpsjonskoeffisienten er $0,074 \text{ mm}^{-1}$ for Mo K_α -stråling. En empirisk absorpsjonskorreksjon ved å anvende SCALEPACK [2] ble anvendt. Transmisjonskoeffisienter strakk seg fra 0,9995 til 0,9999.
- 30 Gjennomsnittet av intensiteter av ekvivalente refleksjoner ble beregnet. Overensstemmelsesfaktoren for gjennomsnittet var 9,3 % basert på intensitet.

(iv) Strukturløsning og raffinering

- 35 Strukturen ble løst ved direkte metoder ved å anvende SHELXS97 [1]. De

gjenværende atomene ble lokalisert i etterfølgende differanse Fourier-synteser. Hydrogenatomer ble inkludert i raffineringen, men begrenset til å sitte på atomet til hvilket de er bundet. Strukturen ble raffinert i fullmatriks minste kvadraters ved å minimere funksjonen:

$$5 \quad \sum w(|F_o|^2 - |F_c|^2)^2$$

Vekten w er definert som $1[\sigma^2(F_o^2) + (0,0176P)^2 + (0,0000P)]$, der $P = (Fo^2 + 2Fc^2)/3$.

- 10 Spredningsfaktorer ble tatt fra "International Tables for Crystallography" [5]. Av de 9168 refleksjonene brukt i raffineringene, ble bare refleksjonene med $F_o^2 > 2\sigma(F_o^2)$ brukt i beregning av R . Totalt 5421 refleksjoner ble brukt i beregningen. Den siste syklus med raffinering inkluderte 1024 variable parametere og konvergente (største parameterskift var $< 0,01$ ganger dens estimerte standard-
- 15 avvik) med ikke-vektede og vektete overensstemmelsesfaktorer på:

$$R = \sum |F_o - F_c| / \sum F_o = 0.051$$

$$R_w = \sqrt{\left(\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / \sum w(F_o^2)^2 \right)} = 0.085$$

- 20 Standardavviket til en observasjon med enhetsvekt var 1,05. Den høyeste toppen i den endelige differanse Fourier hadde en høyde på 0,22 e/Å³. Den laveste negative toppen hadde en høyde på -0,25 e/Å³.

(v) Beregnet røntgenpulverdiffraksjon- (XRPD) mønster

25

Et beregnet XRPD-mønster ble frembrakt for Cu-stråling ved å anvende PowderCell 2.3 [6] og atomkoordinatene, romgruppen og enhetscelleparameterne fra enkeltkrystalldataene.

30 (vi) ORTEP og pakningsdiagrammer

ORTEP-diagrammet ble utarbeidet ved å anvende ORTEP III [7][9]. Atomene er symbolisert ved 50 % sannsynlighet anisotrope termiske ellipsoider. Paknings-

diagrammer ble utarbeidet ved å anvende CAMERON [8] modelleringsprogramvare. Ytterligere figurer og BFDH morfologiprediksjoner ble utviklet ved å anvende Mercury 1.4.1 [4].

5 c. Instrumentelle teknikker

i. Differensial skanning kalorimetri (DSC)

Analysen ble utført på et TA Instruments differensial skanning kalorimeter 2920 eller Q1000. Instrumentet ble kalibrert ved å anvende indium som referansematerialet. Prøven ble plassert i en standard aluminium DSC-digel med en krympet lokk-konfigurasjon, og vekten nøyaktig registrert. Prøvecellen ble ekvilibrert ved 25 °C og varmet under en nitrogenrensing ved en hastighet på 10 °C/min, opp til en sluttemperatur på 250 °C.

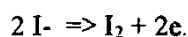
15

ii. Dynamisk dampсорpsjon/desorpsjon (DVS)

Fuktighetssorpsjon/desorpsjonsdata ble innsamlet på en VTI SGA-100 Vapor Sorption Analyzer. Sorpsjon- og desorpsjonsdata ble innsamlet over et område på 20 5 % til 95 % relativ fuktighet (RH) ved 10 % RH intervaller under en nitrogenrensing. Prøver ble ikke tørket for analyse. Likevektskriterier anvendt for analyse var mindre enn 0,010 vekt% endring i 5 minutter, med en maksimal likevektstid på 3 timer hvis vektkriteriet ikke ble møtt. Data ble ikke korrigert for det innledende fuktighetsinnholdet i prøvene. Natriumklorid og polyvinylpyrrolidin ble 25 anvendt som kalibreringsstandards.

iii. Karl Fischer (KF)

Coulometrisk Karl Fischer (KF) analyse for vannbestemmelse ble utført ved å 30 anvende en Mettler Toledo DL39 Karl Fischer titrator. Omtrent 24-32 mg prøve ble plassert i KF titreringsbeholderen som inneholdt Hydranal - Coulomat AD. Prøven ble deretter titrert ved hjelp av en generatorelektrode som produserer jod ved elektrokjemisk oksidasjon:



35 Tre replikater ble oppnådd for å sikre reproduktibilitet.

iv. Varmeobjektbordsmikroskopi

Varmeobjektbordsmikroskopi ble utført ved å anvende et Linkam varmeobjektbord (modell FTIR 600) montert på et Leica DM LP mikroskop. Prøver ble observert ved å anvende et 20x objektiv (obj.) med krysspolarisatorer (CP) og lambda (λ)

- 5 kompensator. Prøver ble plassert på et dekkglass. Et andre dekkglass ble deretter plassert over prøven. Hver prøve ble visuelt observert mens objektbordet ble varmet. Bilder ble tatt ved å anvende et SPOT Insight™ fargedigitalkamera med SPOT programvare v. 4.5.9. Varmeobjektbordet ble kalibrert ved å anvende USP smeltepunktsstandarder.

10

v. Modulert differensial skanning kalorimetri (MDSC)

Modulert differensial skanning kalorimetridata ble oppnådd på et TA Instruments differensial skanning kalorimeter utstyrt med et kjølesystem (RCS). Prøven ble

- 15 plassert i en aluminium DSC-digel, og vekten nøyaktig registrert. Digelen ble dekket med et lokk og krympet. MDSC-data ble oppnådd ved å anvende en moduleringsamplitude på +/- 0,8 °C og en 60-sekunds periode med en underliggende oppvarmingshastighet på 2 °C/min fra -25 til 250 °C. Temperaturen og varmekapasiteten ble kalibrert ved å anvende henholdsvis indiummetall og safir
- 20 som kalibreringsstandarder. Den rapporterte glasstransisjonstemperaturen oppnås fra infleksjon av trinnendringen i den reversible varmestrømmen versus temperaturkurven.

vi. Kjernemagnetisk resonans (NMR)

25

Løsningfase ^1H NMR-spektra ble samlet av Spectra Data Services, Inc.

Akvisisjonsparametere er trykket på hvert spektrum. Spektra ble referert til intern tetrametylsilan ved 0,0 ppm.

30 vii. Optisk mikroskopi

Observasjoner gjort ved optisk mikroskopi ble samlet på et Wolfe polariserende optisk mikroskop ved en forstørrelse på 4x. Kryssede polarisatorer (CP) ble brukt for å observere dobbeltbrytning i prøvene.

viii. Skanningelektronmikroskopi (SEM)

Skanningelektronmikroskopi (SEM) ble utført ved å anvende et FEI Quanta 200 skanningelektronmikroskop. Under høyvakuum-modus ble en faststoff tilbake-
5 sprednings- (Etd) detektor anvendt. Strålespenning var 5,0 kV. Prøver ble sputter-belagt ved å anvende en Cressington 108auto Sputter Coater ved -20 mA og ~0,13 mbar (Ar) med Au/Pd i 75 sekunder. Prøver ble preparert for analyse ved å plassere en liten mengde på karbon dobbeltklebende tape festet til en aluminiumprøveholder. Instrumentet ble kalibrert for forstørrelse ved å anvende
10 NIST-standarder. Data ble samlet ved å anvende xTm (v. 2.01), «build number» 1564 og analysert ved å anvende XT Docu (v. 3.2). Forstørrelser rapportert på SEM-bildene ble beregnet ved den innledende datafangsten. Målestokken rapportert i den nedre delen av hvert bilde er nøyaktig ved endring av størrelsen på bildene og bør anvendes når størrelsesbestemmelser gjøres.

15

ix. Termogravimetri (TG)

Analyser ble utført på en TA Instruments 2950 termogravimetrisk analysator. Kalibreringsstandardene var nikkell og Alumel™. Hver prøve ble plassert i en
20 aluminiumprøvedigel og satt inn i TG-ovnen. Prøver ble først ekvilibrert ved 25 °C, deretter varmet under en strøm av nitrogen ved en oppvarmingshastighet på 10 °C/min, opp til en sluttemperatur på 350 °C med mindre annet er spesifisert.

x. Røntgenpulverdiffraksjon (XRPD)

25

(i) Inel XRG-3000

Røntgenpulverdiffraksjonsanalyser ble også utført på et Inel XRG-3000 diffraktometer, utstyrt med en bueformet posisjonssensitiv detektor med et 2θ-
30 område på 120°. Sanntidsdata ble samlet ved å anvende Cu Kα-stråling ved en oppløsning på 0,03°2θ. Rørspenningen og strømstyrken ble satt til henholdsvis 40 kV og 30 mA. Mønster vises fra 2,5 til 40°2θ for å lette direkte mønstersammenligninger. Prøver ble preparert for analyse ved å pakke dem inn i tynnveggede glasskapillarrør. Hvert kapillarrør ble montert på et goniometerhode som er
35 motorisert for å gjøre spinning av kapillarrør mulig under datafangst.

Instrumentkalibrering ble utført daglig ved å anvende en silisiumreferanse-standard.

d. Ytterligere beregningsteknikker

5

i. PDF

Én teknikk anvendt i dataanalysen av røntgenamorfe data er Pair Distribution Function (PDF). Som navnet antyder, består PDF av en lineær sum av alle de koherente atom-atom interaksjoner innenfor materialet. Mangelfulle (uryddige) materialer vil fremvise de samme atom-atom interaksjoner som den krystallinske fasen, men over en redusert lengdeskala. Derfor kan slike materialer sammenlignes med krystallinske opphavsmaterialer ved å undersøke toppene i PDF over de første få nanometerne. Sammenligning mellom spektra i området 0 Å til omkring 5 Å er vanskelig på grunn av artefakter i dette området.

15

Ved dannelsen av glassaktig material vil PDF-toppene forevise noe bevegelse fra de krystallinske toppposisjonene fordi molekylerne relakserer sine posisjoner. Dette er lignende for et termisk ekspansjons-/kontraksjonstilfelle der, selv om PDF-toppene forflytter seg i liten grad, de relative toppintensitetene fremdeles bør være gjenkjennelig som relatert til det originale krystallinske materialet. Fordi materialet går inn i den termodynamiske amorge tilstand, vil noe av punktgruppesymmetriforholdene gå tapt som gir en PDF med redusert kompleksitet. Det vil også være noe toppbevegelse. De glassaktige/amorge materialene vil forevise PDFer som raskt vil falle til null over de 2 til 3 nærmeste nabo- (NN) avstander.

25

Målebetingelser anvendes for å minimere bakgrunnen i røntgenmønstrene og algoritmene anvendes for å beregne PDF fra målte røntgendata. PDFene ble beregnet ved å anvende PatternMatch v2.2.1, ved å anvende hele omfanget av målte data for alle prøver.

30

Eksempel 1 - Oppløselighetsestimater

Approksimative løseligheter ble bestemt i forskjellige løsningsmidler ved romtemperatur, med resultatene som gitt i tabell 2. CDDO-metylester forevise høy

løselighet i flertallet av de anvendte organiske løsningsmidlene. Løseligheten i vann synes å være mindre enn 0,1 mg/ml.

Eksempel 2 – Resultater av polymorfskreening

- 5 Omtrent 50 polymorfe skreeningseksperimenter ble utført. Form A ble observert fra omtrent 50 % av prøvene. Dannelsen av Form A var ikke begrenset til en spesiell krystallisasjonsbetingelse og ble fremstilt fra en rekke forskjellige eksperimenter og løsningsmidler. Form B-materiale ble fremstilt fra lyofilisering, smelting/avkjøling og flere fordampingseksperimenter.

10

Polymorfe skreeningsprøver er opplistet alfabetisk i tabell 3-5 med det anvendte løsningsmidlet. Representative XRPD-mønster av Form A- og Form B-materialer er sammenlignet i figur 2. Karakteriseringsdata for formene er oppsummert i eksemplene under.

15

Eksempel 3 - Karakterisering av CDDO-metylester - Form A (umikronisert)

- Form A er usolvatisert (tabell 6). Enkeltkrystallstrukturen av Form A ble bestemt basert på metodene beskrevet over. Krystaller av CDDO-metylester ble dyrket og avgitt for enkeltkrystallstrukturanalyse. Krystallstrukturen ble bestemt ved enkeltkrystallrøntgendiffraksjon. Den foreslåtte struktur av CDDO-metylester er vist i figur 1.

- 25 De tetragonale celleparameterne og beregnet volum er: $a = 14,21620(10) \text{ \AA}$, $b = 14,21620(10) \text{ \AA}$, $c = 81,5875(12) \text{ \AA}$, $\alpha = 90,00^\circ$, $\beta = 90,00^\circ$, $\gamma = 90,00^\circ$, $V = 16488,9(3) \text{ \AA}^3$. CDDO-metylesterens molekylvekt er 505,70 g/mol med $Z = 24$ som resulterer i en beregnet densitet på $1,222 \text{ g cm}^{-3}$. Romgruppen ble bestemt å være $P4_32_12$ (nr. 96). En oppsummering av krystalldata og krystallografiske datainnsamlingsparametere er gitt i tabell 10.

30

Kvaliteten på den oppnådde strukturen er høy, som indikert ved R -verdien på 0,05 (5,1 %). Vanligvis er R -verdier i området 0,02 til 0,06 oppgitt for de mest pålitelig bestemte strukturer.

En ORTEP-tegning av et enkelt CDDO-metylester-molekyl er vist i figur 12. Den asymmetriske enheten vist i figur 13 inneholder tre CDDO-metylester-molekyler. Molekylene er de samme som det foreslåtte strukturen fra figur 1.

- 5 Pakningsdiagrammer sett langs de *a*, *b* og *c* krystallografiske aksene er vist i henholdsvis figur 14-16. Uten hydrogenbindinger, omfatter krystallstrukturen utallige van der Waals-interaksjoner. Perspektivet ned den krystallografiske *b*-aksen (figur 15) fremhever den spiralformede naturen til pakningsordningen av den tetragonale skruaksen og den predikerte BFDH-morfologien. Den predikerte
- 10 morfologien er i god overensstemmelse med den observerte beskaffenheten til enkeltkrystallen brukt i datainnsamlingen.

- Det beregnede XRPD-mønster til CDDO-metylester, frembrakt fra enkeltkrystalldata, er gitt i figur 17. Det eksperimentelle XRPD-mønster til CDDO-
- 15 metylester er vist i figur 18. Karakteristiske topper for Form A XRPD-mønsteret er gitt i tabell 17. En sammenligning av de beregnede og eksperimentelle XRPD-mønstrene (figur 19) viser at alle toppene i de eksperimentelle mønstrene er representert i det beregnede XRPD-mønsteret, hvilket indikerer at bulkmaterialet sannsynlig er en enkelt fase. Den svakt konsistente forskyvningen observert i
- 20 topplassering skyldes sannsynligvis det faktum at det eksperimentelle pulvermønsteret ble samlet ved romtemperatur, og enkeltkrystalldataene ble samlet ved 150 °K. Lave temperaturer anvendes i enkeltkrystallanalyse for å forbedre strukturens kvalitet.

- 25 I korthet ble enkeltkrystallstrukturen til CDDO-metylester Form A bestemt for å bekrefte den foreslåtte molekylstrukturen. Romgruppen ble bestemt å være $P4_32_12$ (nr. 96). Strukturen til CDDO-metylester består av tre molekyler pakket i en spiralformet natur ned den krystallografiske *b*-aksen. Alle toppene i de eksperimentelle mønstrene er representert i det beregnede XRPD-mønsteret,
- 30 hvilket indikerer at bulkmaterialet sannsynligvis er en enkelt fase.

- De termiske data for Form A er vist i figur 3. DSC-kurven viser en grunnlinjeforskyvning ved omtrent 157 °C og en endoterm med en begynnelsestemperatur ved omtrent 222 °C (signalmaksimum ved ~224 °C). Hendelsen ved ~224 °C ble
- 35 bekreftet som smeltingen ved varmeobjektbordsmikroskopi (figur 4).

Termogravimetri- (TG) kurven foreviser et ubetydelig vekttap på 0,34 % opp til 150 °C, etterfulgt av et vekttap på 1,2 % fra 150 til 210 °C. Karl Fischer-data viser at materialet inneholder omtrent 0,38 % restvann, konsistent med det innledende vekttap observert ved TG.

5

DVS-dataene indikerer at Form A ikke er hygroskopisk (figur 5). Materialet viser en ubetydelig vektendring gjennom hele eksperimentet. Det resulterende materialet ble analysert ved XRPD og er Form A.

- 10 SEM-bilder er vist i figur 6. Flere beskaffenheter observeres, inkludert pyramidal, tablett og platelignende.

- Den fysiske stabiliteten til Form A ved forskjellige betingelser ble undersøkt (tabell 7). Prøver stresset ved enten 25 °C/60 % RH eller 40 °C/ 75 % RH i 7 dager viste
- 15 begge en ubetydelig vektendring (henholdsvis 0,6 % tap og 0,2 % økning) som antyder at Form A ikke er hygroskopisk. To prøver ble malt på en kulemølle i omtrent 20 minutter, en tørr og en med en liten mengde vann. Alle prøver ble analysert på nytt med XRPD og forble Form A. En prøve ble stresset ved 195 °C i 15 minutter og viste et 2 % vekttap. XRPD av det resulterende materialet er
- 20 lignende det med Form A; imidlertid er en økning i grunnlinjestøyen tydelig (figur 7).

- Løsnings NMR-spektrumet er vist i figur 8. Spektrumet er overensstemmende med strukturen til CDDO-metylester. Topper ved omtrent 1,6 og 7,3 ppm er tilordnet
- 25 henholdsvis vann og kloroform (på grunn av utveksling).

Form A er derfor usolvatisert og ikke hygroskopisk, og den smelter ved omtrent 228 °C, basert på observasjoner av analytiker under varmeobjektbords-mikroskopi.

30

Eksempel 4 - Karakterisering av CDDO-metylester - Form A (mikronisert)

Mikronisert Form A CDDO-metylester ble bestemt å være Form A ved XRPD (figur 2, tabell 1). Mikronisert materiale kan fremstilles ved konvensjonell metodologi,

velkjent i faget, slik som luftstrålemaling. Disse funnene synes å indikere at mikronisering ikke påvirker Form A til å endre dens XRPD-mønster.

Eksempel 5 - Karakterisering av CDDO-metylester - Form B

- 5 Form B materiale kan fremstilles ved lyofilisering, smelting/avkjøling og flere andre fordampingseksperimenter, som gitt i tabell 3.

Modulerte DSC- (MDSC) data er vist i figur 9. Den reversible kurven viser en glasstransisjonstemperatur (T_g) ved omtrent 125 °C. Den ikke-reversible kurven
10 viser en eksoterm med signalmaksimum ved 195 °C og en endoterm med signalmaksimum ved 223 °C. De ikke-reversible hendelser skyldes høyst sannsynlig krystallisasjon av Form B-materialet (eksoterm) etterfulgt av smeltingen av det krystalliserte materialet (endoterm).

- 15 Den fysiske stabiliteten til Form B-materialet ved forskjellige betingelser ble undersøkt (tabell 9). Prøver stresset ved 22 °C/97 % RH, 40 °C/ 75 % RH, 80 °C/0 % RH og 195 °C/omgivelses RH forble Form B. Stressing av materialet ved 200 °C/omgivelses RH i 60 minutter frembrakte Form A pluss litt Form B materiale (figur 10).

20

Løsnings NMR-spektrumer er vist i figur 11. Spektrumer er overensstemmende med strukturen til CDDO-metylester. Topper ved omtrent 1,6, 5,3 og 7,3 ppm er tilordnet henholdsvis vann, diklormetan og kloroform.

- 25 Form B er ikke hygroskopisk, krystalliserer til Form A ved omtrent 200 °C og har en glasstransisjonstemperatur (T_g) på omtrent 125 °C – 130 °C.

I korthet er Form B ikke hygroskopisk. MDSC-data indikerer at glasstransisjonstemperaturen (T_g) til Form B er omtrent 125 °C – 130 °C. Form B materiale
30 krystalliserer til Form A under stress ved omtrent 200 °C.

Eksempel 6 - Stabilitetsstudier for Form B CDDO-metylester og CDDO-metylester polymereksiptionsdispersjoner

- 35 **(i) Renset Form B-studier**

Form B CDDO-metylester ble underkastet forskjellige stressbetingelser. Tabell 15 gir noen av resultatene fra disse studiene. Form B CDDO-metylester fremstilt ved en nyttig, men mindre foretrukket utførelsesform av denne oppfinnelsen, som involverer anvendelsen av etylacetat som løsningsmiddel, viser betydelig

5 stabilitet. Ikke desto mindre viste testing av Form B-prøver fremstilt i nærvær av etylacetat dannelsen av Form A etter 28-dagers lagring ved temperaturer på 60 °C og over. Derimot beholdt alle prøver fremstilt i overensstemmelse med en foretrukket utførelsesform av denne oppfinnelsen, eksempel 11 under er illustrerende for dette, amorge karakteristika etter stresstesting under spesielt

10 harde betingelser (se tabell 15). Disse studiene viser den overraskende stabiliteten til Form B-materialet, spesielt når det fremstilles i overensstemmelse med den ovennevnte, foretrukne utførelsesformen.

I tillegg ble Form B-prøver fremstilt under varierende betingelser analysert for å

15 bestemme om de har lignende kjemiske egenskaper. Som beskrevet over, det vil si, Form B-prøver ble fremstilt ved kryofinmaling, smelting/avkjøling og spray-tørkingsmetoder. I tillegg ble umikronisert Form B mikronisert for å fremstille mikronisert Form B. PDF-analyse ble utført på prøvene (figur 28), som ble bestemt å være glassaktig av natur.

20

(ii) Studier med CDDO-Me dispersjonspreparater

Studier ble utført for å sammenligne responsen til forskjellige Form B : polymer faste dispersjoner fremstilt ved spraytørking. De studerte produkttegenskapene

25 inkluderte stabilitet og legemiddelopløsningsprofil.

Forskjellige polymerer ble anvendt ved tre aktiv farmasøytisk ingrediens (API) til polymerforhold (20:80; 40:60 og 60:40 %vekt/vekt).

30 De følgende tre polymerer ble valgt:

Metakrylsyre-etylakrylatkopolymer (1:1)

Kopovidon [1-vinyl-2-pyrrolidon-vinylacetatkopolymer (3:2)]

Hypromelloseftalat.

Løsninger av CDDO-Me, enten Form A krystallinsk material eller Form B-materiale, og polymeren valgt for studiet ble oppløst i et passende løsningsmiddel ved de passende vektforhold, typisk for å gi fra 10-20 vekt% faststoffer i løsning. Det typisk anvendte løsningsmiddel var aceton. De resulterende løsningene ble

5 spraytørket ved hjelp av en laboratorieskala spraytørker (BÜCHI, modell B-290), utstyrt med en tovæskedyse, ved å anvende nitrogen som en tørke- og bæregass. Bæregass innløpstemperaturer på 65-85 °C og utløpstemperaturer på 50-60 °C ble typisk anvendt. Faststoffene ble samlet og de spraytørkede pulverne ble ytterligere ettertørket under vakuum for å redusere nivåene av de organiske

10 løsningsmidlene.

De spraytørkede pulverne ble analysert for nivået av residuale organiske løsningsmidler, glasstransisjonstemperatur (T_g) og romdensitet. Etter ettertørking ble pulverne også analysert for renhet, vanninnhold, gjennomsnittlig partikkel-

15 størrelse, fravær av krystallinsk materiale ved røntgenpulverdiffraksjon (XRPD) og oppløsningsprofil.

Dispersjonenes fysiokjemiske karakteristika ble bedømt etter korttidsstressing (etter 5 dager, 40 °C / 75 % RH) ved XRPD og modulert differensial skanning

20 kalorimetri (mDSC).

Disse studiene fant at glasstransisjonstemperaturen, T_g , avtok under korttidsstressing, sannsynligvis på grunn av opptaket av fuktighet i løpet av stressing. Nedgangen var mer uttalt i formuleringene med lave CDDO-metylester : polymer-

25 forhold. For prøver før korttidsstressingen ble én eller to endoterme transisjoner observert ved høyere temperaturer, selv om disse temperaturene er noe lavere enn de observert i begynnelsen. Entalpien forbundet med disse transisjonene avtok når polymerinnholdet avtok. Dette er en indikasjon på at denne transisjonen høyst sannsynlig er relatert til polymeren og ikke til smeltingen av en

30 krystallinsk form. For dispersjoner fremstilt med PVP/VA var faktisk temperaturen til denne endoterme transisjonen nesten lik den observert for ren eksipiens, som mottatt fra produsenten. I hvert tilfelle fortsatte XRPD-profilen etter stressing å være det karakteristiske halo-mønsteret sentrert rundt 13,5 °2 θ , og ingen topper assosiert med den krystallinske formen ble detektert.

Ytterligere spraytørkingsstudier på to formuleringer ble utført, ved å anvende spraytørkingsutstyr for større skala. I disse tilfellene ble en Niro pilotskala tørker modell PSD-1 (mobile minor 2000) anvendt. Også anvendt ble ekvivalente dyse og spraytørkingsbetingelser som de beskrevet over. Tabell 20 og 21 oppsummerer

5 løsningene fremstilt for spraytørking og deres karakteristika etter spraytørking. Formuleringene viste en lavere T_g , relative til ren Form B, fordi formuleringen inkluderte polymerer med en lavere T_g enn Form B.

Eksempel 7 - Administrasjon av CDDO-metylester: Form B versus Form A i

10 Cynomolgus-aper

I fase 1 av denne studien ble en kvantitet harde gelatinkapsler, inneholdende ren mikronisert Form A CDDO-Me eller ren mikronisert Form B CDDO-Me fremstilt ved (i) å tilsette en passende veid kvantitet av den rene form av legemiddel-

15 substansen til en størrelse 1 hard gelatinkapsel og deretter (ii) lukking av kapselen. Ingen ytterligere eksipienser ble anvendt. Enten CDDO-metylester Form B eller Form A ble administrert oralt i en gelatinkapsel til Cynomolgus-aper (dose = 4,1 mg/kg i alle tilfeller).

20 Administrasjon av CDDO-metylester Form B ga en midlere eksponering som var omtrent 520 % større enn den ekvivalente dosen av CDDO-metylester Form A i aper. Tabell 11 sammenligner de individuelle dyrelegemidlereksponeringene. En overkrysningsdesign ble implementert i denne studien for å øke 'n'-verdien og for å forbedre datapålitelighet. En utvaskingsperiode på 1 uke ble implementert under

25 overkrysningen. Figur 20 demonstrerer de oppnådde plasmakonsentrasjonene for begge former av CDDO-metylester over tid i den prøvde populasjonen. Figur 21 representerer sammenlignende CDDO-metylester plasmakonsentrasjoner i dyr #505M og #507F. Figur 22 representerer sammenlignende CDDO-metylester plasmakonsentrasjoner i dyr #508F og #502M.

30 For å ytterligere bedømme den komparative biotilgjengelighet av de orale doseringsformer av CDDO-metylester, inkludert de inneholdende CDDO-metylester-eksipiensdispersjoner, ble to ytterligere studiefaser 2 og 3 utført, som spesifisert under. Disse studiene inkluderte noen av de CDDO-Me Form B -

polymerdispersjonene beskrevet i eksempel 6. Alle formuleringer inkluderte vanligvis anvendte formuleringsadditiver.

Fase 2:

- 5 En vandig suspensjon av nanokrystallinsk CDDO-Me ble fremstilt, startende fra en prøve av mikronisert Form A-materiale. En Retsch® planatorisk kulemølle modell PM 400, inneholdende zirkondioksidballer med 2 mm gjennomsnittlig størrelse, ble fylt med 25 g mikronisert CDDO-Me (gjennomsnittlig partikkelstørrelsesfordeling på 6,1 µm), 5 g docusat-natrium, 1 g Tween 80 og 68,3 g vann. Finmaling ble
- 10 begynt ved omtrent 400 RPM og ble fortsatt i 2 timer. En partikkelstørrelsesfordelings- (PSD) bestemmelse ved å anvende et laserlysgranulometer indikerte at en gjennomsnittelig PSD på 0,37 µm ble oppnådd. Til denne tykke suspensjonen ble 1 g mikrokrySTALLinsk cellulose og 0,2 g xantangummi tilsatt, med kort blanding, og suspensjonen ble lagret nedkjølt.
- 15
- Den kulemalte nanosuspensjonen ble spraybelagt på en tørr eksipiensblanding i et laboratorieskala Aeromatic Strea 1 sveveskikt, der toppspraymonteringen har en spraydysestørrelse på 0,4 mm. Innløpstemperaturen ble satt ved 55 °C. Utløpstemperaturområdet under spraying var 32 til 35 °C. Den resulterende
- 20 granuleringen ble tørket i omtrent 5 minutter, inntil utløpstemperaturen nådde 38 °C (Attachment 3-5). Sammensetningen av de belagte materialene er gitt under.

Teoretisk sammensetning av den nanokrystallinske 30 mg CDDO-Me-formuleringen

Element	Ingrediens	%	mg/enhet
1	CDDO-Me	5,7	19
2	Tween 80	0,12	0,4
3	DOS	1,14	3,8
4	MikrokrySTALLinsk cellulose i suspensjon	0,21	0,7
5	Xantangummi	0,03	0,1
6	MikrokrySTALLinsk cellulose i granulering	24,4	81,55
7	Stivelse Pregel	58,5	195,3

Element	Ingrediens	%	mg/enhet
8	Povidon K29/32	0,5	1,75
9	Krospovidon	8,4	28
10	Kolloidal silisiumdioksid	0,5	1,75
11	Magnesiumstearat	0,5	1,75
Totalt:		100,0	334,1

Den resulterende tørre granulering ble innlevert for HPLC-analyse for å bestemme innholdet av aktiv ingrediens. Dette innholdet ble bestemt til å være 14,4 % (vekt/vekt), betydelig høyere enn den teoretiske verdien (5,7 %). Basert på

5 HPLC-analysen ble kapsler fylt for å gi et netto CDDO-Me-innhold på 30 mg.

De krystallinske mikroniserte Form A og amorfe, mikronisert Form B formuleringene ble fremstilt ved en konvensjonell tørrpulverblandingsprosess ved å anvende, som additiver, mikrokrystallinsk cellulose, pregelatinisert stivelse,

10 krospovidon (fungerende som et desintegrerende middel), kolloidal silisiumdioksid og vegetabilsk kvalitet magnesiumstearat. Mikronisert CDDO-Me Form A med gjennomsnittlig PSD 6,1 µm ble anvendt for Form A-formuleringen, mens mikronisert CDDO-Me Form B med gjennomsnittlig PSD 10,8 µm ble anvendt for den tilsvarende CDDO-Me Form B-formulering. Tabellen under presenterer den

15 kvantitative sammensetningen av begge formuleringene.

Form A og Form B 30 mg kapsel kvantitativ sammensetning

Identitet	% vekt/vekt	mg per kapsel
CDDO-Me (mikronisert)	18,18	30,0
Mikrokrystallinsk cellulose	18,55	30,6
Pregelatinisert stivelse	53,45	88,2
Krospovidon	8,72	14,4
Kolloidal silisiumdioksid	0,55	0,9
Magnesiumstearat (vegetabilsk kvalitet)	0,55	0,9

Identitet	% vekt/vekt	mg per kapsel
Totalt kapselinnhold	100,00	165 mg

Hver av 15 Cynomolgus-hannaper, *Macaca fascicularis*, mottok en enkelt oral administrasjon av CDDO-metylester (3 forskjellige formuleringer, 5 aper per formulering) ved et måldosenivå på 10 mg/kg. Apene var 1-3 år gamle og 2,5-3,5 kg i størrelse. Blodprøver ble samlet opp til 72 timer postdose.

Fase 3:

CDDO-Me-eksipiensdispersjonene beskrevet i eksempel 6 ble videre formulert ved en konvensjonell tørrpulverblandingsprosess, som anvender mikrokrySTALLinsk cellulose, lactose-monohydrat, krospovidon (som fungerer som et desintegrerende middel) og natriumlaurylsulfat som additiver. Den kvantitative sammensetningen av hver formulering fremkommer under.

15 Sammensetning av CDDO-Me-eksipiensdispersjoner blandet med additiver i kapselformulering

Komponent	40 % CDDO-Me / 60 % metakrylsyrekopolymer Type C	60 % CDDO-Me/ 40 % PVP/VA	60 % CDDO-Me/ 40 % HPMC-P
CDDO-Me-dispersjon	60,0 %	50,0 %	50,0 %
MikrokrySTALLinsk			
cellulose	12,8 %	16,0 %	16,0 %
Laktose-monohydrat	20,0 %	25,0 %	25,0 %
Krospovidon	6,4 %	8,0 %	8,0 %
Natriumlaurylsulfat	0,8 %	1,0 %	1,0 %
Totalt kapsel-innhold	100 %	100 %	100 %

Komponent	40 % CDDO-Me / 60 % metakrylsyrekopolymer Type C	60 % CDDO-Me/ 40 % PVP/VA	60 % CDDO-Me/ 40 % HPMC-P
Fyllmasse	125 mg	100 mg	100 mg

Etter en passende utvaskingsperiode (7 til 10 dager) mottok de samme 15 hann Cynomolgus-aper benyttet i Fase 2 hver en enkelt oral administrasjon av CDDO-metylester (3 forskjellige formuleringer, 5 aper per formulering) ved et måldose-nivå på 10 mg/kg. Blodprøver ble samlet opp til 72 timer post-dose.

Tabellen under oppsummerer hver fase av studien.

Fase-nummer	Administrasjons-rute	CDDO-Me formulering	Måldose-nivå	Antall dyr (hanner)
2	Oral (kapsel)	Nanokrystallinsk form A	30 mg/per dyr (10 mg/kg)	5
		Amorf mikronisert Form B		5
		Krystallinsk mikronisert Form A		5
3	Oral (kapsel)	PVP/VA Form B	30 mg/per dyr (10 mg/kg)	5
		HPMC-P Form B		5
		Metakrylsyre-kopolymer Type C- Form B		5

De midlere intravenøse og orale doser mottatt av hann Cynomolgus-aper og midlere konsentrasjoner av CDDO-metylester er oppsummert under:

Fase-nummer	Formulering	Midlere kroppsvekt (kg)	Midlere dose (mg/kg)
	PO (nanokrystallinsk form A)	2,89 ± 0,267	10,5 ± 0,971
2	PO (amorf mikronisert Form B)	2,87 ± 0,177	10,5 ± 0,635

Fase-nummer	Formulering	Midlere kroppsvekt (kg)	Midlere dose (mg/kg)
	PO (krystallinsk mikronisert Form A)	2,91 ± 0,202	10,3 ± 0,702
	PO Form B (PVP/VA)	2,98 ± 0,311	10,2 ± 1,06
3	PO Form B (HPMC-P)	2,93 ± 0,183	10,3 ± 0,627
	PO Form B (Metakrylsyre-kopolymer Type C)	2,93 ± 0,142	10,2 ± 0,486
PO Oral administrasjon med kapsel.			

Gelatinkapsel størrelse 2 ble brukt for å levere formuleringene i fase 2 og gelatinkapsel størrelse 1 ble brukt for levering i fase 3. Netto legemiddelinhold i hver kapsel var 30 mg, som tilsvarer en 10 mg/kg dosering av legemiddel, basert på en antagelse om at hver ape veide 3 kg. Kapselen ble festet til en magesonde, magesonden ble ført inn i dyret og kapselen ble frigjort fra enden av magesonden med lufttrykk fra en tom sprøyte. En liten mengde vann (omtrent 10 ml) ble gitt oralt etter administrasjonen av den siste kapselen.

- 10 Serielle blodprøver (omtrent 1 ml) ble tatt fra femoralvenen eller arterien i hvert dyr og overført til rør inneholdende K₂-EDTA ved hvert av de følgende tidspunktene (faktiske klokkeslett ble registrert):

Fase 2	Pre-dose, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48 og 72 timer post-dose
Fase 3	Pre-dose, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48 og 72 timer post-dose

- Alle prøver ble grundig blandet etter innsamling og plassert på våt is, før de ble avkjølt ved omtrent 4 °C. CDDO-metylester-konsentrasjoner i blod ble analysert ved HPLC-MS/MS.

- Resultatene er gitt i tabell 22 og i figur 30. For fase 2 viste Form B signifikant bedre biotilgjengelighet enn de to testede Form A-formuleringene. Fase 3 resultater viser at hver av de CDDO-Me : polymerdispersjon-baserte formuleringene hadde mye høyere biotilgjengelighet enn både den mikroniserte Form A og

nanokrystallinske form A formuleringen. Metakrylsyrekopolymer Type C og HPMC-P formuleringene viste den høyeste biotilgjengeligheten i apene.

Eksempel 8- Karakterisering av hemibenzenatform av CDDO-Metylester

5

Forskjellige eksperimenter, som gjentok det siste gjenvinningstrinnet fra syntesen av CDDO-metylester, ble utført. Honda *et al.*, 2000. Formålet var isoleringen av krystallinsk materiale fra en løsningsblanding av (10:1) benzen/acetone.

- 10 Omtrent 100 mg CDDO-metylester ble løst i 300 µl benzen/acetone (10:1) og filtrert gjennom et 0,2 µm nylonfilter. Løsningen ble deretter sonikert ved å anvende en ultralydprosessor i 10 minutter og tillatt å fordampe ved romtemperatur i en åpen flaske natten over. En klar gel ble dannet og 100 µl benzen/acetone (10:1) ble tilsatt. Løsningen ble henvist til sonikering på en
- 15 ultralydprosessor i omtrent 30 minutter. Et hvitt presipitat ble dannet. Faststoffene ble tillatt å lufttørke.

- I andre eksperimenter ble omtrent 200 mg CDDO-metylester løst i 0,8 ml benzen/acetone (10:1) og filtrert gjennom et 0,2 µm nylonfilter. Løsningen ble
- 20 deretter jevnt delt i to 1-drams glass. Prøve A og B ble deretter tillatt å raskt fordampe ved romtemperatur i noen få timer. Prøve A ble forsynt med lokk og plassert i en fryser. Etter at prøven frøs ble prøven tillatt å tine ved romtemperatur. En liten ripe ble introdusert ved å bruke en spatel og prøven ble tillatt å fordampe ved romtemperatur. Hvitt faststoff ble dannet og ble tillatt å lufttørke.
 - 25 Prøve B ble forsynt med lokk, hensatt ved romtemperatur og var en klar løsning etter henstand ved romtemperatur natten over. En liten ripe ble introdusert ved å bruke en spatel og prøven ble tillatt å fordampe ved romtemperatur. Hvitt faststoff ble dannet og ble tillatt å lufttørke.

- 30 Krystallinsk materiale, bestemt til å være et hemibenzenat, ble oppnådd fra flere av disse eksperimentene. Som beskrevet over, vil små forstyrrelser, slik som sonikering eller bare introdusering av en liten ripe inne i gjenvinningsglass, fremme krystalliseringen av benzensusvatet (tabell 12).

- 35 Karakteriseringsdata for hemibenzenatet er oppsummert i tabell 13.

Karakteristiske topper for hemibenzenat XRPD-mønsteret er gitt i tabell 19. DSC-kurven foreviser en bred endoterm nær 133 °C, assosiert med ~7,0 % vekttap i TG-termografen figur 23. Vekttapet skyldes sannsynligvis avdampingen av benzen (se NMR-diskusjon under) og tilsvarer 0,5 mol benzen for hvert mol CDDO-metylester. DSC-endotermen observert nær 223 °C resulterer høyst sannsynlig fra smeltingen av desolvatisert materiale.

Disse dataene skiller tidligere isolerte former av CDDO-metylester fra foreliggende oppfinnelse.

10

Eksempel 9 - Karakterisering av ny dimetanolatform av CDDO-metylester

Et CDDO-metylester-dimetanolsolvat ble fremstilt i henhold til prosedyren under. Omtrent 500 mg CDDO-metylester ble løst i 20 ml metanol ved 60 °C. Løsningen ble deretter langsomt satt til 20 ml kald metanol ved -10 °C med agitasjon. Hvitt faststoff ble samlet ved vakuumfiltrering og deretter lagret i en fryser.

15

Karakteriseringsdata er oppsummert i tabell 14. Karakteristiske topper for dimetanolat XRPD-mønsteret er gitt i tabell 18.

DSC-kurven viser en bred endoterm nær 102 °C, assosiert med -11 % vekttap i TG-termografen (figur 24). TGIR-data bekrefter at vekttapet skyldes avdampning av ~2,0 mol metanol (figur 25). Det resulterende materialet fra TGIR-eksperimentet ble gjenvunnet og var amorft ved XRPD (figur 26). En grunnlinjeforskyvning ved omtrent 130 °C, en bred eksoterm nær 203 °C etterfulgt av en skarp endoterm (inntreden: 223 °C) observeres også i DSC-kurven. Disse hendelsene er høyst sannsynlig indikative for Tg til det amorfe materialet (Form B) oppnådd gjennom desolvatiseringen av dimetanolsolvatet etterfulgt av krystallisasjon av det amorfe materialet til Form A og smelting av dette krystallinske materialet.

20
25
30

Løsnings proton-NMR-spektrumet ble oppnådd. De kjemiske tilordningene ble ikke gjort; imidlertid synes det konsistent med den kjemiske strukturen til CDDO-metylester. Toppene ved ~3,51 ppm er tilordnet til metanol og tilsvarer ~1,7 mol. Dette resultatet er konsistent med de termiske dataene over.

Eksempel 10 - kliniske studier med CDDO-metylester

CDDO-Me, formulert ved å anvende mikronisert Form A, ble valgt for klinisk
5 utvikling og først testet i en Fase I sikkerhetsorientert studie i pasienter med
fremskreden cancer som ikke hadde respondere adekvat på tidligere terapier. I
dette Fase I doseopptrappingsforsøket ble CDDO-Me administrert til 21 voksne
pasienter med forskjellige former fremskreden (metastatisk) cancer. Pasienter ble
administrert daglige doser av CDDO-Me-kapsler ved doser som strakk seg fra 5 til
10 900 mg/dag (spesielt 5, 10, 20, 40, 80, 150, 300, 600 eller 900 mg/dag). CDDO-
Me ble administrert i "sykluser" som ble gjentatt inntil pasienten opplevde
uakseptabel toksisitet eller viste tegn på sykdomsprogresjon. I denne studien
bestod én syklus av CDDO-Me 21 etterfølgende dager med dosering etterfulgt av
en 7-dagers hvileperiode hvorefter pasienten var kvalifisert til å starte den neste
15 syklusen.

Både sikkerheten og antitumoraktiviteten til CDDO-Me ble evaluert. I tillegg ble de
biologiske effektene til CDDO-Me karakterisert. CDDO-Me ble svært godt tolerert i
disse pasientene, uten at noen signifikante legemiddelrelaterte negative hendelser
20 ble rapportert. Flere pasienter (omtrent 75 % av vurderbare pasienter) ble ansett
å ha stabil sykdom (basert på standard radiologiske og kliniske kriterier) ved det
første vurderingspunktet etter fullføring av den andre behandlingssyklusen.
Pasienter som ble funnet å ha tegn på progressiv sykdom før fullførelsen av den
andre syklusen ble ikke formelt vurdert, og ble ikke inkludert i gruppen med
25 evaluerbare pasienter. Fem pasienter, inkludert pasienter med melanom og renal
cellecancer, fortsatte å vise stabil sykdom, noen med tegn på regresjon av
individuelle tumorlesjoner, etter fire sykluser med behandling. Fire pasienter ble
ansett å ha stabil sykdom etter minst seks sykluser med behandling. Ingen nye
metastaser ble utviklet i noen pasient som mottok en dose på minst 40 mg
30 CDDO-Me per dag i henhold til den foreskrevne tidsplanen.

Basert på de kjente antiinflammatoriske egenskapene til CDDO-Me ble
sirkulerende inflammatoriske cytokiner evaluert i pasienter i Fase I-forsøket. Ved
doser så lave som 5 mg/dag var det en reduksjon av flere sirkulerende pro-
35 inflammatoriske cytokiner og chemokiner inkludert MMP-9, TNF α , IL-8 og VEGF.

Spesielt ble TNF α , som er kjent for å spille en signifikant rolle i den inflammatoriske prosessen til sykdommer slik som revmatoid artritt, redusert betydelig eller til under de detekterbare grensene i 3 pasienter med hevede grunnlinje TNF-nivåer (én pasient hver ved behandlingsdoser på 10, 20 og 40 mg per dag). Til forskjell fra anti-TNF monoklonale antistoffer, som binder til og gjør mål inaktive, reduserer CDDO-Me produksjonen av TNF α og resulterende sirkulerende nivåer av TNF α .

- I tillegg har fase 2 genprodukter, som inkluderer antioksidant- og avgiftnings-
 10 enzymer, blitt undersøkt i perifere blod mononukleære celler hos pasienter i Fase I-studien. Signifikant induksjon av NQO1 (NAD(P)H:kinon oksidoreduktase), en markør for fase 2 transkripsjonell aktivitet, har blitt sett ved doser på 10 mg/dag og over.
- 15 Tumorbiopsidata fra flere pasienter, tatt etter to behandlingssykluser med CDDO-Me, indikerte uttalte reduksjoner i tumorvevsnivåer av cyklooksygenase-2 (COX-2), induserbar nitrogenoksidsyntase (iNOS) og fosforylert STAT3 (pSTAT3). Høye ekspresjonsnivåer av hver av disse proteinene er kjent å være korrelert med tumorprogresjon og dårlige kliniske utfall. Tumorbiopsidata i flere pasienter
 20 indikerte også en uttalt grad av tumorcelledød etter to behandlingssykluser med CDDO-Me. Nivåer av serumkreatinin var signifikant lavere på dag 21, sammenlignet med grunnlinjenivået før behandling, i mer enn 80 % av pasientene i denne studien. En rekke pasienter som fortsatte på behandling i multiple sykluser viste løpende reduksjoner i serumkreatinin. Siden serumkreatinin er en
 25 vidt anvendt indikator på renal funksjon, indikerer disse observasjonene at behandling med CDDO-Me forbedrer nyrefunksjon.

Disse studiene gir data i humane cancerpasienter som viser den fordelaktige effekten av CDDO-metylester på pasienter som lider av cancer. Dataene indikerer
 30 videre at CDDO-Me sannsynligvis har klinisk nyttige virkninger i pasienter som lider av andre inflammasjonsrelaterte sykdommer, inkludert renal dysfunksjon.

Eksempel 11 - Storskalaproduksjon av Form B ved å anvende et dimetanolsolvat-intermediat

- Én kilo Form A CDDO-Me ble løst i $60 \pm 5^\circ\text{C}$ metanol for å gi en fullstendig løsning. Den resulterende varme løsningen av CDDO-Me ble satt til en beholder inneholdende kald -5°C til -15°C metanol, mens agitasjon og en temperatur på -5°C til -15°C opprettholdes gjennom hele tilsetningen. Den resulterende
- 5 suspensjonen av krystallinsk dimetanolsolvat av CDDO-Me ble filtrert. Det resulterende faststoff, som viste et XRPD-mønster konsistent med det presentert i figur 26 (før TGIR-analyse), ble tørket i en ovn ved $70 \pm 5^\circ\text{C}$. Tørking ble fortsatt inntil XRPD-profilen ikke viste noen refleksjoner karakteristiske for krystallinsk substans. Det resulterende XRPD amorf CDDO-Me faststoffet ble passert
- 10 gjennom en sikt og pakket. Produktgjenvinning strakk seg fra 65-95 %.

Eksempel 12 - Kryomalt Form A og Form B

- Form A ble kryomalt og analysert. De målte røntgendataene av prøven oppnådd gjennom kryofinmaling (2 timer) viste noen utbredelse i toppen ved omtrent
- 15 $13,5^\circ 2\theta$. PDF-analyse av kryomalt Form A frembragte resultater lignende Form B-analysen. Disse resultatene antyder at den kryomalte Form A er et glassaktig material og at kryofinmaling kan gi en alternativ fremgangsmåte for å fremstille Form B.
- 20 Form B ble kryomalt og analysert. De målte røntgendataene av prøven oppnådd gjennom kryofinmaling (1 time) var lignende det startende Form B-materialet. Disse resultatene antyder at Form B er stabil og ikke endrer form på grunn av kryofinmaling.

Tabell 1 - Prøveinformasjon

PRØVEINFORMASJON	BESKRIVELSE	XRPD-RESULTAT
Umikronisert	Hvitt pulver	A
Mikronisert	-	A

25

Tabell 2 - Approksimative løseligheter av CDDO-metylester

LØSNINGSMIDDEL	LØSELIGHET (mg/ml) ^a
Aceton	70
ACN (acetonitril)	66

LØSNINGSMIDDEL	LØSELIGHET (mg/ml)^a
DCM (diklormetan)	> 194
1,4-dioksan	21
EtOH (etanol)	4
EtOAc (etylacetat)	36
Heksaner	< 1
(10:1) Isopropanol/vann	4
MeOH (metanol)	8
MTBE (tert-butylmetyleter)	4
THF (tetrahydrofuran)	97
Toluen	38
Vann	< 0,1

^a Løseligheter er beregnet basert på det totale løsningsmiddel anvendt for å gi en løsning; faktiske løseligheter kan være større på grunn av volumet av løsningsmiddelene anvendt eller en langsom oppløsningshastighet. Løseligheter er avrundet til nærmeste mg/ml.

Tabell 3 - Krystallasjonseksperimenter med CDDO-metylester

LØSNINGSMIDDEL	BETINGELSER^a	BESKAFFENHET / BESKRIVELSE	XRPD- RESULTAT
Aceton	FE	Hvite store biter	A
	SE	Hvitt knust glass	Form B
(3:10) Aceton/heksaner	SC	Intet faststoff	-
ACN	FE	Hvitt knust glass	A + Form B
	SE	Hvite store biter	A
(7:5) ACN/vann	SC	Små hvite blader	A
DCM	Rotovap	Hvitt knust glass	Form B

LØSNINGSMIDDEL	BETINGELSER ^a	BESKAFFENHET / BESKRIVELSE	XRPD- RESULTAT
	FE	Knust glass	Form B
	SE	Hvitt knust glass	Form B
(1:5) DCM/heksaner	SC	Intet faststoff	-
1,4-Dioksan	FD	Fluffy hvitt faststoff	Form B
EtOH	FE	Hvite store biter	A
	SE	Hvite irregulære	A
	SC	Små hvite tabletter	A
EtOAc	FE	Hvitt knust glass	Form B
	SE	Hvitt knust glass	Form B
	SC	Intet faststoff	-
(10:1) IPA/vann	SC	Små hvite tabletter	A
MeOH	FE	Hvite store biter	A
	SE	Hvite tabletter, irregulære	A
	SC	Pyramidale tabletter	A ^b
MTBE	FE	Hvitt knust glass	Form B
	SE	Hvitt knust glass	Form B
	SC	Intet faststoff	
THF	FE	Hvitt knust glass	Form B
	SE	Hvitt knust glass	Form B
(1:2) THF/heksaner	SC	Intet faststoff	-
Toluen	FE	Hvite store biter	Form B
	SE	Hvitt knust glass	Form B
	SC	Intet faststoff	-
-	Smelte/avkjøle	Klart knust glass	Form B

LØSNINGSMIDDEL	BETINGELSER ^a	BESKAFFENHET / BESKRIVELSE	XRPD- RESULTAT
^a FE = hurtig fordamping, SE = langsom fordamping, SC = langsom avkjøling, temperaturer er omtrentlige, FD = frysetørking, rotovap = rotasjonsinnedamping ^b enkeltkrystallstrukturbestemmelse			

Tabell 4 – Slemmingseksperimenter med CDDO-metylester

LØSNINGSMIDDEL	TID (DAGER)	BESKAFFENHET / BESKRIVELSE	XRPD- RESULTAT
(10:1) IPA/vann	7	Hvite biter	A
MTBE	10	Hvite store biter	A
MeOH	10	Hvite store biter	A

Tabell 5 – Eksperimenter med kald presipitasjon av CDDO-metylester

LØSNINGS- MIDDEL	ANTIØSNINGS- MIDDEL	BESKAFFENHET / BESKRIVELSE	XRPD- RESULTAT
Aceton	Heksaner	Intet faststoff	-
	Vann	Hvitt faststoff	A
DCM	Heksaner	Intet faststoff	-
THF	Vann	Hvitt faststoff	A

5

Tabell 6 - Karakteriseringsdata for Form A

ANALYTISK TEKNIKK	RESULTATER ^a
XRPD	A
DSC	Grunnlinjeforskyvning 157 °C, endoterm 224 °C
TGA	0,3 % vekttap opp til 150 °C
	1,2 % vekttap fra 150 til 210 °C
KF	0,38 %
Varmeobjektbord	28,9: begynnelse på oppvarming

ANALYTISK TEKNIKK	RESULTATER^a
	150,1: -
	176,4: -
	200,2: ingen endringer
	225,9: smelting
	227,9: smeltepunkt
MB	Ubetydelig vektendring gjennom hele eksperimentet
Post MB XRPD	A
SEM ^b	Pyramidaler, tabletter og plater
NMR (CDCl ₃)	Konsistent med struktur
^a alle temperaturer er i °C, endo = endoterm	
^b resultater basert på tatte bilder	

Tabell 7 - Stresstudier av Form A

BETINGELSER^a	BESKAFFENHET / BESKRIVELSE	XRPD-RESULTAT
25 °C/60 % RH		
3 dager: 1,5 % tap	Hvitt pulver	A
7 dager: 0,6 % tap		
40 °C/75 % RH		
3 dager: 1,4 % tap	Hvitt pulver	A
7 dager: 0,2 % økning		
195 °C ^b	Hvitt pulver	A
15 minutter: 2 % tap		
20 min maling, tørking	Hvitt pulver	A
20 min våtmaling, vann	Hvitt pulver	A

Tabell 8 - Karakteriseringsdata for Form B CDDO-metylester

ANALYTISK TEKNIKK	RESULTATER^a
--------------------------	-------------------------------

ANALYTISK TEKNIKK	RESULTATER^a
XRPD	Form B
MDSC	Tg ~125 °C
NMR (CDCl ₃)	Konsistent med struktur

Tabell 9 - Stresstudier av Form B CDDO-metylester

BETINGELSER^a	BESKAFFENHET/BESKRIVELSE	XRPD-RESULTAT^c
22 °C/97 % RH 7 dager	Knust glass	Form B
40 °C/75 % RH 8 dager	Knust glass	Form B
80 °C/0 % RH -24 timer	Hvitt knust glass, klare avrundede store biter	Form B
195 °C ^b 5 minutter	Hvite «fines»	Form B
200 °C ^b 60 minutter	Hvite dobbeltbrytende biter	A + Form B (min)
^a RH = relativ fuktighet, Tg = glasstransisjonstemperatur ^b Omgivelses lab fuktighet ble målt til 74 % RH ^c min = minor		

Tabell 10 - Krystalldata og datainnsamlingsparametere for Form A

Formel	C ₃₂ H ₄₃ NO ₄
formelvekt	505,70
romgruppe	<i>P</i> 43 21 2 (No. 96)
<i>a</i> , Å	14,21620(10)
<i>c</i> , Å	81,5875(12)
<i>V</i> , Å ³	16488,9(3)
<i>Z</i>	24
<i>d</i> _{calc} , g cm ⁻³	1,222
krystalldimensjoner, mm	0,01 x 0,01 x 0,00 ^b
temperatur, K	150.

stråling (bølgelengde, Å)	Mo K _α (0,71073)
monokromator	grafitt
lineær abs koef, mm ⁻¹	0,074
absorpsjonskorreksjon anvendt	empirisk ^a
transmisjonsfaktorer: min, max	0,9995, 0,9999
diffraktometer	Nonius KappaCCD
<i>h</i> , <i>k</i> , <i>l</i> område	-15 til 15 -10 til 10 -86 til 72
2 θ område, deg	4,08-44,43
mosaikitet, deg	0,32
Programmer anvendt	SHELXTL
<i>F</i> ₀₀₀	6576.0
Vekting $1/[\sigma^2(F_o^2)+(0.0176P)^2+0.0000P]$ hvor $P=(F_o^2+2F_c^2)/3$	
data innsamlet	46742
unike data	9168
<i>R</i> _{int}	0,093
data anvendt i raffinering	9168
cutoff brukt i <i>R</i> -faktorberegninger	$F_o^2 > 2,0\sigma(F_o^2)$
data med $I > 2.0\sigma(I)$	5421
antall variable	1024
største forskyvning/esd i sluttssyklus	0,00
<i>R</i> (<i>F</i> _o)	0,051
<i>R</i> _w (<i>F</i> _o ²)	0,085
Tilpasningsgodhet	1,045
^a Otwinowski Z. & Minor, W. Methods Enzymol., 1997, 276, 307.	
^b Krystalldimensjonene er omtrentlige	

Tabell 11 – Oppsummering av arealet under plasmakonsentrasjonskurven (AUC) versus tid i alle studerte dyr (n=8)

CDDO-METYLESTER FORMULERINGSSTUDIE - OPPHAVSFORBINDELSE			
Ape individ #	Form A AUC (ng/ml*hr)	Form B AUC (ng/ml*hr)	% Form B over Form A
501M	37,5	203,4	542
502M	28,3	204,7	723
503F	21,3	107,3	504
504F	N/A	175	N/A
505M	60,4	158,3	262
506M	N/A	N/A	N/A
507F	57,3	164	286
508F	37,3	228	611
Middel	40,4	177,2	439
Median	37,4	175.0	523
Område (min-max)	21 - 60,4	158 - 228	262 – 723 %
N/A - ikke bestemt.			

5 Tabell 12 - Krystalliseringseksperimenter med CDDO-metylester.

LØSNINGSMIDDEL	BETINGELSER^a	BESKRIVELSE	XRPD-RESULTAT
10:1 Benzen/acetone	RE, romtemperatur	Hvitt faststoff	Røntgen amorf
10:1 Benzen/acetone	FE etterfulgt av tørking ved 60 °C	Klar gel	-
10:1 Benzen/acetone	FE m/ kapillarrør	Clear film	-

LØSNINGSMIDDEL	BETINGELSER ^a	BESKRIVELSE	XRPD-RESULTAT
10:1 Benzen/acetone	FE, forsynt med lokk og puttet i en fryser natten over, ripet glasset ved å bruke en metallspatel og hensatt for å fordampe ved romtemperatur	Hvitt faststoff	Benzen-solvat
10:1 Benzen/acetone	FE, forsynt med lokk og stående ved romtemperatur natten over, ripet glasset ved å bruke en metallspatel og hensatt for å fordampe ved romtemperatur	Hvitt faststoff	Benzen-solvat
10:1 Benzen/acetone	FE m/ sonikering	Hvitt faststoff	Benzen-solvat
^a RE = rotasjonsinndamping, FE = hurtig fordamping			

Tabell 13 - Karakterisering av CDDO-metylester-hemibenzensolvat

ANALYTISK TEKNIKK	RESULTATER
XRPD	Hemibenzensolvat
	Endoterm 133 °C
DSC, 10 °C/min	Endoterm 223 °C (begynnelse 221 °C)
	7,0 % vekttap opp til 160 °C
TG, 10 °C/min	Tilsvarende 0,5 mol benzen
	Konsistent med struktur
¹ H NMR (CDCl ₃)	~0,5 mol benzen tydelig

Tabell 14 - Karakterisering av CDDO-metylester-dimetanolsolvat

ANALYTISK TEKNIKK	RESULTATER
XRPD	Dimetanolsolvat

ANALYTISK TEKNIKK		RESULTATER
		Endoterm 102 °C
		Grunnlinjeforskyvning ved 130 °C
		Bred eksoterm 203 °C
DSC, 10 °C/min	Endoterm 225 °C (begynnelse: 223 °C)	
		11 % vekttap opp til 110 °C
TG, 10 °C/min		Tilsvaret ~2,0 mol metanol
		9,8 % vekttap opp til 110 °C
		Tilsvaret ~1,7 mol metanol
TGIR, 20 °C/min	Flyktig komponent identifisert som metanol	
Post TGIR		
XRPD	Røntgenamorf	
IR	Konsistent med struktur	
		Konsistent med struktur
¹ H NMR (CDCl ₃)	~1,7 mol metanol tydelig	

Tabell 15 – Stresstudier av mikronisert Form B CDDO-metylester

Stress-betingelser ^a	FORM B FREMSTILT VIA EKSEMPEL 11- PROSEDYRE		FORM B FREMSTILT VED ISOLERING FRA ETYLACETAT OG ETANOLBLANDINGER	
	XRPD- resultat	KF- resultat	XRPD-resultat	KF-resultat
80 °C/P ₂ O ₅ , 14 d	Form B	NP	NP	NP
80 °C/P ₂ O ₅ , 28 d	Form B	1,10	100 % Form A	0,37
60 °C/23 % RH, 28 d	Form B	0.04	- 50% Form A + Form B	0.02

	FORM B FREMSTILT VIA EKSEMPEL 11- PROSEDYRE		FORM B FREMSTILT VED ISOLERING FRA ETYLACETAT OG ETANOLBLANDINGER	
Stress- betingelser^a	XRPD- resultat	KF- resultat	XRPD-resultat	KF-resultat
40 °C/48 % RH, 28 d	Form B	0.00 ^b	Form B	0,39
25 °C/75 % RH, 14 d	Form B	NP	NP	NP
25 °C/75 % RH, 28 d	Form B	0,77	Form B	0,58
^a RH = relativ fuktighet				
^b Faktisk verdi var negativ				

Tabell 16 - CDDO-Me enkeltmiddel anticanceraktivitet

MODELL	MIDDEL/RUTE	LEGEMIDDEL- AKTIVITET	KOMMENTARER
NCI-H460 Lungecancer- xenograft (naken rotte)	CDDO-Me, p.o.	78 % TGI ¹	Doseavhengige effekter. CDDO- Me like effektiv som stråling
MCF-7/Her-2 Brystcancer- xenograft (naken mus)	CDDO-Me, i.v.	15 % regresjon	Utmerkede resultater opp- nådd i tumorer som overuttrykker Her-2 ^a
4T1 Syngeneic Brystcancer metastasemodell (mus) - tidlig behandling	CDDO-Me, i.v.	100 % supresjon	Alle dyr forble tumorfrie ved avliving på dag 85 ^b
4T1 Syngeneic Brystcancer	CDDO-Me, i.v.	67 % supresjon	33 % av dyr

MODELL	MIDDEL/RUTE	LEGEMIDDEL-AKTIVITET	KOMMENTARER
metastasemodell (mus) - forsinket behandling			tumorfrie ved avliving på dag 95 ²
L3,6PL Pankreatisk cancer- xenograft (naken mus)	CDDO-Me, i.v.	51 % TGI	CDDO-Me bedre enn Gemcitabin
DU-145 Prostatacancer- xenograft (naken rotte)	CDDO-Me, p.o.	77 % TGI	Multiple tidsplaner testet - TGI 60-77 %
¹ TGI=Tumorveksthemming			
Data presentert er fra doser ved eller under MTD (definert som ≤10 % mortalitet og ≤20 % vekttap).			

Tabell 20 – Løsninger fremstilt for spraytørring

FASTSTOFF-FORHOLD	40 % Form B, 60 % polymer	60 % Form B, 40 % polymer
POLYMER	Metakrylsyrekopolymer Type C	HPMCP HP-55
LØSNINGSMIDDEL	Aceton	Aceton
KONS. % vekt/vekt	10	10
TEMPERATUR °C	-20	-20
OBSERVASJONER	Løsning viste noe uklarhet endrer polymerens ladning. En prøve av løsningen ble varmet opp til 35/40 °C, men uklarheten forsvant ikke og noe flokkulering ble observert.	Løsningen ble helt klar etter ladningen av polymeren. De to kjøringene gjort brukte løsningen på den samme dagen den ble fremstilt.
^a Konopleva, et al., "Synthetic triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-		

FASTSTOFF-FORHOLD	40 % Form B, 60 % polymer	60 % Form B, 40 % polymer
28-oic acid induces growth arrest in HER2-overexpressing breast cancer cells," Mol Cancer Ther. 2006, 5: 317-28. ^b Ling, et al., "The novel triterpenoid C-28 methyl ester of 2-cyano-3,12-dioxoolen-1,9-dien-28-oic acid inhibits metastatic murine breast tumor growth through inactivation of STAT3 signaling," Cancer Res. 2007, 67: 4210-8.		

Tabell 21 - Karakteristika for testede formuleringer

Polymer	Metakrylsyrekopolymer, Type C	HPMCP HP-55
Tester		
Beskrivelse	Hvitt faststoff	Hvitt faststoff
Røntgenpulverdiffraksjon	Ingen krystallinsk topp detektert	Ingen krystallinsk topp detektert
Vann	1,50 % vekt/vekt	-
DSC - Tg (infleksjons-punkt)	106 °C	118 °C
Assay (ved HPLC)	409 % vekt/vekt (beregnet på den vannfrie og løsningsmiddel-frie basis)	59,4 % vekt/vekt (beregnet på den vannfrie og løsningsmiddelfrie basis)
Totalt urenheter (HPLC)ti	1,14 % areal	0,42 % areal
Partikkelstørrelse (D50)	21 pm	
Romdensitet	0,18 g/cm ³ (beregnet med 4 g produkt)	0,19 g/cm ³ (beregnet med 4 g produkt)

Tabell 22 - Midlere konsentrasjoner av CDDO-Me i Plasma fra Cynomolgus-aper i

Midlere konsentrasjoner av CDDO-metylester (ng/ml)						
Tid	PO Form A (nano- krystallinsk)	PO Form B (mikronisert)	PO Form A (krystallinsk mikronisert)	PO Form B (PVP/VA)	PO Form B (HPMCP)	PO Form B (Eudragit L100-55)
Pre-dose	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
5 min	NST	NST	NST	NST	NST	NST
10 min	NST	NST	NST	NST	NST	NST
15 min	NST	NST	NST	NST	NST	NST
30 min	NST	NST	NST	NST	NST	NST
1 h	$1,53 \pm 1,49$	$6,01 \pm 5,67$	$0,619 \pm 0,207$	$9,45 \pm 3,64$	$9,94 \pm 4,83$	$9,06 \pm 4,38$
2 h	$3,00 \pm 2,02$	$14,5 \pm 9,63$	$0,505 \pm 0,260$	$14,8 \pm 3,04$	$24,1 \pm 13,2$	$22,2 \pm 11,7$
4 h	$3,52 \pm 1,30$	$32,0 \pm 11,6$	$1,15 \pm 0,73$	$27,3 \pm 3,79$	$50,7 \pm 10,0$	$50,6 \pm 19,3$
8 h	$8,56 \pm 2,32$	$33,3 \pm 8,44$	$4,31 \pm 1,35$	$30,4 \pm 10,8$	$40,0 \pm 15,6$	$51,1 \pm 8,72$
16 h	$7,90 \pm 2,26$	$14,2 \pm 5,68$	$5,39 \pm 1,12$	$13,3 \pm 3,92$	$15,4 \pm 7,41$	$25,6 \pm 13,9$
24 h	$4,40 \pm 2,33$	$5,23 \pm 1,86$	$3,05 \pm 1,42$	$6,39 \pm 2,02$	$5,79 \pm 2,95$	$7,47 \pm 4,10$
36 h	NST	NST	NST	NST	NST	NST
48 h	$0,649 \pm 0,342$	$0,576 \pm 0,175$	$0,419 \pm 0,291$	$1,78 \pm 1,61$	$0,983 \pm 0,343$	$1,37 \pm 0,626$

Midlere konsentrasjoner av CDDO-metylester (ng/ml)						
Tid	PO Form A (nano- krystallinsk)	PO Form B (mikronisert)	PO Form A (krystallinsk mikronisert)	PO Form B (PVP/VA)	PO Form B (HPMCP)	PO Form B (Eudragit L100-55)
72 h	<i>0,312 ± 0,390</i>	<i>0,408 ± 0,368</i>	<i>0,0169 ± 0,0252</i>	<i>0,395 ± 0,319</i>	<i>0,448 ± 0,283</i>	<i>0,344 ± 0,461</i>
NST Ingen prøve tatt.			IV Intravenøs administrasjon.			
BLQ Under grense for kvantifisering (1,00 ng/ml).			PO Oral administrasjon med kapsel.			
Verdier i fet kursiv beregnet ved å anvende alle verdier presentert i appendiks 3, følgelig kan gjennomsnittet skille seg fra gjennomsnitt beregnet der verdier som er BLQ er antatt å være null.						

SITERTE PUBLIKASJONER

- 1 Sheldrick, G. M. SHELX97, A PROGRAM FOR CRYSTALL STRUCTURE
REFINEMENT, University of Gottingen, Germany (1997).
- 5 2. Otwinowski, Z.; Minor, W. Methods Enzymol. 1997, 276, 307.
3. Bruker, XPREP in SHELXTL v. 6.12., Bruker AXS Inc., Madison, WI
(2002).
4. Bruno, et al., Acta Crystallogr. 2002, B58, 389
5. INTERNATIONAL TABLES FOR CRYSTALLOGRAPHY, Vol. C, Tables 4.2.6.8
10 and 6.1.1.4, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands
(1992).
6. Kraus, W., og G. Nolze, POWDERCELL FOR WINDOWS VERSION 2.3,
Federal Institute for Materials Research and Testing, Berlin (1999).
7. Johnson, C. K. ORTEPIII, Report ORNL-6895, Oak Ridge National
15 Laboratory, TN, U.S.A. 1996.
8. Watkin, D. J.; Prout, C .K.; Pearce, L. J. Cameron, CHEMICAL
CRYSTALLOGRAPHY LABORATORY, University of Oxford, Oxford, 1996.
9. OPTEP-3 for Windows V1.05,. Farrugia, L.J., J. Appl. Cryst. 1997, 30,
565.
- 20 10. Bore, et al., Acta Cryst. 2002, C,58, o199-o200.
11. Honda, et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 1997, 7, 1623.
12. Honda, et al., *loc. cit.* **1998**, 8, 2711-14.
13. Honda, et al., J. Med. Chem. 2000, 43, 1866.
14. Honda, *et al.*, *loc. cit.*, 4233.
- 25 15. Honda, et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2002, 12, 1027.
16. Zhou, et al., J. Pharmaceutical Sciences 2002, 91, 1863.
17. Cui et al., Int'l J. Pharmaceutics, 2007 339, 3-18.
18. Repka et al., Hot-melt extrusion technology In: ENCLOPEDIA OF
PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY, 2. utg (Marcel Dekker, 2002), s. 203-06.

Patentkrav

- 1.** Glassaktig fast form av CDDO-metylester, som har et røntgenpulver-diffraksjonsmønster med en halo-topp ved omtrent $13,5^\circ 2\theta$, som vist i figur 2C, 5 og en T_g .
- 2.** Dimetanolsolvatform av CDDO-metylester, som har et røntgenpulver-diffraksjonsmønster med karakteristiske topper som vist i tabell 18 og et DSC-mønster som vist i figur 24. 10
- 3.** Farmasøytisk sammensetning i fast doseringsform, omfattende (i) en terapeutisk effektiv mengde av den glassaktige faste form av CDDO-metylester ifølge krav 1 med (ii) en spiselig bærer.
- 4.** Fremgangsmåte for fremstilling av den glassaktige faste form av CDDO-metylester ifølge krav 1, omfattende (a) fremstilling av en dimetanolsolvatform av CDDO-metylester, som har et røntgenpulverdiffraksjonsmønster med karakteristiske topper som vist i tabell 18 og et DSC-mønster som vist i figur 24, og (b) tørking av dimetanolsolvatformen for å oppnå nevnte glassaktige faste 15 20 form.
- 5.** Glassaktig fast form av CDDO-metylester ifølge krav 1, som har et PDF-spektrum med de karakteristiske toppene i figur 28 fra omkring 5 Å til omkring 20 Å. 25
- 6.** Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 3 for anvendelse i behandling av en cancertilstand.
- 7.** Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 6, ytterligere omfattende et annet 30 anticancerlegemiddel.
- 8.** Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 7, hvori det andre anticancer-legemidlet er gemcitabin og cancertilstanden er pankreascancer.

9. Glassaktig fast form av CDDO-metylester ifølge krav 1, som har en T_g -verdi i området fra omkring 120 °C til omkring 135 °C.

10. Glassaktig fast form av CDDO-metylester ifølge krav 1, som har en T_g -verdi i området fra omkring 125 °C til omkring 130 °C.

11. Farmasøytisk sammensetning omfattende (i) en terapeutisk effektiv mengde CDDO-metylester og (ii) en eksipiens som er en glassdanner, slik at sammensetningen har en T_g .

10

12. Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 11, hvori eksipiensen er valgt fra gruppen bestående av (A) et karbohydrat, karbohydratderivat eller karbohydratpolymer, (B) en syntetisk organisk polymer, (C) et organisk syresalt, (D) et protein, polypeptid eller peptid og (E) er høymolekylært polysakkarid.

15

13. Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 12, hvori eksipiensen er en syntetisk organisk polymer.

14. Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 13, hvori eksipiensen er valgt fra gruppen bestående av en hydrokspropylmetylcellulose, en poly[1-(2-okso-1-pyrrolidiny)etylen eller kopolymer derav og en metakrylsyrekopolymer.

20

15. Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 14, hvori eksipiensen er hydrokspropylmetylcellulose-ftalatester.

25

16. Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 14, hvori eksipiensen er PVP/VA.

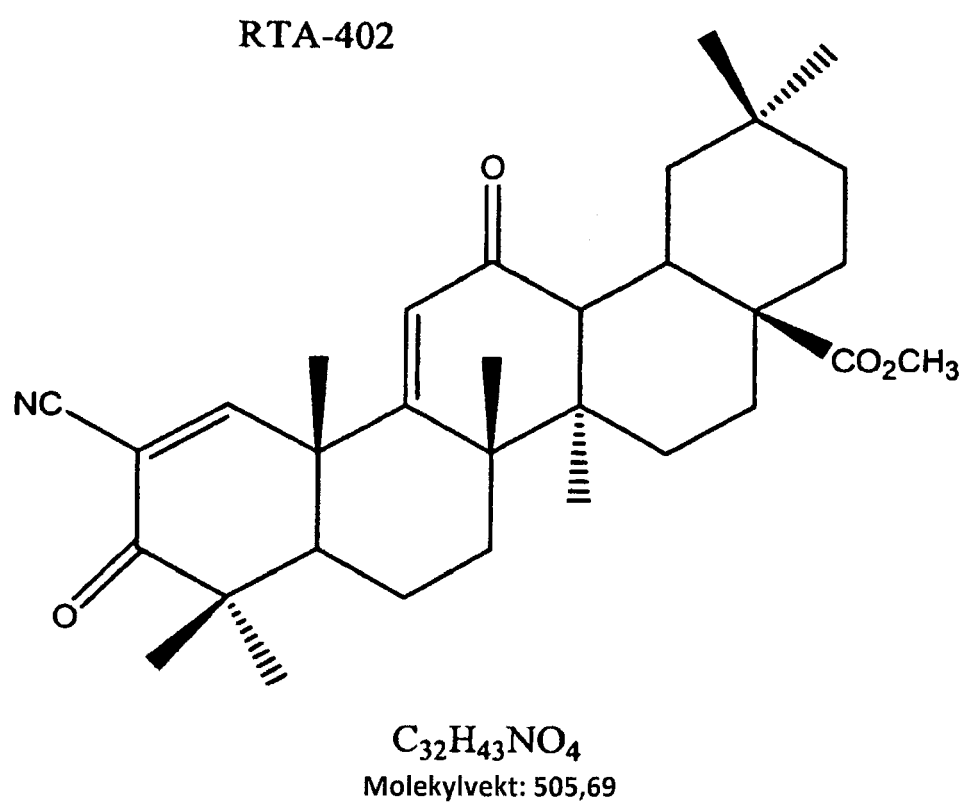
17. Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 14, hvori eksipiensen er metakrylsyre-etylakrylatkopolymer (1:1).

30

18. Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 13, hvori eksipiensen er kopovidon.

1/25

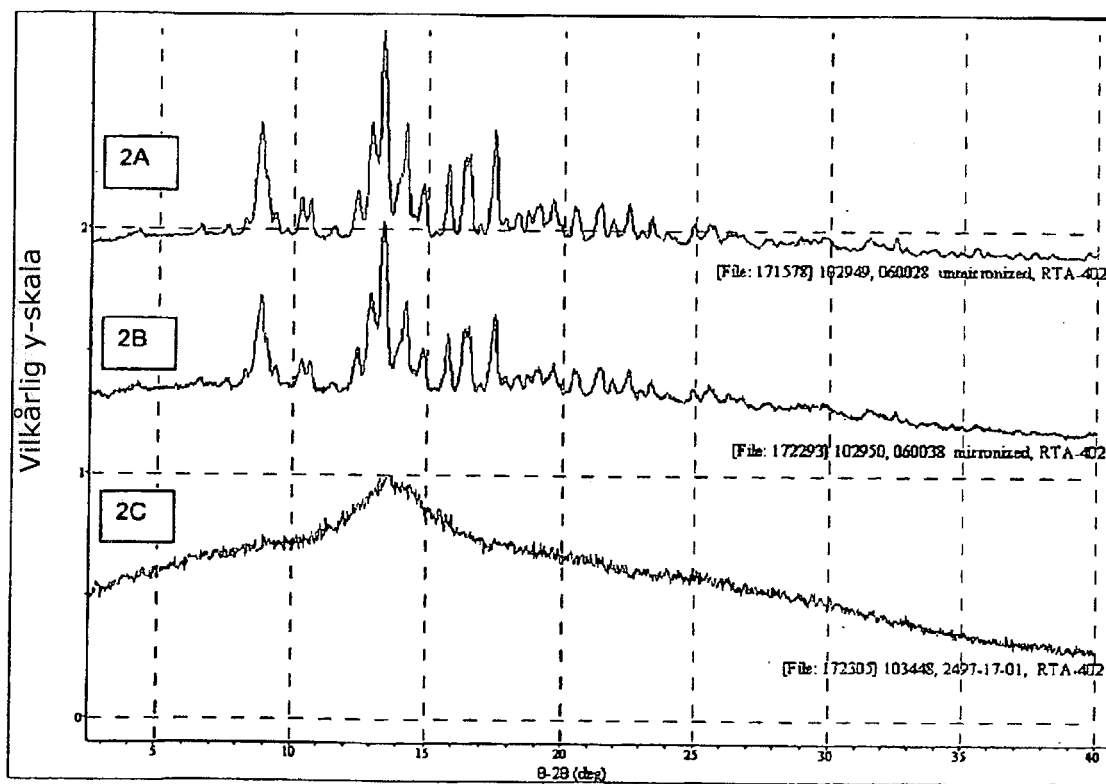
Figur 1 - Kjemisk struktur av CDDO metylester



2/25

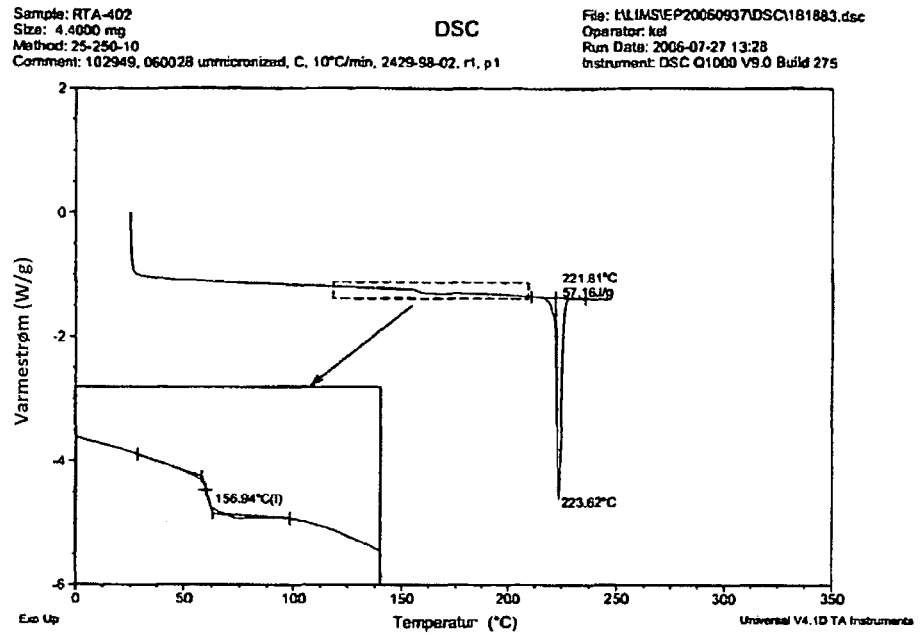
Figur 2 -XRPD-mønster av Form A (topp) og Form B (bunn)

Fra topp til bunn: umikronisert Form A (2A), mikronisert Form A (2B), og Form B (2C)



3/25

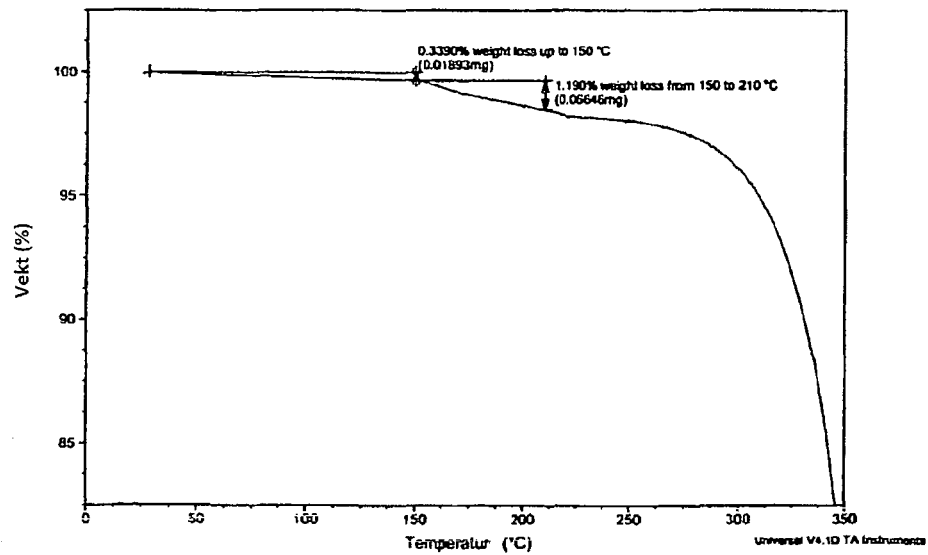
Figur 3 - DSC og TG-kurve for CDDO-metylester



Sample: RTA-402
Size: 5.5850 mg
Method: 25-350-10
Comment: 102949, 060028 unmicronized, 10°C/min, p1

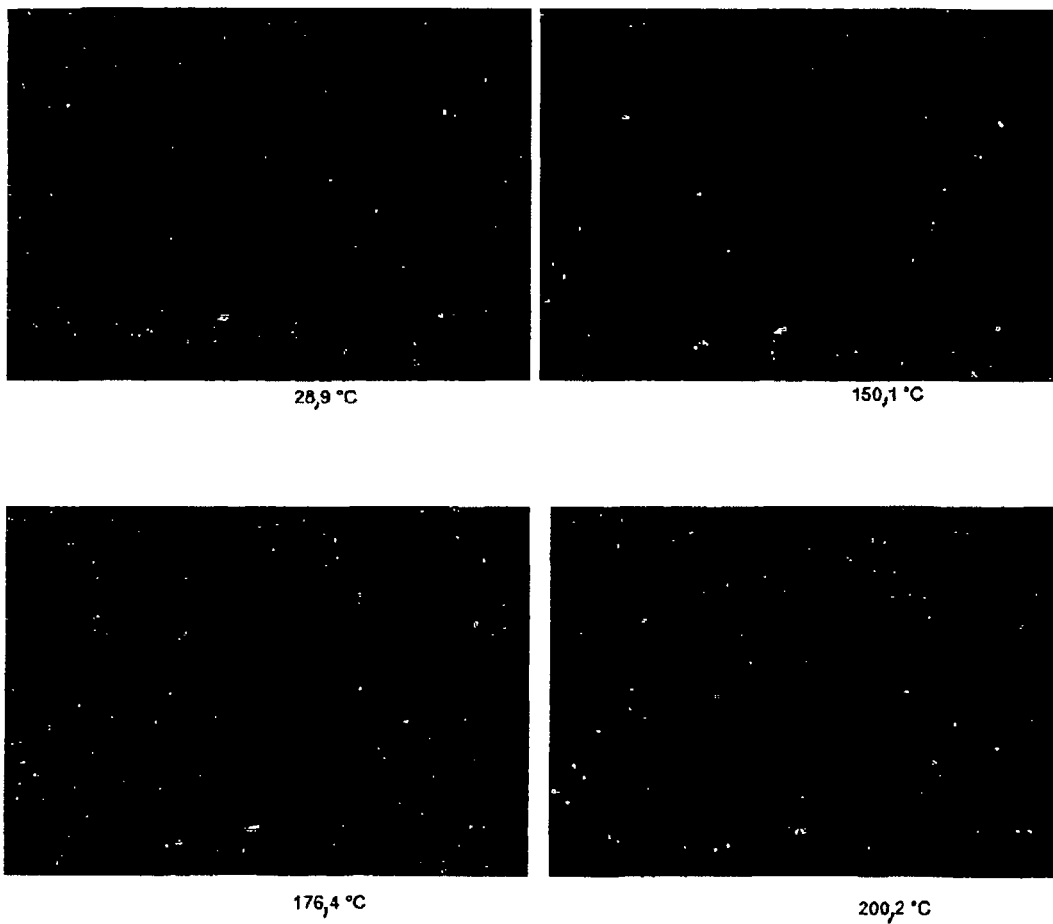
TGA

File: I:\LIMS\IEP20060937\TGA\172251.tga
Operator: KEL
Run Date: 27-Jul-2006 15:32
Instrument: AutoTGA 2950 V5.4A

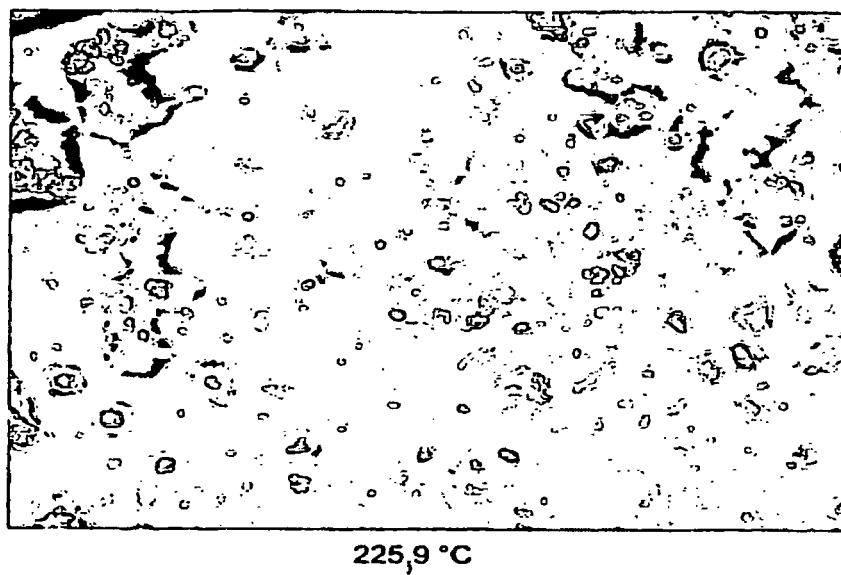


4/25

Figur 4 - Varmeobjektbordsanalyse av Form A - umikronisert

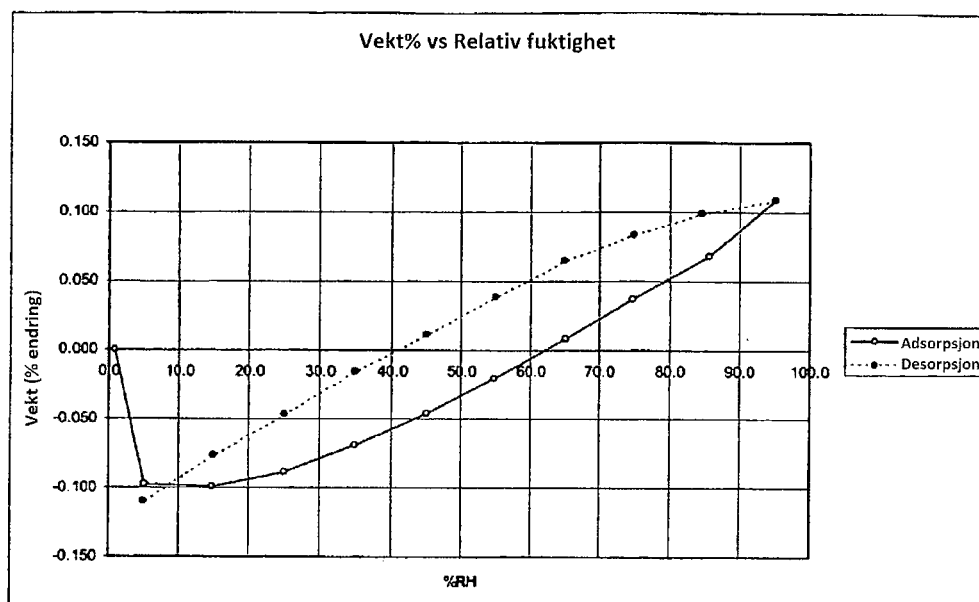


Figur 4 (fortsatt) Varmeobjektbordsanalyse av Form A - umikronisert

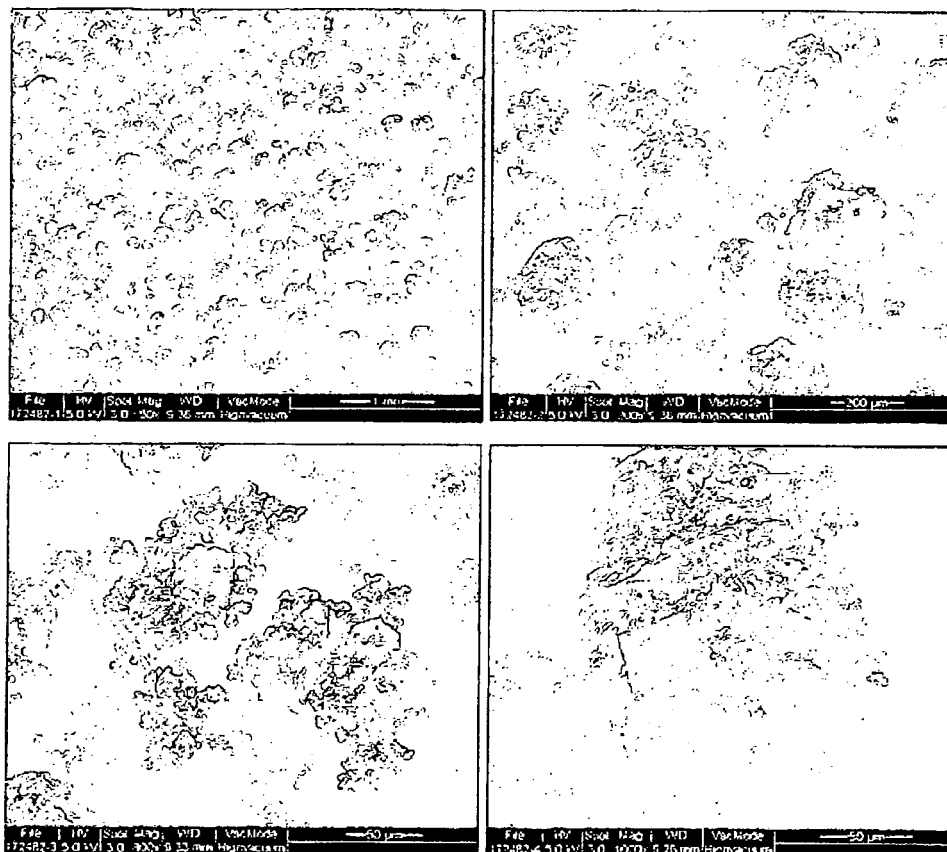


5/25

Figur 5 -Dynamisk damporspsjonsisoterm av Form A umikronisert

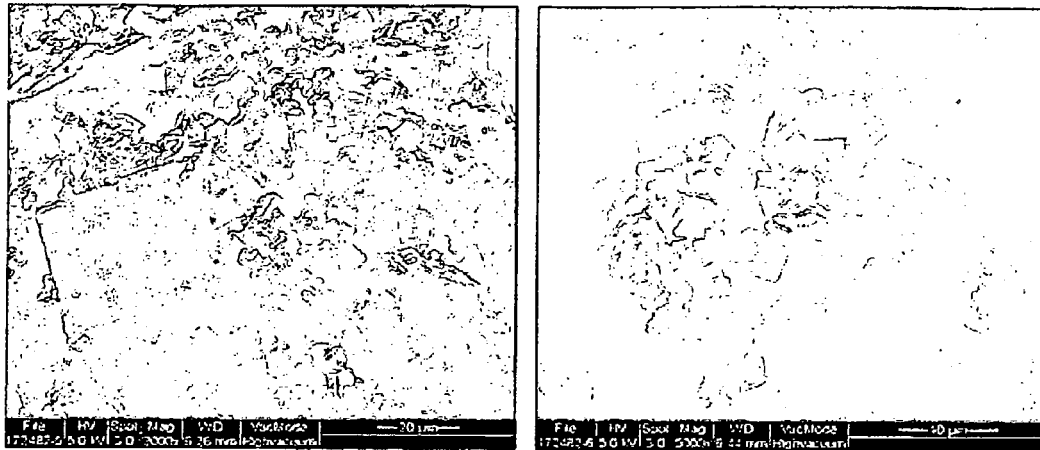


Figur 6 - SEM-bilder av Form A - umikronisert

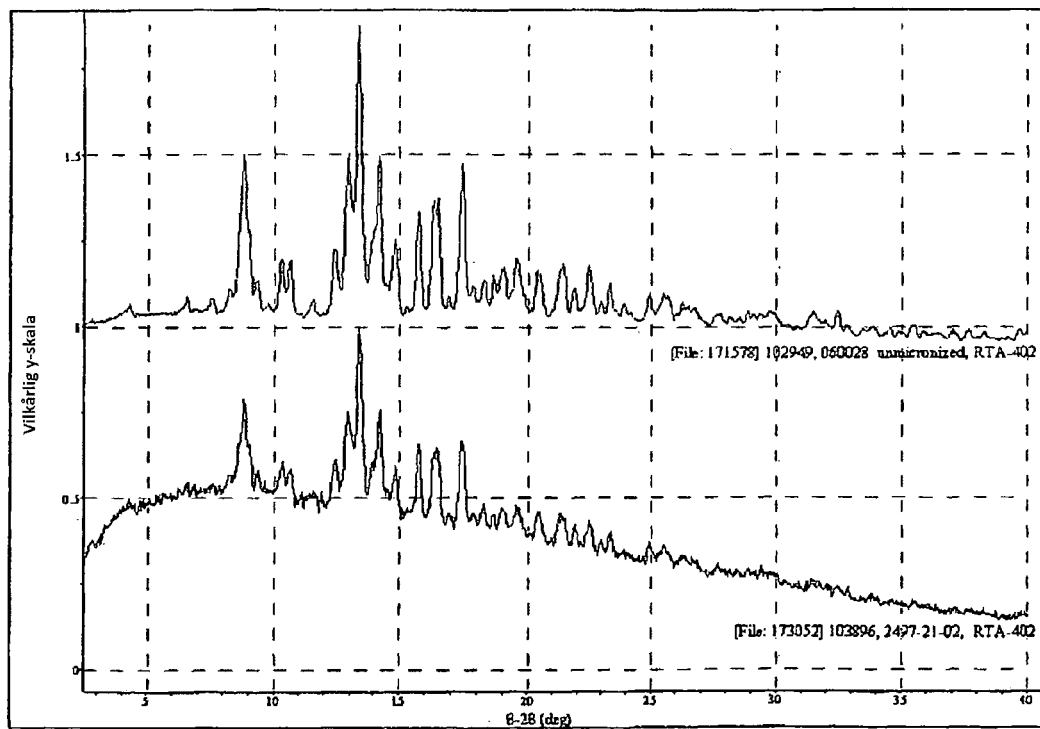


6/25

Figur 6 (fortsett) SEM-bilder av Form A - umikronisert

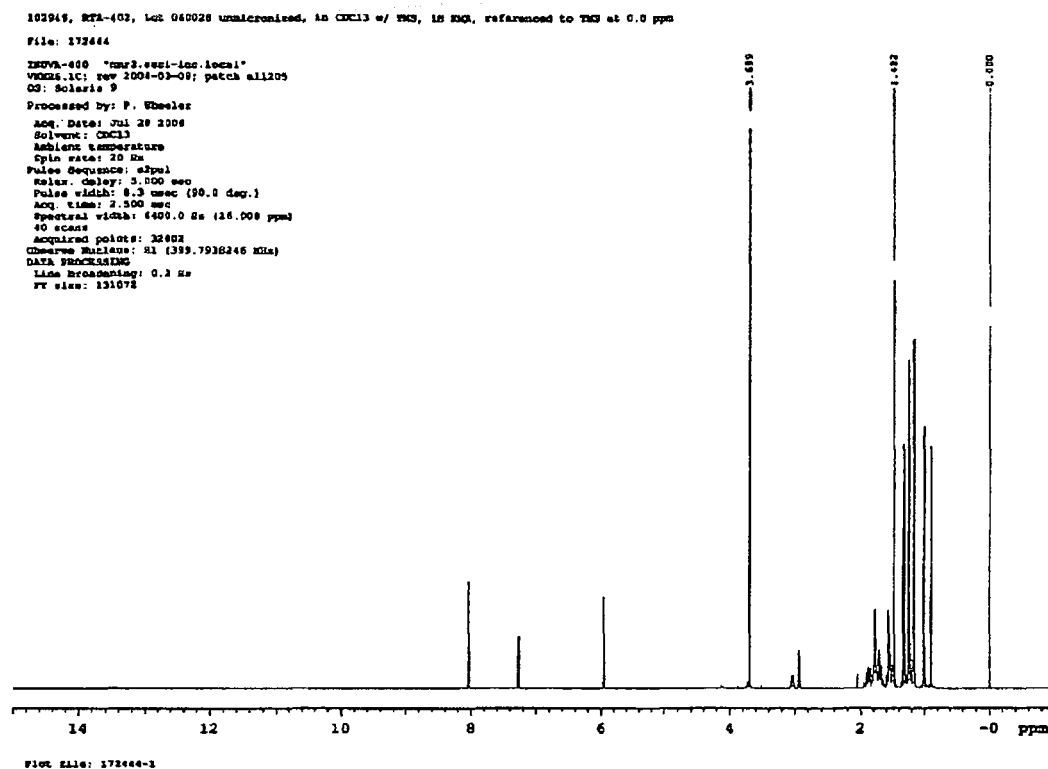


Figur 7 – Form A før (topp) og etter (bunn) stress ved 195 °C.



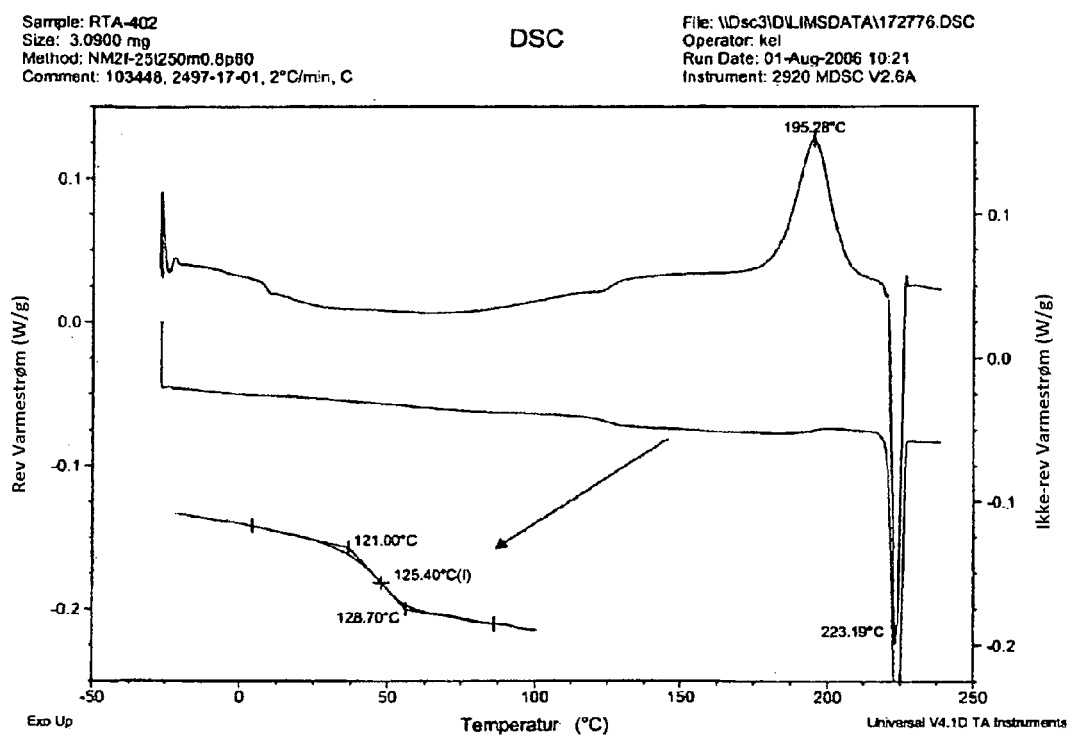
7/25

Figur 8 – NMR-spektrum af Form A-umikroniseret



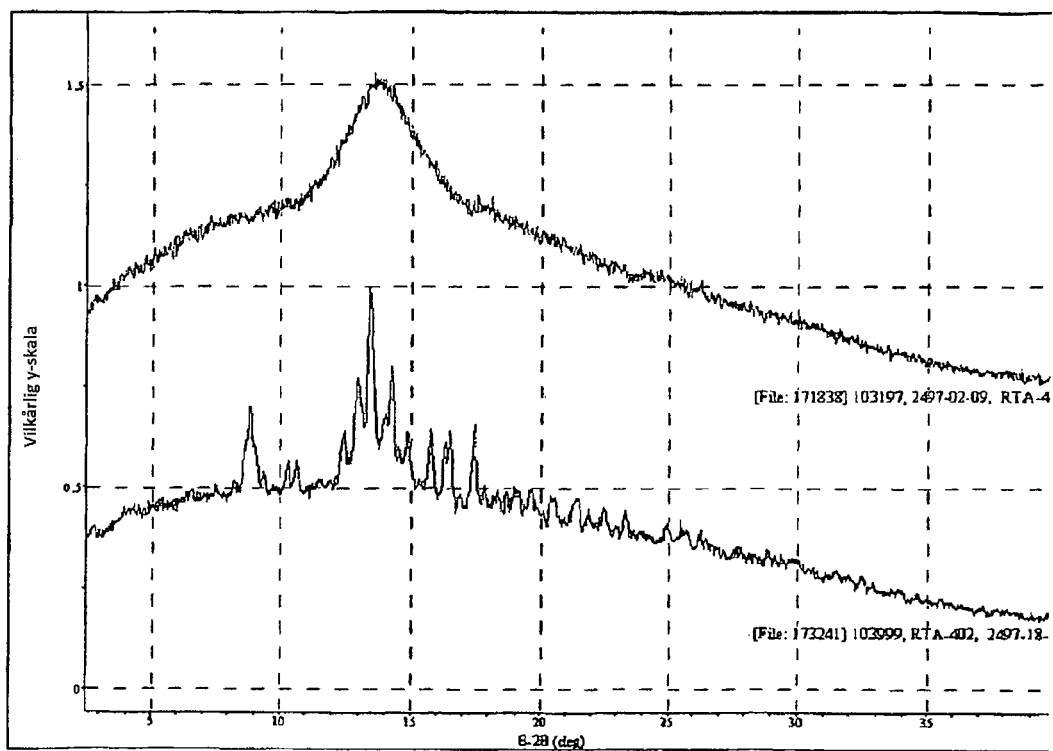
8/25

Figur10 – Form B CDDO-metylester før (topp) og etter (bunn) stress



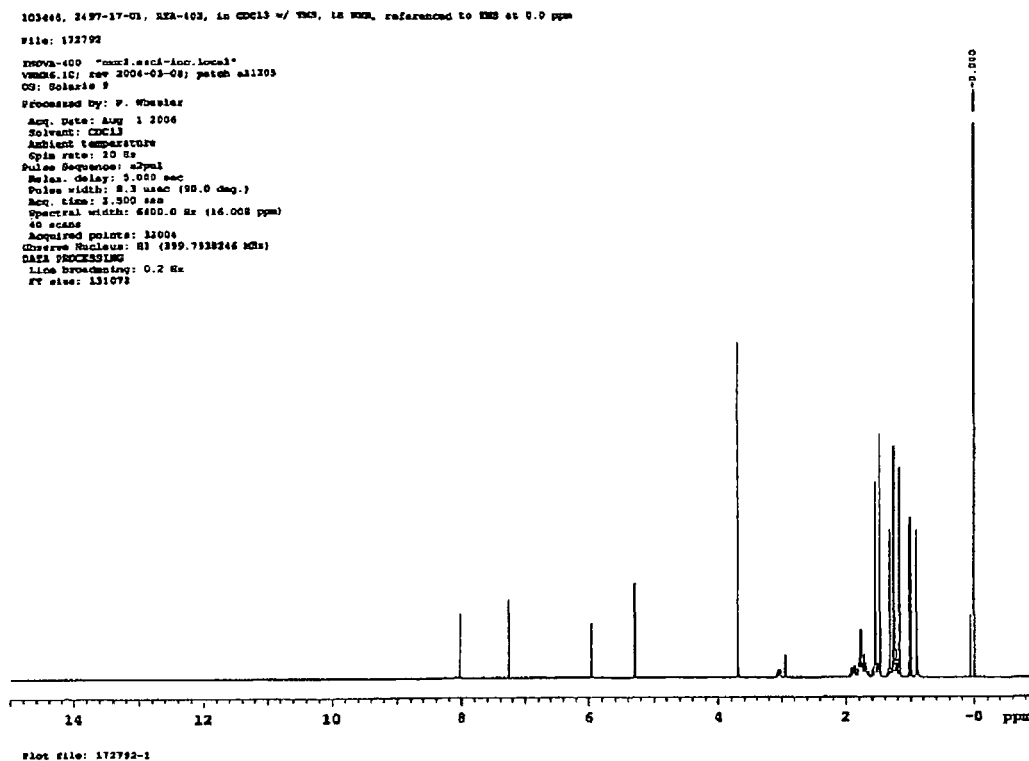
9/25

Figur 10 - Form B CDDO-metylester før (topp) og efter (bunn) stress

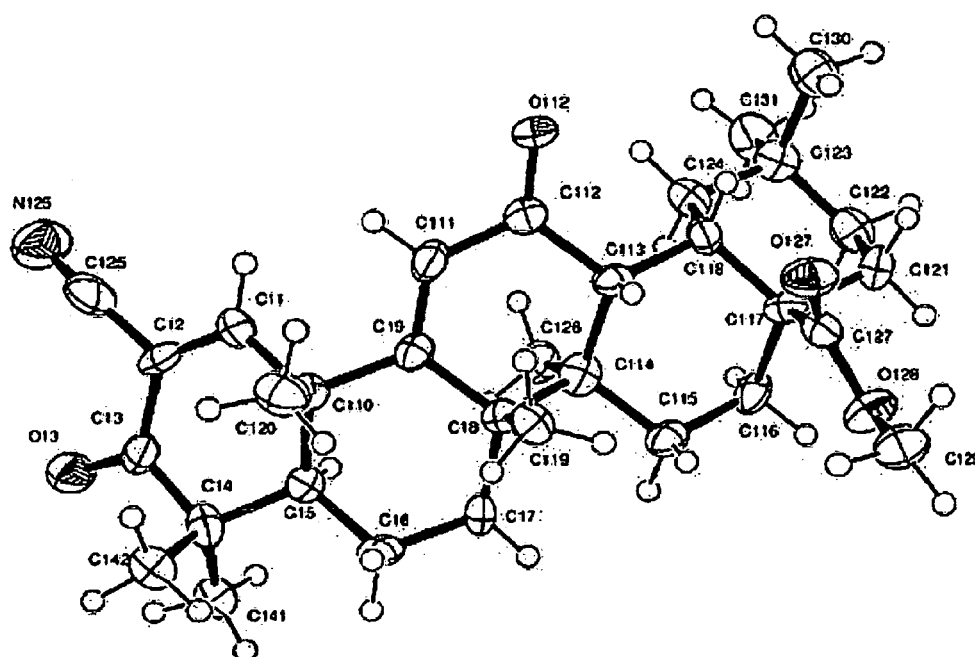


10/25

Figur 11 - NMR-spektrum av Form B CDDO-metylester

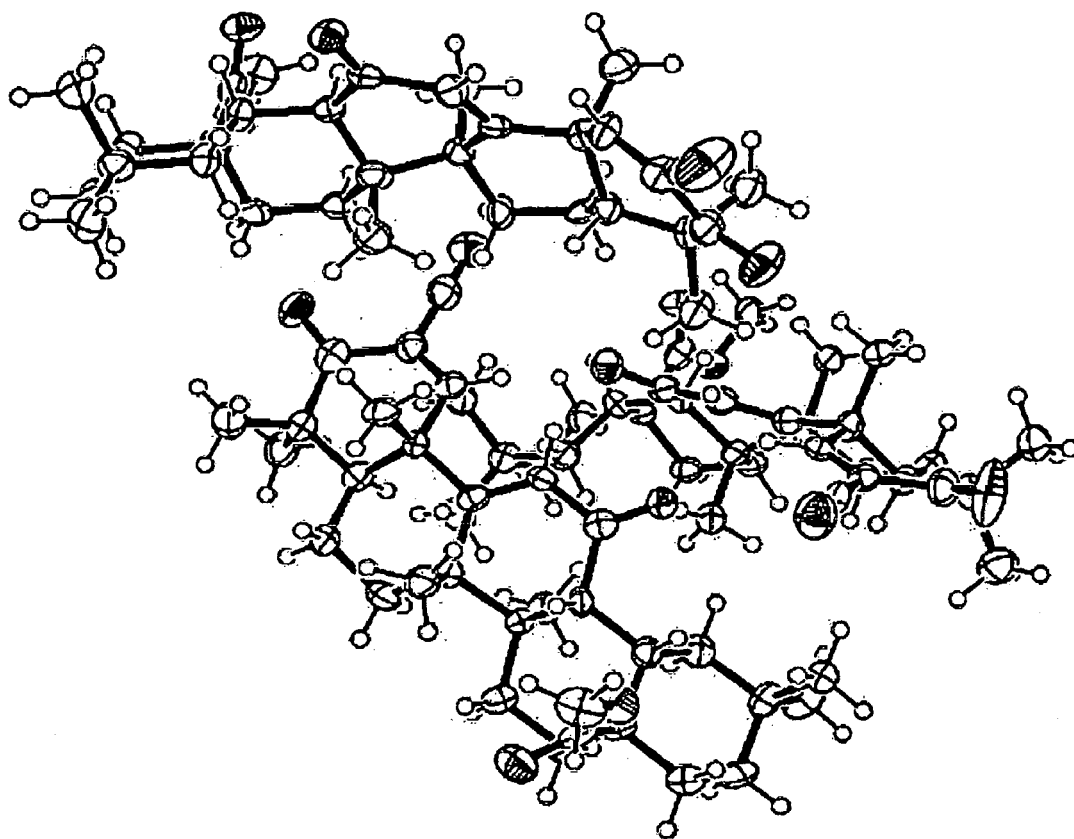


Figur 12 – ORTEP-tegning av et enkelt CDDO-metylester-molekyl med merkning. Atomer er representert ved 50 % sannsynlighet anisotropiske termiske ellipsoider.



11/25

Figur 13 - ORTEP-tegning av innholdet i den asymmetriske enheten av Form A-krystaller. Atomer er representert ved 50% sannsynlighet anisotropiske termiske ellipsoider.



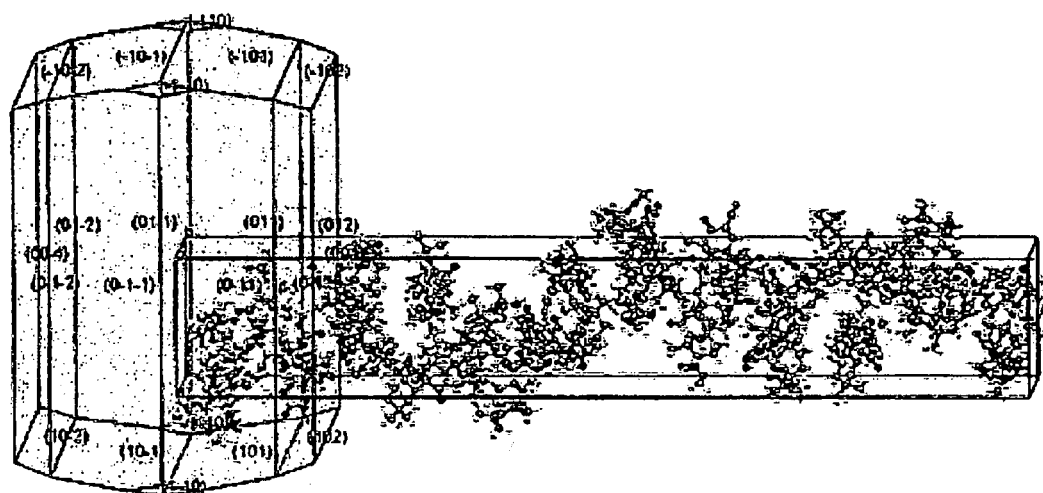
12/25

Figur 14 - Pakningsdiagram av Form A-krystaller sett ned den krystallografiske a-aksen



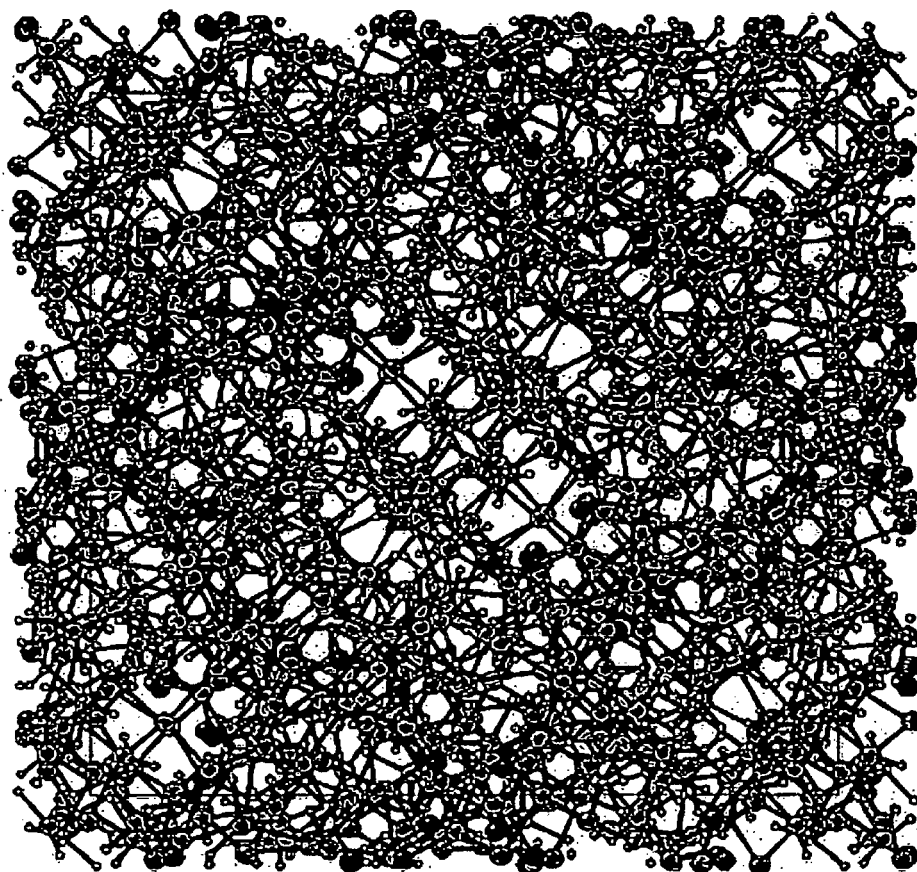
13/25

Figur 15 - Pakningsdiagram av Form A-krystaller sett ned den krystallografiske b-aksen



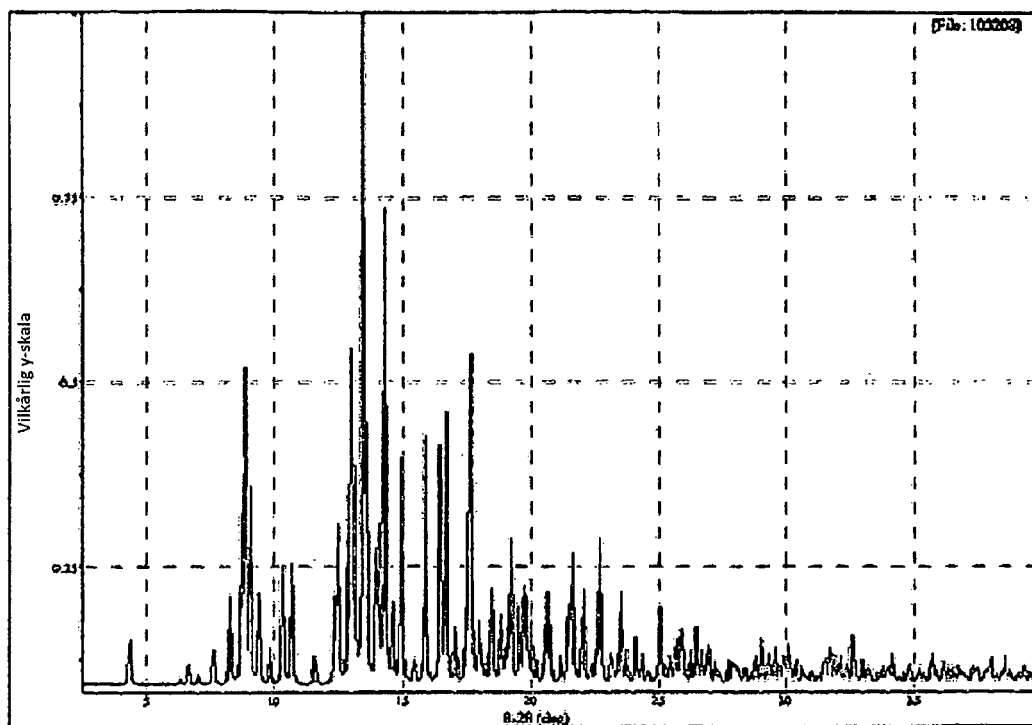
14/25

Figur 16 - Pakningsdiagram av Form A-krystaller sett ned den krystallografiske c-aksen

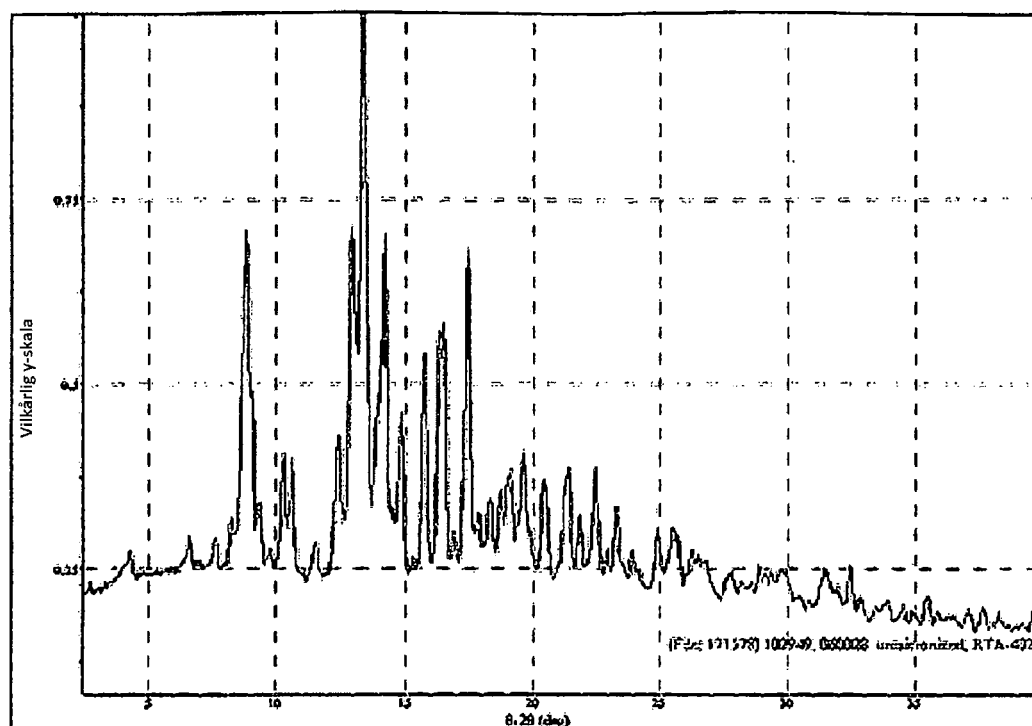


15/25

Figur 17 - Beregnet røtgenpulvermønster av Form A

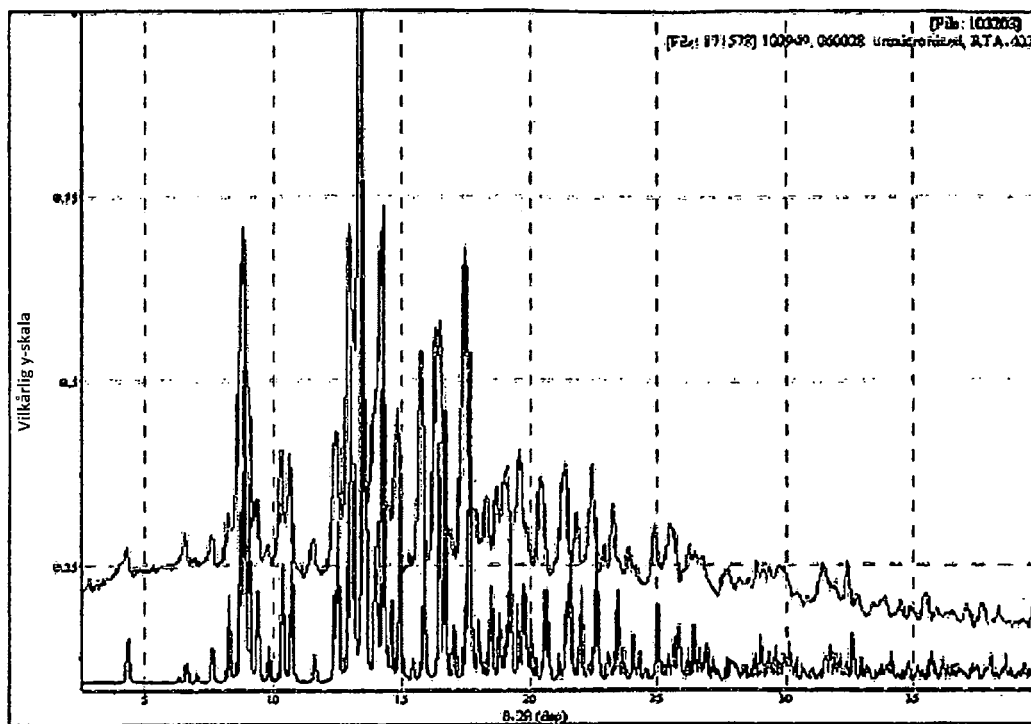


Figur 18 - Eksperimentelt XRPD av Form A



16/25

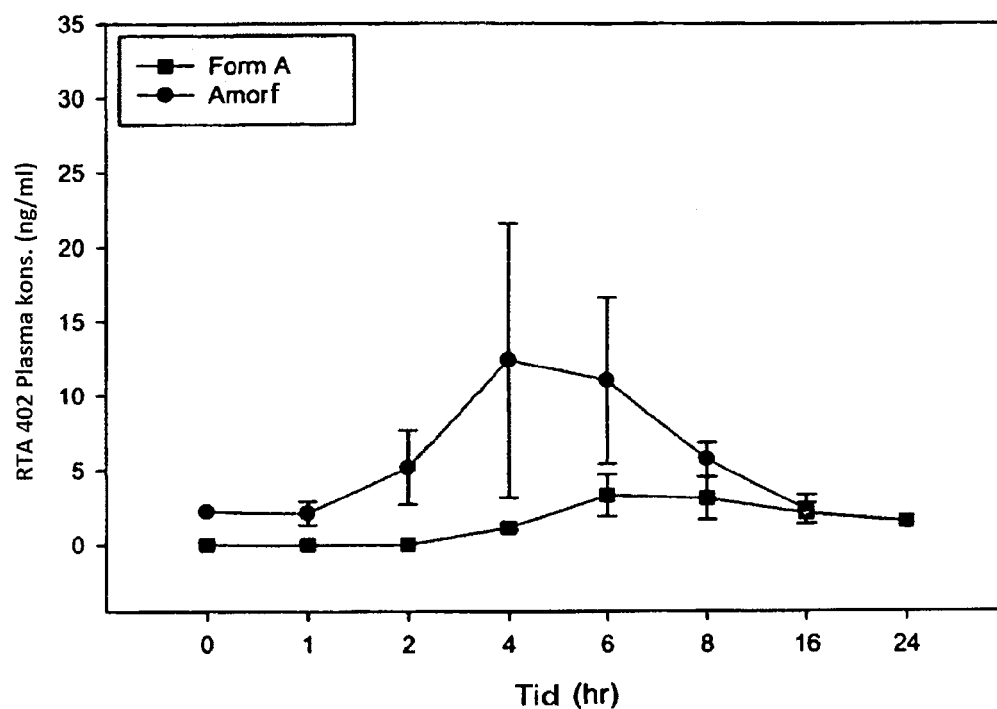
Figur 19 - Sammenligning av de beregnede og eksperimentelle XRPD-mønstre til CDDO-metylester med XRPD-mønsteret til CDDO-metylester



17/25

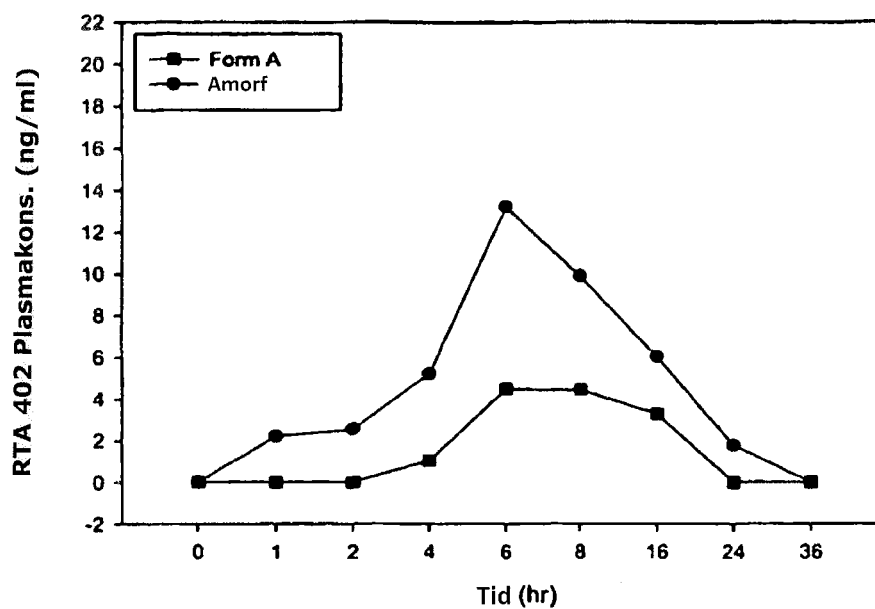
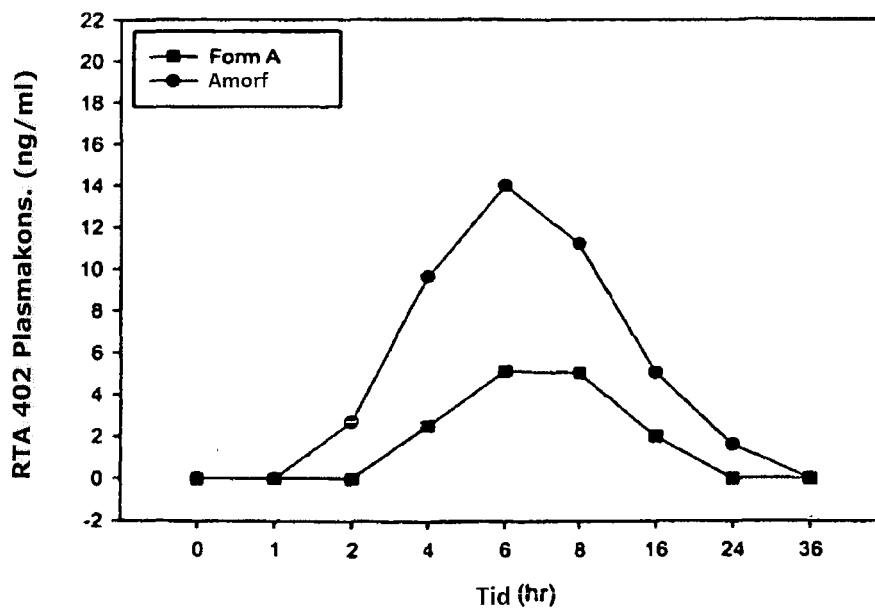
Figur 20. Representativ graf av arealet under kurven for Form A og Form B amorf) etter en 4,1 mg/kg oral administrasjon. Hvert datapunkt representerer den gjennomsnittlige plasmakonsentrasjonen av CDDO-metylester i 8 dyr. Feilstolper representerer standardavviket innefor prøvepopulasjonen.

Form A vs amorf i Cynomolgus-aper
etter en 4,1 mg/kg oral dose



18/25

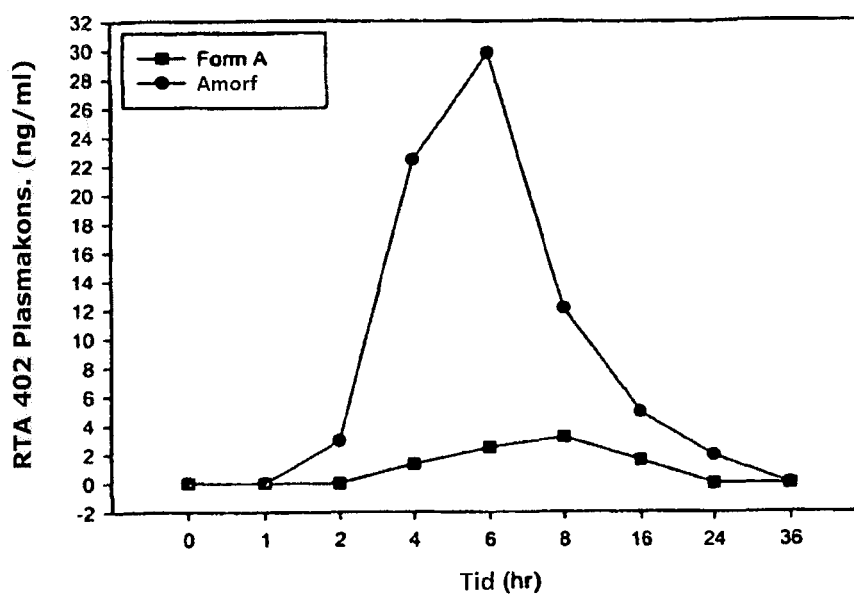
Figur 21. Dyr #505M (toppfelt) og dyr #507F (bunnfelt)

Form A vs amorf - ape 505M
etter en 4,1 mg/kg oral doseForm A vs amorf - ape 507F
etter en 4,1 mg/kg oral dose

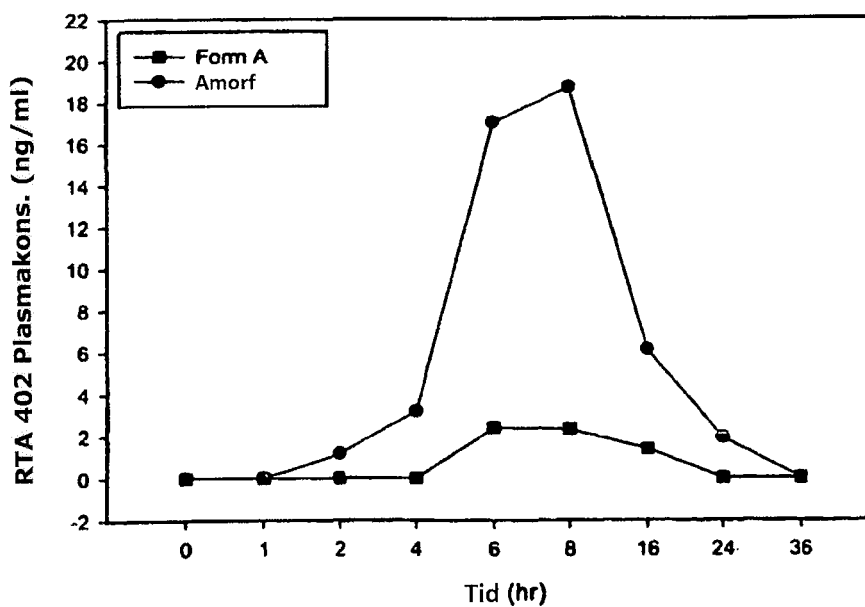
19/25

Figur 22. Dyr #508F (toppfelt) og dyr #502M (bunnfelt)

Form A vs amorf - ape 508F
etter en 4,1 mg/kg oral dose

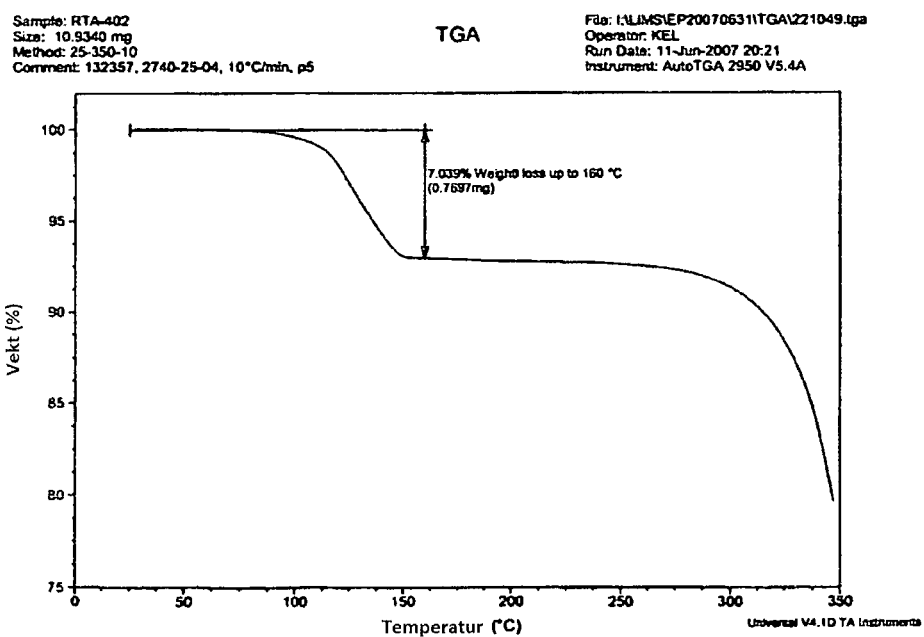
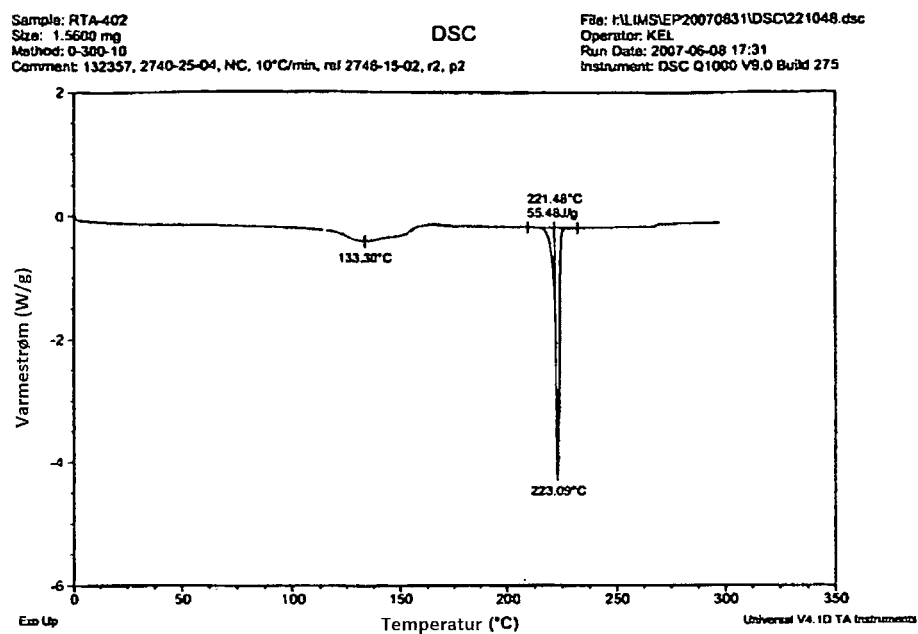


Form A vs amorf - ape 502M
etter en 4,1 mg/kg oral dose



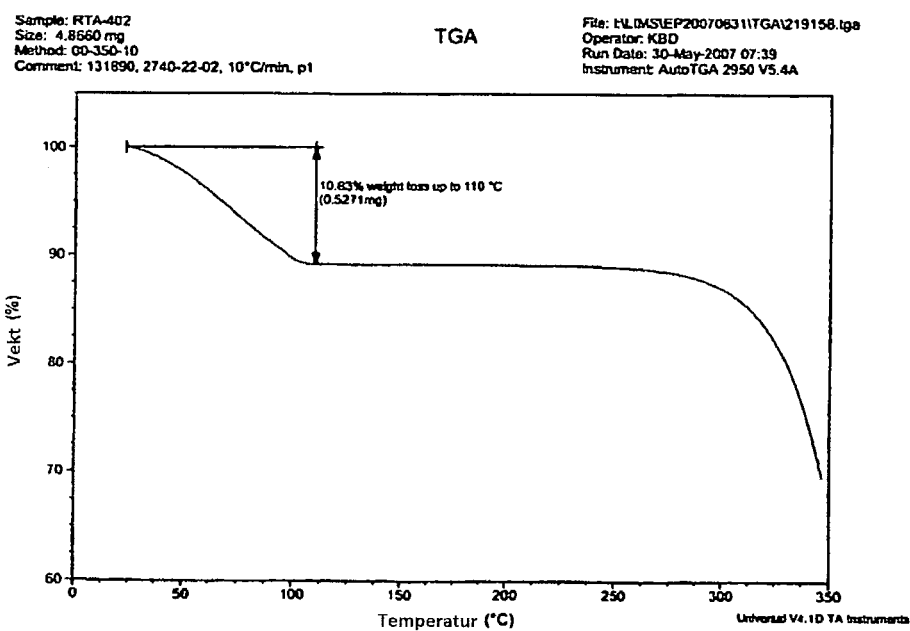
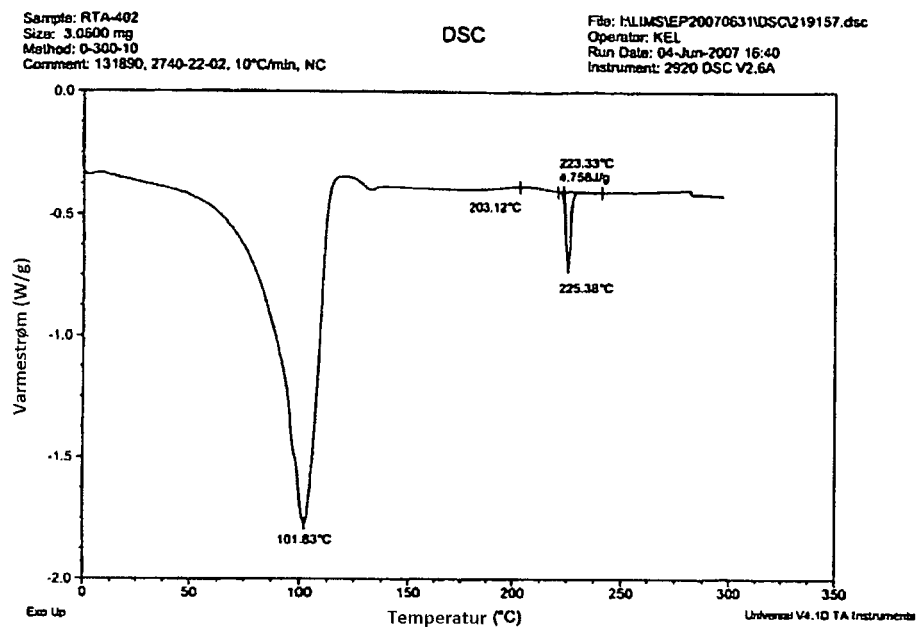
20/25

Figur 23. Termogrammer av CDDO-metylester-hemibenzensolvat



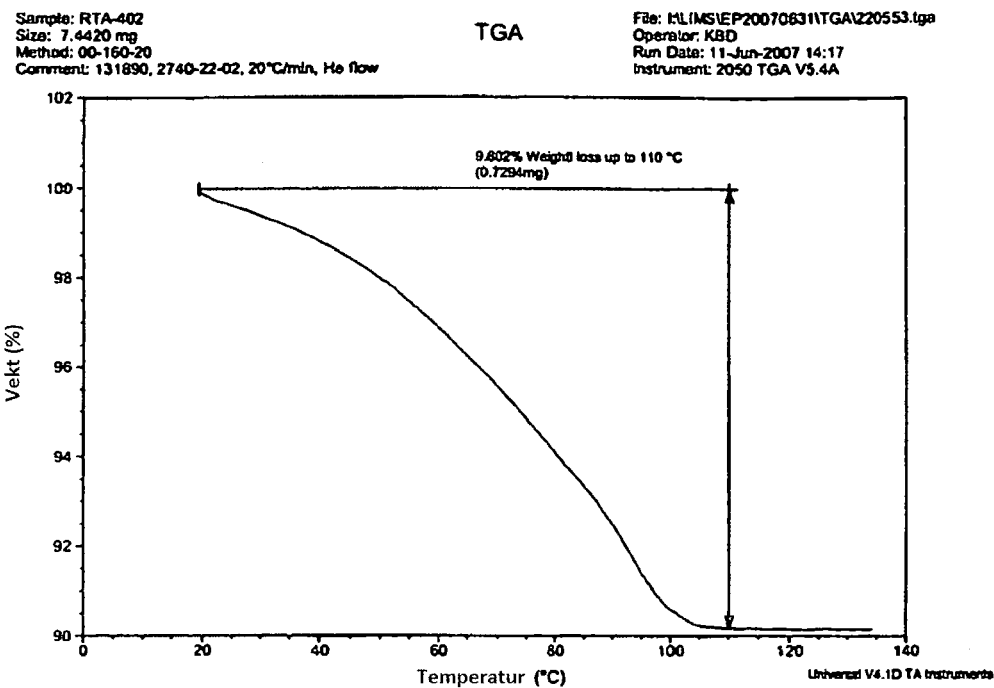
21/25

Figur 24 - Termogrammer av CDDO-metylester-dimetanolisolvat

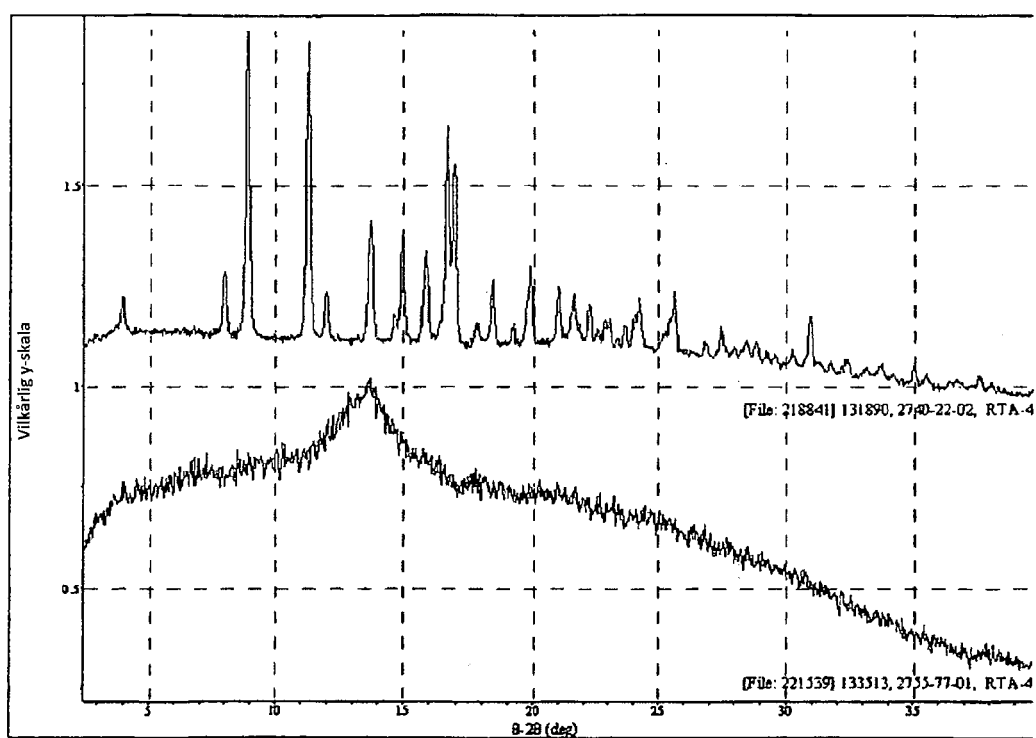


22/25

Figur 25 - TGIR-data av CDDO-metylester-dimetanolsoolvat

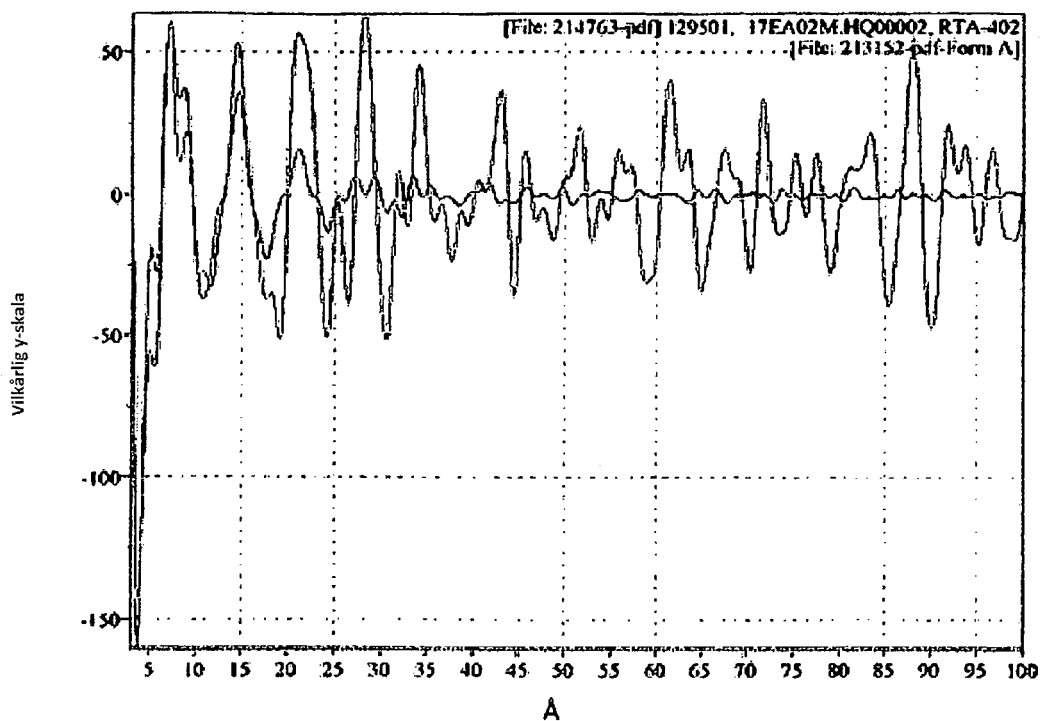


Figur 26 - XRPD-mønster av CDDO-metylester-dimetanolsoolvat før (topp) og etter (bunn) TGIR-analyse (opp til 140 °C).

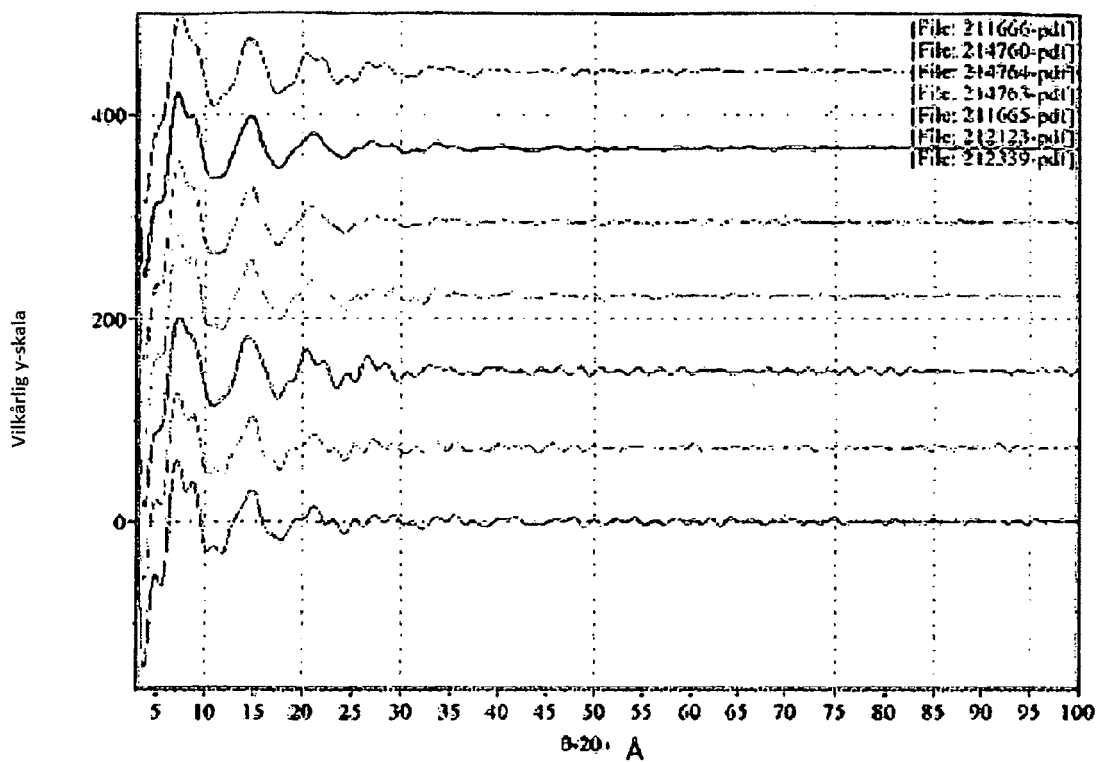


23/25

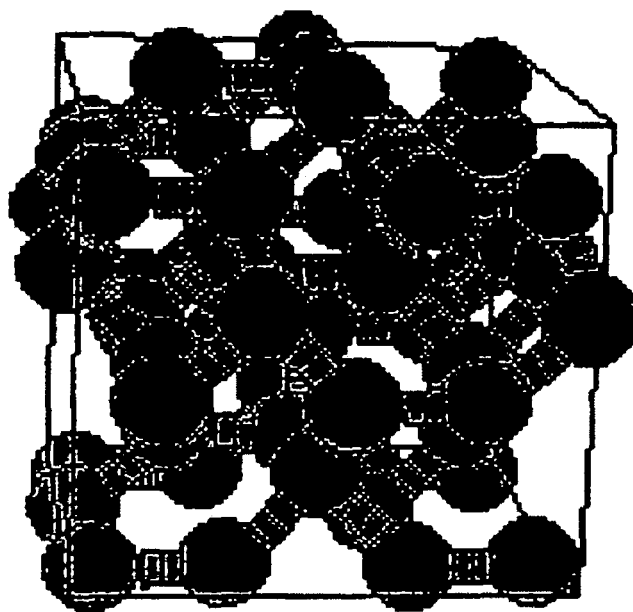
Figur 27 Overlegg PDF, Form A vs. Form B. Lokal sekvens nesten lik fra ca 5 Å til ca 20 Å



Figur 28 Et PDF-overlegg av røntgenamorfe mønster for preparater av Form B



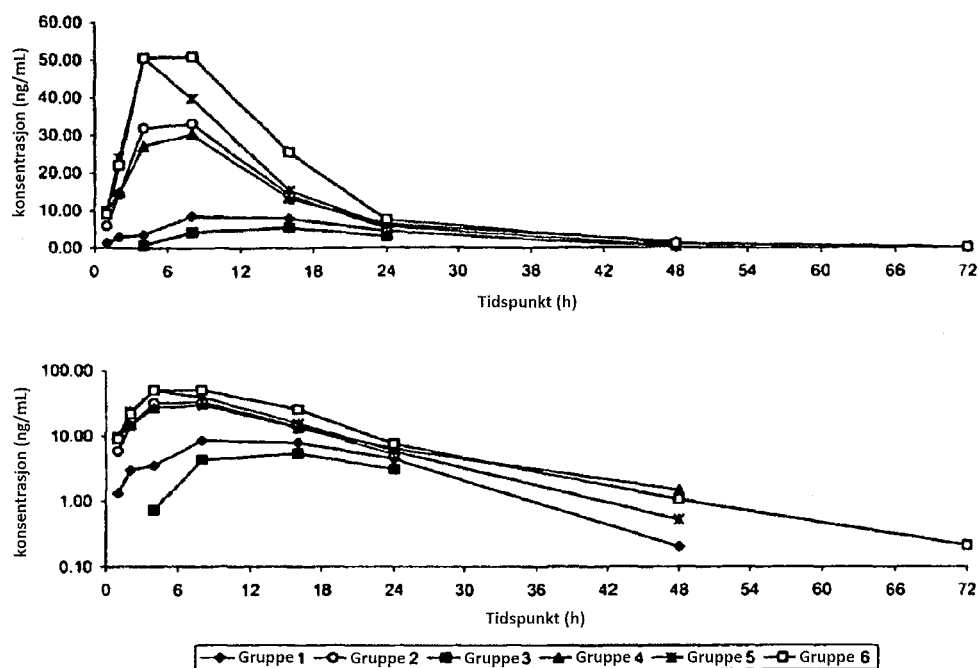
24/25

Figur 29 – Skjematisk fremstilling av romgruppe $P4_32_12$ (#96) **$P4_32_12$ (#96)**

25/25

Figur 30 Gjennomsnittlige blodkonsentrasjoner av CDDO-metylester etter enkle orale administrasjoner av CDDO-metylester-kapsler til hann Cynomolgus-aper

(Fase 2 og 3)



Gruppe 1: (Fase 2), dyr mottok én kapsel inneholdende 30 mg nanokrystallinsk Form A

Gruppe 2: (Fase 2), dyr mottok én kapsel inneholdende 30 mg Form B mikronisert

Gruppe 3: (Fase 2), dyr mottok én kapsel inneholdende 30 mg krystallinsk mikronisert Form A

Gruppe 4: (Fase 2), dyr mottok én kapsel inneholdende 30 mg Form B - PVP/VA-polymermatris

Gruppe 5: (Fase 2), dyr mottok én kapsel inneholdende 30 mg Form B - HPMCP-polymermatris (Hypromellose-ftalat)

Gruppe 6: (Fase 2), dyr mottok én kapsel inneholdende 30 mg Form B - Eudragit L100-55 polymermatris (metakrylsyrekopolymer Type C)