

TRADUZIONE DEL BREVETTO EUROPEO N. 2662094 DAL TITOLO:  
"METODI DI COMPLESSAZIONE DI CICLODESTRINA PER  
FORMULARE INIBITORI DEL PROTEASOMA PEPTIDICO"

\*\*\* \*\*

DESCRIZIONE

**CAMPO TECNICO**

Questa divulgazione fornisce metodi di complessazione di ciclodestrina per formulare composizioni comprendenti un inibitore del proteasoma peptidico e una ciclodestrina, o una miscela di ciclodestrine, in particolare una o più ciclodestrine sostituite. Tali metodi aumentano sostanzialmente la solubilità e la stabilità degli inibitori del proteasoma e facilitano sia la loro produzione sia la loro somministrazione. Inoltre, la divulgazione fornisce una composizione farmaceutica per l'uso nel trattamento del mieloma multiplo.

**STATO DELL'ARTE**

Il proteasoma è stato convalidato come bersaglio terapeutico, come dimostrato dall'approvazione FDA di bortezomib, un inibitore del proteasoma dell'acido boronico, per il trattamento di varie indicazioni di cancro, incluso il mieloma multiplo. Tuttavia, sono stati recentemente descritti altri inibitori più altamente specifici per il proteasoma che possono avere meno effetti collaterali tossici. Questi composti includono chetoni epossidici peptidici come epossomicina, descritti nel brevetto statunitense n. 6,831,099, e quelli descritti nel brevetto statunitense n. 7,232,818. Inoltre, il brevetto statunitense n. 7,737,112 divulga l'inibitore

13

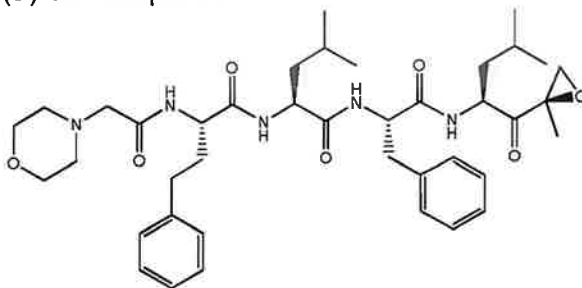
del proteasoma peptidico carfilzomib in una soluzione acquosa contenente SBEDC e acido citrico. Tuttavia, la bassa solubilità acquosa di alcuni di questi composti rende difficile formulare composizioni a una concentrazione sufficientemente elevata da consentire la somministrazione pratica con effetti antineoplastici o altri effetti farmacologici desiderati. Pertanto, sono necessari metodi aggiuntivi di formulazione di chetoni epossidici peptidici.

### SOMMARIO

[1] Nel presente documento sono forniti metodi di complessazione di ciclodestrina per formulare una composizione di inibitore del proteasoma peptidico comprendente:

(i) fornire una prima combinazione comprendente:

(a) un composto:



o un suo sale farmaceuticamente accettabile;

(b) una ciclodestrina ("CD") a basso contenuto di cloruro che è una ciclodestrina contenente cloruro avente meno di o uguale a cloruro di sodio allo 0,05% p/p, o se è presente una o più fonti di cloruro diverse da o in aggiunta a cloruro di sodio, una ciclodestrina contenente cloruro avente un contenuto di ioni cloruro che è inferiore o uguale alla quantità

13

di cloruro che sarebbe presente in una ciclodestrina avente cloruro di sodio allo 0,05% p/p; e

(c) acqua;

in cui la prima combinazione è eterogenea e il composto o il sale ha una bassa solubilità nella prima combinazione; e

(ii) porre a contatto la prima combinazione con un acido per formare una seconda combinazione, in cui il composto è più solubile nella seconda combinazione rispetto alla prima combinazione, e l'acido è selezionato tra acido lattico, acido acetico, acido formico, acido citrico, acido ossalico, acido urico, acido succinico, acido maleico, acido fumarico, acido benzoico, acido tartarico, bisolfato e acido fosforico o sali di fosfato,

in cui il metodo viene eseguito in assenza di acido cloridrico.

È stato mostrato che molti inibitori del proteasoma peptidico hanno bassa idrosolubilità. Questa bassa solubilità può essere superata attraverso la complessazione del composto con una o più ciclodestrine usando i metodi forniti nel presente documento. Per esempio, soluzioni omogenee di un composto di formula (5) (carfilzomib) possono essere ottenute a un pH farmaceuticamente utile (per esempio, circa 3,5) e a concentrazioni più elevate (per esempio, circa 5 mg/mL) di quelle che potrebbero essere ottenute senza una o più ciclodestrine e i processi di complessazione tra il composto e una o più ciclodestrine fornite nel presente documento. Oltre ad aumentare la solubilità di un inibitore del proteasoma peptidico in soluzione, le formulazioni preparate mediante i

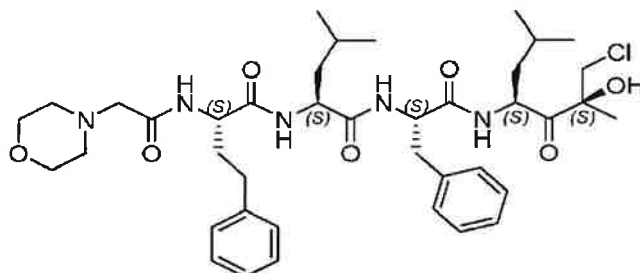
metodi forniti nel presente documento determinano soluzioni farmaceutiche aventi una stabilità sorprendente. La stabilità di un inibitore complessato si riflette nella mancanza di precipitazione dalla soluzione di inibitore complessato omogenea per lunghi periodi di tempo e stress termici. Per esempio, l'inibitore complessato può rimanere solubile per periodi di tempo e sotto stress termici che superano quelli tipici per l'uso pratico di prodotti farmaceutici iniettabili fabbricati in modo asettico. Sebbene le elevate concentrazioni ottenute mediante i metodi di lavorazione forniti nel presente documento possano non essere prevedibilmente stabili dal punto di vista termodinamico, è stato mostrato che la stabilità fisica delle soluzioni non è influenzata dalla temperatura di conservazione (ad esempio, le soluzioni possono essere stabili da -20 °C a 25 °C), dal ciclo di congelamento e scongelamento, e dalla liofilizzazione e ricostituzione. La stabilità delle soluzioni supersature dell'inibitore del proteasoma peptidico complessato e di una o più ciclodestrine è sufficiente a tollerare regolazioni del pH dopo la complessazione senza la precipitazione. Per esempio, eseguendo la complessazione nell'intervallo di pH 2,5 - 3, poi titolando il pH con soluzione di idrossido di sodio a pH 3,5. Questa stabilità fisica della soluzione consente l'uso del materiale complessato in un intervallo di pH accettabile per iniezione e altri scopi farmaceutici, nonché presentando stabilità in un intervallo di pH in cui vengono ottenute stabilità chimica e durata di conservazione adatte. Di conseguenza, le composizioni farmaceutiche preparate mediante i metodi forniti nel presente

documento possono essere soluzioni supersature che non precipitano o diminuiscono in misura significativa la concentrazione durante il loro uso in qualsiasi numero di applicazioni mediche (ad esempio, una soluzione in massa durante la fabbricazione di prodotti sterili può non precipitare per diversi giorni dopo la filtrazione sterile mentre viene tenuta in un serbatoio di mantenimento sterile di riempimento di fiala. Analogamente, le composizioni farmaceutiche ricostituite finali possono essere stabili per un intervallo da ore fino a giorni facilitando il loro uso come agenti medicinali).

Oltre a produrre soluzioni stabili altamente concentrate di un inibitore del proteasoma peptidico, le formulazioni preparate mediante i metodi di complessazione forniti nel presente documento possono essere ottenute senza limitazioni di degradazione chimica e stabilità di altri metodi di formulazione. Per esempio, i metodi forniti nel presente documento evitano l'uso di acidi forti (ad esempio, HCl) per abbassare il pH durante la complessazione. Sebbene la diminuzione del pH della formulazione a un valore inferiore a 2 possa facilitare la dissoluzione dell'inibitore del proteasoma peptidico e produrre una soluzione omogenea prima della complessazione, l'acidità della soluzione può determinare la degradazione dell'inibitore del proteasoma peptidico. Per esempio, nel caso dell'inibitore del proteasoma peptidico carfilzomib, l'uso di un acido forte come HCl può determinare l'idrolisi dell'eossido farmacologico, e attraverso l'attacco nucleofilo con ioni cloruro,

h

determinare la formazione di un addotto di cloridrina come degradante (CDP):



In base alla sua struttura, questo degradante viene classificato come alchilatore, che è una classe di composti considerata dalla FDA come un'impurità potenzialmente genotossica. In modo importante, da un punto di vista di sicurezza del prodotto regolato, l'uso dei metodi forniti nel presente documento evita tali acidi forti e, pertanto, le reazioni di degradazione dell'inibitore del proteasoma peptidico a tali composti possono essere significativamente ridotte e, in alcuni casi, possono anche essere eliminate.

Tra l'altro sono contenute composizioni farmaceutiche che sono preparate mediante uno qualsiasi dei metodi descritti nel presente documento:

Ulteriori forme di realizzazione oltre a [1] includono una o più delle seguenti caratteristiche:

In un secondo aspetto, la prima combinazione non include quantità apprezzabili di uno o più solventi organici. In alcune forme di realizzazione, la prima combinazione non include alcuna quantità o tipologia di uno o più solventi organici descritti nel brevetto statunitense 7,232,818 e/o 7,417,042 e/o 7,737,112 e/o US-2009-0105156 e/o US-

13

2011-0236428. In alcune forme di realizzazione, la prima combinazione è priva di uno o più solventi organici (ad esempio, contiene meno del 5%, meno del 4%, meno del 3%, meno del 2%, meno dell'1% (p/p o p/v) di qualsiasi uno o più solventi organici). In alcune forme di realizzazione, la prima combinazione è sostanzialmente priva di uno o più solventi organici (ad esempio, contiene meno dello 0,5%, meno dello 0,2, meno dello 0,1, meno dello 0,05% (p/p o p/v) di qualsiasi uno o più solventi organici). In determinate forme di realizzazione, la prima combinazione non include una quantità rilevabile di uno o più solventi organici.

In un terzo aspetto, la prima combinazione non include quantità apprezzabili di uno o più tamponi. In alcune forme di realizzazione, la prima combinazione non include alcuna quantità o tipologia di qualsiasi uno o più tamponi descritti nel brevetto statunitense 7,232,818 e/o 7,417,042 e/o 7,737,112 e/o US-2009-0105156 e/o US-2011-0236428. In alcune forme di realizzazione, la prima combinazione è priva di qualsiasi uno o più tamponi (ad esempio, contiene meno del 5%, meno del 4%, meno del 3%, meno del 2%, meno dell'1% (p/p o p/v) di qualsiasi uno o più tamponi). In alcune forme di realizzazione, la prima combinazione è sostanzialmente priva di qualsiasi uno o più tamponi (ad esempio, contiene meno dello 0,5%, meno dello 0,2, meno dello 0,1, meno dello 0,05% (p/p o p/v) di qualsiasi uno o più tamponi). In alcune forme di realizzazione, la prima combinazione non include una quantità rilevabile di uno o più tamponi.

La seconda combinazione include un complesso del composto e l'una o più ciclodestrine.

L'acido è aggiunto sotto forma di una soluzione acquosa.

Ulteriori forme di realizzazione comprendono i seguenti aspetti:

In un ulteriore aspetto, il metodo di qualsiasi da [1] a [3], in cui la ciclodestrina è HPBCD o SBECD.

Il metodo di [1], in cui la ciclodestrina è SBECD.

Il metodo di [1], in cui il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione non è superiore a 0,32.

Il metodo di [1], in cui la fornitura di una prima combinazione (fase (i)) comprende l'aggiunta del composto a una soluzione della ciclodestrina e dell'acqua.

Il metodo di qualsiasi delle forme di realizzazione precedenti da [1] a [7], in cui il metodo comprende inoltre la miscelazione della seconda combinazione per un tempo sufficiente a ottenere una terza combinazione omogenea.

Gli inventori hanno scoperto che può essere vantaggioso minimizzare la quantità di ione cloruro (o altri anioni nucleofili) nei metodi e nelle composizioni farmaceutiche descritti nel presente documento.

Almeno una tra l'una o più ciclodestrine (aggiunte alla prima combinazione) è una ciclodestrina a basso contenuto di cloruro. Come usato nel presente documento, una "ciclodestrina a basso contenuto di cloruro" si riferisce a una ciclodestrina contenente cloruro avente meno di o uguale a cloruro di sodio allo 0,05% p/p, o se è presente una o più

fonti di cloruro diverse da (o oltre a) cloruro di sodio, una "ciclodestrina a basso contenuto di cloruro" si riferisce a una ciclodestrina contenente cloruro avente un contenuto di ioni cloruro che è inferiore o uguale alla quantità di cloruro che sarebbe presente in una ciclodestrina avente cloruro di sodio allo 0,05% p/p. In alcune forme di realizzazione, la ciclodestrina a basso contenuto di cloruro è una SBECD a basso contenuto di cloruro. La determinazione della concentrazione di cloruro può essere determinata mediante una varietà di metodi noti nell'arte (ad esempio, per cicloestrani ottenuti in commercio dalla specifica del prodotto del produttore, ad esempio, mediante tecniche gravimetriche, ad esempio, mediante tecniche potenziometriche).

In alcune forme di realizzazione, almeno una dell'una o più cicloestrine (aggiunte alla prima combinazione) non include una quantità rilevabile di ione cloruro.

In alcune forme di realizzazione, la quantità di ione cloruro presente (ad esempio, il rapporto molare tra ione cloruro e composto) è sufficientemente bassa da fornire una durata di conservazione di 2 anni quando conservato a 2-8 gradi C. In determinate forme di realizzazione è presente ione cloruro, e la quantità di ione cloruro presente è sufficientemente bassa da fornire una durata di conservazione di 2 anni quando conservato a 2-8 gradi C.

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione non è superiore a 2,0. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione

b

cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione è diverso da 0, ma inferiore a 2,0).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione non è superiore a 1,5. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione è diverso da 0, ma inferiore a 1,5).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione non è superiore a 1,2. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione è diverso da 0, ma inferiore a 1,2).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione non è superiore a 1,0. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione è diverso da 0, ma inferiore a 1,0).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione non è superiore a 0,9. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione è diverso da 0, ma inferiore a 0,9).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione non è superiore a 0,8. In

determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione è diverso da 0, ma inferiore a 0,8).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione non è superiore a 0,7. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione è diverso da 0, ma inferiore a 0,7).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione non è superiore a 0,6. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione è diverso da 0, ma inferiore a 0,6).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione non è superiore a 0,5. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione è diverso da 0, ma inferiore a 0,5).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione non è superiore a 0,4. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione è diverso da 0, ma inferiore a 0,4).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione non è superiore a 0,3. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione è diverso da 0, ma inferiore a 0,3).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione non è superiore a 0,2. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione è diverso da 0, ma inferiore a 0,2).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione non è superiore a 0,1. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione è diverso da 0, ma inferiore a 0,1).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione è da 0,2 a 1,2 (ad esempio, da 0,3 a 1,2, ad esempio, da 0,2 a 0,4, ad esempio, da 0,3 a 0,4, ad esempio, 0,32).

In forme di realizzazione, i rapporti molari tra ione cloruro e composto descritto nel presente documento possono anche essere presenti nella seconda e/o terza combinazione.

In un aspetto sono contenute composizioni farmaceutiche che sono preparate mediante uno qualsiasi dei metodi descritti nel presente

documento e hanno un rapporto molare tra ione cloruro e composto che non è superiore a 2,0. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche è diverso da 0, ma inferiore a 2,0).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche non è superiore a 1,5. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche è diverso da 0, ma inferiore a 1,5).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche non è superiore a 1,2. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche è diverso da 0, ma inferiore a 1,2).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche non è superiore a 1,0. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche è diverso da 0, ma inferiore a 1,0).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche non è superiore a 0,9. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo

13

ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche è diverso da 0, ma inferiore a 0,9).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche non è superiore a 0,8. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche è diverso da 0, ma inferiore a 0,8).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche non è superiore a 0,7. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche è diverso da 0, ma inferiore a 0,7).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche non è superiore a 0,6. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche è diverso da 0, ma inferiore a 0,6).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche non è superiore a 0,5. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche è diverso da 0, ma inferiore a 0,5).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche non è superiore a

13

0,4. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche è diverso da 0, ma inferiore a 0,4).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche non è superiore a 0,3. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche è diverso da 0, ma inferiore a 0,3).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche non è superiore a 0,2. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche è diverso da 0, ma inferiore a 0,2).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche non è superiore a 0,1. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche è diverso da 0, ma inferiore a 0,1).

In alcune forme di realizzazione, le composizioni farmaceutiche non includono una quantità rilevabile di ione cloruro.

A titolo di esempio, il rapporto molare tra ione cloruro e composto (ad esempio, in uno qualsiasi dei seguenti: la prima combinazione, la seconda combinazione, la terza combinazione, le composizioni farmaceutiche preparate mediante i metodi descritti nel presente

documento) può essere calcolato come mostrato di seguito usando una fiala di polvere secca di carfilzomib ("CFZ") come base per il calcolo:

Massa del contenuto della fiala = 3,212 g

Massa di CFZ = 61,8 mg

Massa massima del cloruro (allo 0,03% p/p di ione cloruro) =  
0,0009636 g

Massa molare massima del cloruro =  $2,714 \times 10^{-5}$

(massa atomica Cl = 35,5)

Massa molare di CFZ =  $8,584 \times 10^{-5}$

(MW di CFZ = 719,9)

Rapporto molare Cl/CFZ allo stato solido in una fiala = 0,32

Questo calcolo può anche essere determinato per la prima combinazione usando, ad esempio, il contenuto di cloruro della ciclodestrina (e qualsiasi altra fonte di ione cloruro) e la massa del composto che sono aggiunti per realizzare la prima combinazione.

Come il tecnico del ramo può apprezzare, ci si aspetterebbe che questo rapporto sia lo stesso nella soluzione in massa precursore usata per riempire la fiala (pre-liofilizzazione), nonché quando i contenuti di detta fiala di polvere secca sono ricostituiti in acqua sterile per la somministrazione al paziente.

La fornitura di una prima combinazione (fase (i)) include l'aggiunta del composto a una soluzione dell'una o più ciclodestrine e dell'acqua.

13

Il composto è un solido cristallino. In forme di realizzazione, la forma cristallina del composto ha un pattern di diffrazione dei raggi X su polveri comprendente da 2 a 8 picchi caratteristici espressi in gradi  $2\theta$  in 6,10, 9,32, 10,10, 12,14, 13,94, 18,44, 20,38 e 23,30.

Il metodo include inoltre la miscelazione della prima combinazione prima di porre a contatto la prima combinazione con un acido.

Le fasi (i) e (ii) sono entrambe eseguite in un singolo recipiente.

Il metodo include inoltre la miscelazione della seconda combinazione per un tempo sufficiente a ottenere una terza combinazione omogenea.

In un ulteriore aspetto è fornito il metodo di [8], in cui la concentrazione disciolta e complessata del composto nella terza combinazione è da 1 mg/mL a 20 mg/mL, in particolare da 4 a 8 mg/mL.

In un ulteriore aspetto è fornito il metodo di [8] o [9], in cui il pH della terza combinazione è da 2 a 4.

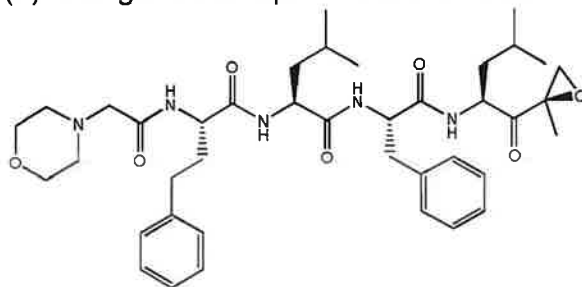
Il metodo di uno qualsiasi da [8] a [10], in cui il metodo comprende inoltre la liofilizzazione della terza combinazione per fornire un liofilizzato.

Il metodo di qualsiasi delle forme di realizzazione precedenti, in cui la composizione farmaceutica comprende inoltre acido citrico.

Il metodo di una qualsiasi delle forme di realizzazione precedenti, in cui la composizione farmaceutica ha una concentrazione di cloruro fino a e includente lo 0,03% p/v.

In un ulteriore aspetto è presentata una composizione farmaceutica liofilizzata per uso nel trattamento del mieloma multiplo (ad esempio, mieloma multiplo che è recidivante e/o refrattario) in un paziente, che include la somministrazione al paziente di una quantità terapeuticamente efficace della composizione farmaceutica liofilizzata comprendente:

(a) 60 mg di un composto avente la struttura di



o un suo sale farmaceuticamente accettabile;

(b) 3000 mg di ciclodestrina solfobutiletere ("SBECD") a basso contenuto di cloruro; che è una ciclodestrina contenente cloruro avente meno di o uguale a cloruro di sodio allo 0,05% p/p, o se è presente una o più fonti di cloruro diverse da o in aggiunta a cloruro di sodio, una ciclodestrina contenente cloruro avente un contenuto di ioni cloruro che è inferiore o uguale alla quantità di cloruro che sarebbe presente in una ciclodestrina avente cloruro di sodio allo 0,05% p/p, e

(c) un sistema di tamponamento del pH comprendente 57,7 mg di acido citrico e idrossido di sodio, il sistema tampone sufficiente a fornire un pH di circa 3,5 quando disciolto in circa 29 mL di acqua;

in cui, dopo la dissoluzione della formulazione farmaceutica liofilizzata in circa 29 mL di acqua, la soluzione risultante ha una

concentrazione di cloruro di sodio fino a e includente lo 0,05% (p/v) come definito in (b).

Un ulteriore aspetto fornisce la composizione farmaceutica liofilizzata per uso secondo [14], in cui la SBECD ha una concentrazione di ioni cloruro dello 0,03% p/p o inferiore come definito in [14].

Salvo diversa definizione, tutti i termini tecnici e scientifici usati nella presente hanno lo stesso significato comunemente inteso da un tecnico del ramo di ordinarie competenze a cui si rivolge questa divulgazione. Metodi e materiali sono descritti nella presente per uso nella presente divulgazione; possono anche essere usati altri metodi e materiali adatti noti nell'arte. I materiali, i metodi e gli esempi sono solo illustrativi. In caso di conflitto, prevarrà la presente descrizione, definizioni incluse.

Altre caratteristiche e vantaggi della divulgazione risulteranno evidenti dalla seguente descrizione dettagliata e dalle figure, e dalle rivendicazioni.

La portata della presente invenzione è definita nelle rivendicazioni.

#### **DESCRIZIONE DEI DISEGNI**

**La Figura 1** è un grafico lineare che mostra la complessazione di CFZ-API mediante SBECD nel tempo.

**La Figura 2** illustra l'indipendenza delle composizioni farmaceutiche preparate nel presente documento sulle proprietà fisico-chimiche (ad esempio, granulometria) dell'inibitore del proteasoma.

**La Figura 3** è un grafico lineare che mostra un aumento della solubilizzazione di CFZ-API con concentrazione di SBECD crescente.

**La Figura 4** illustra l'indipendenza della solubilità del complesso CFZ-API/SBECD sulla temperatura di lavorazione o conservazione.

**La Figura 5** illustra la correlazione tra i livelli di prodotto di degradazione della cloridrina (CDP) e l'interazione a due fattori del contenuto di acqua e cloruro a pH 3,5.

**La Figura 6** illustra la solubilità di carfilzomib in SBECD a pH 1,5 e pH 3,5, 25 °C e 5 °C, (acido citrico 5,9 mg/mL).

**La Figura 7** è un grafico che illustra che la solubilità acquosa di carfilzomib è aumentata in funzione della concentrazione di SBE- $\beta$ -CD. Il profilo di solubilità in fase concava verso il basso può essere classificato come comportamento di complessazione di tipo An. Partendo da un pH basso si ha un aumento significativo della solubilità, mentre la temperatura ha un effetto trascurabile. Si veda l'Esempio 5.

**La Figura 8** è un grafico che illustra i dati di solubilizzazione per carfilzomib durante la miscelazione in funzione del tempo a valori di pH 1,5 e 3 (a 5 °C), nonché per etanolo al 5%. Si veda l'Esempio 5.

**La Figura 9** è un grafico che illustra carfilzomib molare solubilizzato rispetto alla ciclodestrina libera indicizzata per complessazione.

#### **DESCRIZIONE DETTAGLIATA**

Nella presente sono forniti metodi di complessazione di ciclodestrina per formulare un inibitore del proteasoma peptidico (ad

esempio, un composto di formula (1) - (5) o un suo sale farmaceuticamente accettabile) con una ciclodestrina. Nella presente sono altresì fornite composizioni farmaceutiche comprendenti un inibitore del proteasoma peptidico e una ciclodestrina, in cui la composizione ha uno ione cloruro come descritto in qualsiasi punto del presente documento (la composizione viene preparata usando una ciclodestrina a basso contenuto di cloruro; ad esempio, il rapporto molare tra ione cloruro e composto è 0,32). In alcune forme di realizzazione, formulazioni aventi un basso contenuto di ioni cloruro come descritto nel presente documento possono determinare una formazione diminuita di prodotti di degradazione indesiderati.

### **Definizioni**

Il termine "tampone" è una sostanza che per la sua presenza in soluzione aumenta la quantità di acido o alcali che deve essere aggiunta per indurre una variazione unitaria del pH. Pertanto, un tampone è una sostanza che coadiuva la regolazione del pH di una composizione. Tipicamente, un tampone viene scelto in base al pH desiderato e alla compatibilità con altri componenti di una composizione. In generale, un tampone ha una pKa che non è superiore a 1 unità inferiore o superiore al pH desiderato della composizione (o che la composizione produrrà al momento della dissoluzione).

Il termine "acqua" come usato nel presente documento si riferisce a una soluzione liquida di H<sub>2</sub>O avente un pH di circa 7,0.

Il termine "sostituito" si riferisce a porzioni funzionali aventi sostituenti che sostituiscono un idrogeno su uno o più atomi non di idrogeno della molecola. Si comprenderà che "sostituzione" o "sostituito con" include la condizione implicita che tale sostituzione sia in accordo con la valenza consentita dell'atomo sostituito e del sostituito, e che la sostituzione risulti in un composto stabile, ad esempio, che non subisca spontaneamente trasformazione come per riarrangiamento, ciclizzazione, eliminazione, ecc. Come usato nella presente, il termine "sostituito" è contemplato per includere tutti i sostituenti ammissibili di composti organici. In generale, i sostituenti ammissibili includono sostituenti aciclici e ciclici, ramificati e non ramificati, carbociclici ed eterociclici, aromatici e non aromatici di composti organici. I sostituenti ammissibili possono essere uno o più e uguali o diversi per composti organici appropriati. Ai fini di questa divulgazione, gli eteroatomi come l'azoto possono avere sostituenti idrogeno e/o qualsiasi sostituito ammissibile di composti organici descritti nella presente che soddisfano le valenze degli eteroatomi. I sostituenti possono includere, per esempio, un alogeno, un idrossile, un carbonile (come un carbossile, un alcossicarbonile, un formile, o un acile), un tiocarbonile (come un tioestere, un tioacetato, o un tioformiato), un alcossile, un fosforile, un fosfato, un fosfonato, un fosfinato, un ammino, un ammido, un'ammidina, un'immina, un ciano, un nitro, un azido, un solfidrile, un alchiltio, un solfato, un solfonato, un solfamoile, un solfonammido, un solfonile, un eterociclice, un aralchile o una porzione funzionale aromatica o

13

eteroaromatica. I tecnici del ramo comprenderanno che le porzioni funzionali sostituite sulla catena idrocarburica possono esse stesse essere sostituite, se appropriato.

In alcune forme di realizzazione, i composti forniti nel presente documento, o loro sali, sono sostanzialmente isolati o purificati. Con "sostanzialmente isolato" si intende che il composto è almeno parzialmente o sostanzialmente separato dall'ambiente in cui è stato formato o rilevato. La separazione parziale può includere, per esempio, una composizione arricchita nei composti forniti nel presente documento. La separazione sostanziale può includere composizioni contenenti almeno circa il 50%, almeno circa il 60%, almeno circa il 70%, almeno circa l'80%, almeno circa il 90%, almeno circa il 95%, almeno circa il 97%, o almeno circa il 99% in peso dei composti, o loro sali. Metodi per isolare composti e loro sali sono di routine nell'arte.

Come usato nel presente documento, il termine "peptide" si riferisce a una catena di amminoacidi che è lunga da due a dieci amminoacidi.

Come usato nel presente documento, il termine amminoacido "naturale" o "presente in natura" si riferisce a uno dei venti amminoacidi presenti più comuni. Gli amminoacidi naturali sono indicati con le loro abbreviazioni standard di una o tre lettere.

L'espressione "amminoacido non naturale" o "non naturale" si riferisce a qualsiasi derivato o analogo strutturale di un amminoacido naturale che include forme D, e derivati amminoacidici  $\beta$  e  $\gamma$ . Si noti che

b

alcuni amminoacidi, ad esempio, idrossiprolina, che sono classificati come amminoacidi non naturali nel presente documento, si possono trovare in natura all'interno di un determinato organismo o una particolare proteina. Esempi non limitativi di amminoacidi non naturali includono:  $\beta$ -alanina ( $\beta$ -Ala), acido  $\gamma$ -amminoburittico (GABA), acido 2-amminobutirrico (2-Abu), acido  $\alpha,\beta$ -deidro-2-amminobutirrico ( $\Delta$ -Abu), acido 1-amminociclopropan-1-carbossilico (ACPC), acido amminoisobutirrico (Aib), acido 2-ammino-tiazolin-4-carbossilico, acido 5-amminovalerico (5-Ava), acido 6-amminoesanoico (6-Ahx), acido 8-amminooctanoico (8-Aoc), acido 11-amminoundecanoico (11-Aun), acido 12-amminododecanoico (12-Ado), acido 2-amminobenzoico (2-Abz), acido 3-amminobenzoico (3-Abz), acido 4-amminobenzoico (4-Abz), acido 4-ammino-3-idrossi-6-metileptanoico (statina, Sta), acido amminoossiacetico (Aoa), acido 2-amminotetralin-2-carbossilico (Atc), acido 4-ammino-5-cicloesil-3-idrossipentanoico (ACHPA), para-amminofenilalanina (4-NH<sub>2</sub>-Phe), bifenilalanina (Bip), para-bromofenilalanina (4-Br-Phe), orto-clorofenilalanina (2-Cl-Phe), meta-clorofenilalanina (3-Cl-Phe), para-clorofenilalanina (4-Cl-Phe), meta-clorotirosina (3-Cl-Tyr), para-benzoilfenilalanina (Bpa), terz-butilglicina (Tle), cicloesilalanina (Cha), cicloesilglicina (Chg), acido 2,3-diamminopropionico (Dpr), acido 2,4-diamminobutirrico (Dbu), 3,4-diclorofenilalanina (3,4-Cl<sub>2</sub>-Phe), 3,4-difluorfenilalanina (3,4-F<sub>2</sub>-Phe), 3,5-diiodotirosina (3,5-I<sub>2</sub>-Tyr), orto-fluorofenilalanina (2-F-Phe), meta-fluorofenilalanina (3-F-Phe), para-fluorofenilalanina (4-F-Phe), meta-

B

fluorotirosina (3-F-Tyr), omoserina (Hse), omofenilalanina (Hfe), omotirosina (Htyr), 5-idrossitriptofano (5-OH-Trp), idrossiprolina (Hyp), para-iodofenilalanina (4-I-Phe), 3-iodotirosina (3-I-Tyr), acido indolin-2-carbossilico (Idc), acido isonipecotico (Inp), meta-metiltirosina (3-Me-Tyr), 1-naftilalanina (1-Nal), 2-naftilalanina (2-Nal), para-nitrofenilalanina (4-NO<sub>2</sub>-Phe), 3-nitrotirosina (3-NO<sub>2</sub>-Tyr), norleucina (Nle), norvalina (Nva), ornitina (Orn), orto-fosfotirosina (H<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>-Tyr), acido ottaidroindol-2-carbossilico (Oic), penicillamina (Pen), pentafluorofenilalanina (F5-Phe), fenilglicina (Phg), acido pipercolico (Pip), propargilglicina (Pra), acido piroglutammico (pGlu), sarcosina (Sar), acido tetraidroisochinolin-3-carbossilico (Tic) e acido tiazolidin-4-carbossilico (tioprolina, Th). La stereochimica degli amminoacidi può essere indicata precedendo il nome o l'abbreviazione con la designazione "D" o "d" o "L" o "l" a seconda delle necessità. In alternativa, i centri chirali possono essere rappresentati con designazioni (S) o (R) convenzionali. In aggiunta, possono essere impiegati amminoacidi αN-alchilati, nonché amminoacidi aventi catene laterali contenenti ammina (come Lys e Orn) in cui l'ammina è stata acilata o alchilata. Si veda, per esempio, "Peptides and Mimics, Design of Conformationally Constrained" di Hruby e Boteju, in *Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference*, ed. Robert A. Meyers, VCH Publishers (1995), pagg. 658-664.

Il termine "complessazione" come usato nel presente documento si riferisce alla formazione di un complesso di inclusione intermolecolare, o un'associazione intermolecolare, in soluzione e tra uno o più inibitori

del proteasoma peptidico e una o più molecole di ciclodestrina. L'inclusione e/o l'associazione forniscono utilità come meccanismo per aumentare sostanzialmente la concentrazione dell'uno o più inibitori che possono essere ottenuti in soluzione acquosa rispetto alla dissoluzione in fase acquosa in un intervallo di pH simile senza l'agente complessante (vale a dire una o più molecole di ciclodestrina). In alcune forme di realizzazione, il rapporto tra ciclodestrina a basso contenuto di cloruro (ad esempio, da una fonte di ciclodestrina a basso contenuto di cloruro, ad esempio, una SBECD a basso contenuto di cloruro):inibitore (vale adire carfilzomib) è 1:1. È divulgato che più di una ciclodestrina (ad esempio, ciascuna indipendentemente selezionata tra SBECD, una ciclodestrina a basso contenuto di cloruro e una SBECD a basso contenuto di cloruro) può essere complessata con un particolare inibitore (ad esempio, carfilzomib). In alcune forme di realizzazione, il rapporto tra ciclodestrina a basso contenuto di cloruro (ad esempio, SBECD, a esempio da una fonte di ciclodestrina a basso contenuto di cloruro, ad esempio, una SBECD a basso contenuto di cloruro):inibitore, vale a dire carfilzomib) è da 1-5:1 (ad esempio, 1-4:1; 1-3:1; 1-2:1; 2-5:1, 2-4:1, 2-3:1). I rapporti di complessazione possono essere determinati usando, ad esempio, i metodi descritti nel presente documento.

Il termine trattamento "profilattico o terapeutico" è riconosciuto nell'arte e include la somministrazione all'ospite di una o più delle composizioni in oggetto. Se viene somministrato prima della manifestazione clinica della condizione indesiderata (ad esempio,

malattia o altro stato indesiderato dell'animale ospite), allora il trattamento è profilattico (ossia, protegge l'ospite contro lo sviluppo della condizione indesiderata), mentre se viene somministrato dopo la manifestazione della condizione indesiderata, il trattamento è terapeutico (ossia, è destinato a diminuire, migliorare o stabilizzare la condizione indesiderata esistente o i relativi effetti collaterali).

Il termine "proteasoma" come utilizzato nella presente intende includere immuno-proteasomi e proteasomi costitutivi.

Come usato nel presente documento, il termine "inibitore" intende descrivere un composto che blocca o riduce l'attività di un enzima o di un sistema di enzimi, recettori o altro bersaglio farmacologico (per esempio, l'inibizione della scissione proteolitica di substrati peptidici fluorogenici standard come suc-LLVY-AMC, Box-LLR-AMC e Z-LLE-AMC, inibizione di varie attività catalitiche del proteasoma 20S). Un inibitore può agire con inibizione competitiva o non competitiva. Un inibitore può legarsi in modo reversibile o irreversibile, e quindi il termine include composti che sono substrati suicidi di un enzima. Un inibitore può modificare uno o più siti nel o vicino al sito attivo dell'enzima, oppure può causare un cambiamento conformazionale altrove sull'enzima. Il termine inibitore è usato in modo più ampio nel presente documento rispetto alla letteratura scientifica in modo da comprendere anche altre classi di agenti farmacologicamente o terapeuticamente utili, come agonisti, antagonisti, stimolanti, co-fattori.

13

Come usato nel presente documento, "bassa solubilità" si riferisce all'essere moderatamente solubile, leggermente solubile, molto leggermente solubile, praticamente insolubile o insolubile, per esempio, in acqua o un'altra soluzione (per esempio, una prima combinazione); le espressioni "moderatamente solubile, leggermente solubile, molto leggermente solubile, praticamente insolubile o insolubile" corrispondono nel significato ai termini generali della Farmacopea statunitense (USP) per espressione di solubilità approssimata. Si vedano, ad esempio, DeLuca e Boylan in *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, vol. 1, Avis, K.E., Lackman, L. e Lieberman, H.A., ed.; Marcel Dekkar: 1084, pagine 141-142:

termine USP	Quantità relativa di solvente per dissolvere 1 parte di soluto
moderatamente solubile	30-100
Leggermente solubile	100-1.000
molto lievemente solubile	1.000-10.000
praticamente insolubile o insolubile	>10.000

"Eterogeneo" come usato nel presente documento si riferisce a una soluzione avente una composizione (multifase) non uniforme. Per esempio, una soluzione eterogenea può includere una sospensione di particelle solide in un liquido (ad esempio, uno slurry).

"Omogeneo" come usato nel presente documento si riferisce a una soluzione che è coerente o uniforme in tutto il suo volume (fase singola, osservata come soluzione limpida).

Una "quantità terapeuticamente efficace" di un composto rispetto alla composizione oggetto per l'uso si riferisce a una quantità dell'uno o più composti in una preparazione che, quando somministrata come parte di un regime di dosaggio desiderato (a un paziente, ad esempio, un essere umano) allevia un sintomo, migliora una condizione o rallenta l'insorgenza di condizioni patologiche secondo standard clinicamente accettabili per il disturbo o la condizione da trattare o lo scopo cosmetico, ad esempio, con un rapporto rischio/beneficio ragionevole applicabile a qualsiasi trattamento medico.

Come usato nel presente documento, il termine "trattare" o "trattamento" include invertire, ridurre o arrestare i sintomi, i segni clinici e la patologia preesistente di una condizione in modo da migliorare o stabilizzare la condizione di un paziente.

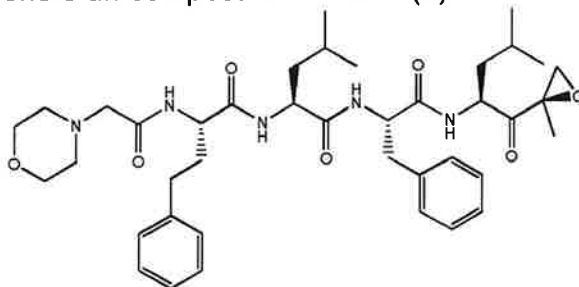
### ***Composti***

Nella presente sono forniti metodi per preparare formulazioni di inibitori del proteasoma peptidico che hanno caratteristiche di bassa solubilità in acqua. In generale, gli inibitori del proteasoma peptidico comprendono una porzione funzionale contenente epossido o aziridina che contiene gruppi in prossimità degli anelli a tre elementi contenenti eteroatomi, in modo tale che sia facilitata una reazione di apertura

b

dell'anello dell'anello a tre elementi contenente eteroatomi. Tali gruppi includono, per esempio, gruppi attrattori di elettroni come un carbonile.

In particolare, l'inibitore del proteasoma peptidico secondo l'invenzione è un composto di formula (5):



o un relativo sale farmaceuticamente accettabile. Il composto di formula (5) è anche noto come carfilzomib.

Qualsiasi dei composti descritti nel presente documento può essere isolato in forma amorfa o cristallina. La preparazione e la purificazione di composti cristallini come forniti nel presente documento possono essere effettuate come è noto nell'arte, per esempio, come descritto nella pubblicazione statunitense n. 2009/0105156.

In alcune forme di realizzazione, un composto cristallino di formula (5) è sostanzialmente puro. In alcune forme di realizzazione, il punto di fusione del composto cristallino di formula (5) è nell'intervallo da circa 200 a circa 220 °C, da circa 205 a circa 215 °C, da circa 211 a circa 213 °C, o anche circa 212 °C. In alcune forme di realizzazione, un composto cristallino di formula (5) può avere un punto di fusione da circa 205 a circa 215 °C. Per esempio, il composto può avere un punto di fusione da circa 211 a circa 213 °C. In alcune forme di realizzazione, la DSC di un composto cristallino di formula (5) ha una temperatura

massima endotermica netta a circa 212 °C, ad esempio, derivante dalla fusione e dalla decomposizione della forma cristallina del composto.

Un pattern di diffrazione dei raggi X su polveri di un composto cristallino di formula (5) ha picchi di diffrazione caratteristici espressi in gradi  $2\theta$  ( $2\theta$ ). Per esempio, un composto cristallino di formula (5) può avere un picco caratteristico espresso in gradi  $2\theta$  a 6,10. In alcune forme di realizzazione, un composto cristallino di formula (5) ha un picco caratteristico espresso in gradi  $2\theta$  a 9,32. In alcune forme di realizzazione, un composto cristallino di formula (5) ha un picco caratteristico espresso in gradi  $2\theta$  a 10,10. In alcune forme di realizzazione, un composto cristallino di formula (5) ha un picco caratteristico espresso in gradi  $2\theta$  a 12,14. In alcune forme di realizzazione, un composto cristallino di formula (5) ha un picco caratteristico espresso in gradi  $2\theta$  a 13,94. In alcune forme di realizzazione, un composto cristallino di formula (5) ha un picco caratteristico espresso in gradi  $2\theta$  a 18,44. In alcune forme di realizzazione, un composto cristallino di formula (5) ha un picco caratteristico espresso in gradi  $2\theta$  a 20,38. In alcune forme di realizzazione, un composto cristallino di formula (5) ha un picco caratteristico espresso in gradi  $2\theta$  a 23,30. In alcune forme di realizzazione, un composto cristallino di formula (5) ha un pattern di diffrazione dei raggi X su polveri comprendente da 2 a 8 picchi caratteristici espressi in gradi  $2\theta$  a 6,10, 9,32, 10,10, 12,14, 13,94, 18,44, 20,38 e 23,30. Per esempio, un composto cristallino di formula (5) può

avere un pattern di diffrazione dei raggi X su polveri comprendente picchi caratteristici espressi in gradi  $2\theta$  a 6,10, 9,32, 10,10, 12,14, 13,94, 18,44, 20,38 e 23,30.

In alcune forme di realizzazione, un composto cristallino di formula (5) ha un picco caratteristico espresso in gradi  $2\theta$  a circa 6,1. In alcune forme di realizzazione, un composto cristallino di formula (5) ha un picco caratteristico espresso in gradi  $2\theta$  a circa 9,3. In alcune forme di realizzazione, un composto cristallino di formula (5) ha un picco caratteristico espresso in gradi  $2\theta$  a circa 10,1. In alcune forme di realizzazione, un composto cristallino di formula (5) ha un picco caratteristico espresso in gradi  $2\theta$  a circa 12,1. In alcune forme di realizzazione, un composto cristallino di formula (5) ha un picco caratteristico espresso in gradi  $2\theta$  a circa 13,9. In alcune forme di realizzazione, un composto cristallino di formula (5) ha un picco caratteristico espresso in gradi  $2\theta$  a circa 18,4. In alcune forme di realizzazione, un composto cristallino di formula (5) ha un picco caratteristico espresso in gradi  $2\theta$  a circa 20,4. In alcune forme di realizzazione, un composto cristallino di formula (5) ha un picco caratteristico espresso in gradi  $2\theta$  a circa 23,3. In alcune forme di realizzazione, un composto cristallino di formula (5) ha un pattern di diffrazione dei raggi X su polveri comprendente da 2 a 8 picchi caratteristici espressi in gradi  $2\theta$  a circa 6,1, 9,3, 10,1, 12,1, 13,9, 18,4, 20,4 e 23,3. In alcune forme di realizzazione, un composto cristallino di formula (5) ha un pattern di diffrazione dei raggi X su polveri

13

comprendente picchi caratteristici espressi in gradi  $2\theta$  a circa 6,1, 9,3, 10,1, 12,1, 13,9, 18,4, 20,4 e 23,3.

In alcune forme di realizzazione, un composto cristallino di formula (5) ha un pattern di diffrazione dei raggi X su polveri avente picchi caratteristici espressi in gradi  $2\theta$  a 6,10; 8,10; 9,32; 10,10; 11,00; 12,14; 12,50; 13,64; 13,94; 17,14; 17,52; 18,44; 20,38; 21,00; 22,26; 23,30; 24,66; 25,98; 26,02; 27,84; 28,00; 28,16; 29,98; 30,46; 32,98; 33,22; 34,52; e 39,46.

In alcune forme di realizzazione, un composto cristallino di formula (5) ha un pattern di diffrazione dei raggi X su polveri avente picchi caratteristici espressi in gradi  $2\theta$  a 6,1; 8,1; 9,3; 10,1; 11,0; 12,1; 12,5; 13,6; 13,9; 17,1; 17,5; 18,4; 20,4; 21,0; 22,3; 23,3; 24,7; 25,9; 26,0; 27,8; 28,0; 28,2; 30,0; 30,5; 33,0; 33,2; 34,5; e 39,5.

L'analisi di diffrazione dei raggi X su polveri (XRPD) è stata eseguita usando un diffrattometro a raggi X su polveri Shimadzu XRD-6000 usando radiazione Cu K $\alpha$ . Lo strumento è dotato di un tubo a raggi X a focale fine lunga. La tensione del tubo e l'amperaggio erano impostati rispettivamente a 40 kV e 40 mA. Le fenditure di divergenza e diffusione sono state impostate a 1 °C e la fenditura di ricezione è stata impostata a 0,15 mm. La radiazione diffratta è stata rilevata mediante rivelatore a scintillazione NAI. È stata usata una scansione continua  $\theta$ - $2\theta$  a 3°/min (0,4 sec/0,02°) da 2,5 a 40°  $2\theta$ . Uno standard di silicio è stato analizzato per controllare l'allineamento dello strumento. I dati sono stati raccolti e analizzati usando XRD-6100/7000 v.5.0. I campioni sono stati preparati

13

per l'analisi posizionandoli in un supporto di alluminio con inserto di silicio.

In alcune forme di realizzazione, un composto cristallino di formula (5) è un sale cristallino di un composto di formula (5). Per esempio, un sale cristallino di composto di formula (5) può essere selezionato dal gruppo costituito da: sali di citrato, tartrato, trifluoroacetato, metansolfonato, toluensolfonato, cloridrato e bromidrato. In alcune forme di realizzazione, un sale cristallino di un composto di formula (5) è un sale citrato. In alcune forme di realizzazione, il solido cristallino può esistere come cocristallo.

In alcune forme di realizzazione, un sale citrato cristallino di un composto di Formula (5) è sostanzialmente puro. In alcune forme di realizzazione, il punto di fusione del sale citrato cristallino di un composto di Formula (5) è nell'intervallo da circa 180 a circa 190 °C, per esempio, da circa 184 a circa 188 °C. In alcune forme di realizzazione, la DSC di un sale citrato cristallino di un composto di Formula (5) ha un massimo endotermico netto a circa 187 °C, ad esempio, derivante dalla fusione e dalla decomposizione della forma cristallina.

In alcune forme di realizzazione, un composto cristallino di formula (5) ha un pattern di diffrazione dei raggi X su polveri comprendente due o più picchi caratteristici espressi in gradi  $2\theta$  a 4,40; 7,22; 9,12; 12,36; 13,35; 14,34; 15,54; 16,14; 16,54; 17,00; 18,24; 18,58; 19,70; 19,90; 20,30; 20,42; 21,84; 22,02; 23,34; 23,84; 24,04; 24,08; 24,48; 24,76; 25,48; 26,18; 28,14; 28,20; 28,64; 29,64; 31,04; 31,84;

13

33,00; 33,20; 34,06; 34,30; 34,50; 35,18; 37,48; 37,90; e 39,48. Per esempio, un sale citrato cristallino di un composto di Formula (5) può avere un pattern di diffrazione dei raggi X su polveri avente picchi caratteristici espressi in gradi  $2\theta$  a 4,40; 7,22; 9,12; 12,36; 13,35; 14,34; 15,54; 16,14; 16,54; 17,00; 18,24; 18,58; 19,70; 19,90; 20,30; 20,42; 21,84; 22,02; 23,34; 23,84; 24,04; 24,08; 24,48; 24,76; 25,48; 26,18; 28,14; 28,20; 28,64; 29,64; 31,04; 31,84; 33,00; 33,20; 34,06; 34,30; 34,50; 35,18; 37,48; 37,90; e 39,48.

### ***Composizioni farmaceutiche***

I metodi forniti nel presente documento includono la fabbricazione e l'uso di composizioni farmaceutiche che includono qualsiasi dei composti forniti nel presente documento.

In alcune forme di realizzazione, i composti forniti nel presente documento possono essere formulati come descritto nel brevetto statunitense n. 7,737,112.

Nella presente sono altresì forniti metodi di complessazione di ciclodestrina per preparare una composizione farmaceutica di un inibitore del proteasoma peptidico (ad esempio, un composto come definito dalle rivendicazioni o un suo sale farmaceuticamente accettabile). Il metodo comprende la fornitura di una prima combinazione avente un inibitore del proteasoma peptidico, una o più ciclodestrine e acqua, in cui la prima combinazione è eterogenea e l'inibitore del proteasoma peptidico o il sale ha una bassa solubilità nella prima combinazione. Il metodo comprende inoltre l'alterazione del pH della prima combinazione per formare una

seconda combinazione, in cui la solubilità dell'inibitore del proteasoma peptidico nella seconda combinazione è maggiore della solubilità dell'inibitore del proteasoma peptidico nella prima combinazione. Per esempio, il metodo può includere porre a contatto la prima combinazione con un acido per formare la seconda combinazione. La seconda combinazione può essere ancora eterogenea, ma può ancora facilitare un aumento sufficiente della solubilità in modo tale che il processo di complessazione possa essere avviato e progredire. Ciò può consentire alla maggior parte dell'inibitore di essere complessato, mentre come miscela eterogenea attraverso complessazione parziale, o di completare la complessazione formando una soluzione omogenea. Nel caso di una miscela complessata eterogenea, una volta raggiunto un grado desiderato di solubilizzazione e complessazione, i solidi in eccesso possono essere rimossi per filtrazione a dare una soluzione omogenea.

Il termine "complessazione" come usato nel presente documento si riferisce alla formazione di un complesso di inclusione intermolecolare, o un'associazione intermolecolare, in soluzione e tra uno o più inibitori del proteasoma peptidico e una o più molecole di ciclodestrina. L'inclusione e/o l'associazione forniscono utilità come meccanismo per aumentare sostanzialmente la concentrazione dell'uno o più inibitori che possono essere ottenuti in soluzione acquosa rispetto alla dissoluzione in fase acquosa in un intervallo di pH simile senza l'agente complessante (vale a dire una o più molecole di ciclodestrina). In alcune forme di realizzazione, il rapporto tra ciclodestrina a basso contenuto di cloruro

B

(ad esempio, SBECD, ad esempio da una fonte di ciclodestrina a basso contenuto di cloruro, ad esempio, una SBECD a basso contenuto di cloruro):inibitore (ad esempio, carfilzomib) è 1:1. In altre forme di realizzazione, più di una ciclodestrina a basso contenuto di cloruro (ad esempio, ciascuna indipendentemente selezionata tra SBECD, una ciclodestrina a basso contenuto di cloruro basso e una SBECD a basso contenuto di cloruro) può essere complessata a carfilzomib. In alcune forme di realizzazione, il rapporto tra ciclodestrina a basso contenuto di cloruro (ad esempio, SBECD, a esempio da una fonte di ciclodestrina a basso contenuto di cloruro, ad esempio, una SBECD a basso contenuto di cloruro):inibitore (vale adire carfilzomib) è 1-5:1 (ad esempio, 1-4:1; 1-3:1; 1-2:1; 2-5:1, 2-4:1, 2-3:1). I rapporti di complessazione possono essere determinati usando, ad esempio, i metodi descritti nel presente documento.

Uno stato complessato o associato è evidente quando una concentrazione disciolta dell'uno o più inibitori è misurabile, tramite un metodo analitico convenzionale appropriato come HPLC, e la concentrazione supera sostanzialmente quella ottenibile attraverso la dissoluzione dell'uno o più inibitori in acqua senza presenza di una o più ciclodestrine. La soluzione complessata o associata di uno o più inibitori e una o più ciclodestrine può essere preparata in modo da superare la concentrazione in soluzione acquosa, dove l'una o più ciclodestrine sono assenti, il che è utile per formulare un composto medicinale di volume di iniezione e dose erogata opportuni. Inoltre, la soluzione complessata o

associata di uno o più inibitori presenta stabilità fisica (o altrimenti descritta come metastabilità) in cui l'inibitore rimane in una soluzione omogenea (senza precipitazione o cristallizzazione di particelle solide) per periodi di tempo più lunghi rispetto a quelli tipici per soluzioni dell'inibitore senza la presenza di una ciclodestrina. A causa di questa durata prolungata di rimanere una soluzione limpida, la nucleazione dei cristalli e la successiva deplezione di supersaturazione non si verificano per tutte le condizioni pratiche di uso come formulazione medicinale. Un approccio di indicizzazione descritto nel presente documento può essere usato per modellare e determinare i rapporti ciclodestrina:inibitori.

Molti farmaci di composti organici a piccole molecole hanno una solubilità dipendente dal pH. È frequente che un intervallo di pH appropriato per la somministrazione di un farmaco (come mediante iniezione in cui l'intervallo di pH tollerabile è generalmente considerato da 3 - 10,5 per la somministrazione endovenosa) non sia nello stesso pH in cui è possibile trovare sufficiente solubilità del farmaco in soluzione acquosa (per esempio a o al di sotto di pH 2). Per consentire un livello di concentrazione farmaceuticamente utile di farmaco in soluzione a un intervallo di pH accettabile e tollerabile per la somministrazione (ad esempio mediante iniezione), la complessazione o l'associazione del farmaco a una o più ciclodestrine come rivendicato qui è un metodo pratico. Può aumentare la concentrazione in soluzione che può essere ottenuta all'interno dell'intervallo di pH tollerabile per la somministrazione. Un tale aumento di concentrazione potrebbe essere per esempio da

13

inizialmente 1 - 100 microgrammi per millilitro senza una o più ciclodestrine, aumentata fino a 500 - 10.000 microgrammi per millilitro con una o più ciclodestrine. La complessazione o l'associazione è pertanto una tecnologia che permette a un composto altrimenti scarsamente idrosolubile di essere sufficientemente solubilizzato e sviluppato come composto farmaceuticamente utile. I tecnici del ramo comprendono che la quantità di una o più ciclodestrine richieste per ottenere una concentrazione desiderata e stato di stabilità fisica può variare. Di conseguenza, la quantità di ciclodestrina può essere determinata su una base di combinazione individuale usando metodi ben noti.

Per molecole di farmaco di base, la solubilità è solitamente potenziata a pH inferiore. In alcuni casi, ciò presenta anche sfide di stabilità e durata di conservazione se usata senza complessare o associare agenti come una o più ciclodestrine. Per esempio, una solubilità sufficiente può essere ottenuta mediante abbassamento del pH di una soluzione con un acido, tuttavia tale riduzione del pH può portare a reazioni di degradazione dalle condizioni acide. Si veda la Tabella 1 per i dati di solubilità acquosa intrinseca per carfilzomib che mostrano un aumento moderato della solubilità con riduzione del pH.

**Tabella 1:** Solubilità acquosa di carfilzomib in funzione del pH, senza ciclodestrine

<b>Solvente</b>	<b>Solubilità (mg/mL)</b>
<b>Acqua</b>	<b>0,002</b>

13

<b>Solvente</b>	<b>Solubilità (mg/mL)</b>
<b>Acqua/pH 5</b>	<b>0,002</b>
<b>Acqua/pH 3</b>	<b>0,02</b>
<b>Acqua/pH 1</b>	<b>1,8</b>

Esistono numerose vie di reazione di degradazione mediata da acidi per farmaci a piccole molecole e molecole biologiche, come idrolisi di ammidi in frammenti peptidici inattivi più piccoli, o apertura idrolitica di porzioni funzionali epossidiche funzionali. I prodotti di degradazione mediata da acidi possono essere privi di attività farmacologica, e possono essere composti tossici o genotossici anche a livelli in tracce. La complessazione o l'associazione di composti in condizioni di pH in cui la degradazione significativa viene evitata espande ulteriormente l'utilità delle ciclodestrine per facilitare lo sviluppo clinico e commerciale di composti che hanno caratteristiche di stabilità dipendenti dal pH.

È stata trovata una condizione di pH unica al fine di bilanciare le esigenze concorrenti di evitare reazioni collaterali di degradazione mediate da acidi che si verificano a pH basso con aumento della velocità di complessazione tramite abbassamento del pH. Sorprendentemente, è stato trovato che il pH di una soluzione acquosa ottenuta tramite l'aggiunta di determinate concentrazioni di acidi, per esempio acido citrico (intorno a pH da 2,5 a 3,0), è sufficiente a diminuire il pH per avviare la complessazione senza avviare livelli significativi di reazioni collaterali di degradazione. In questo stato, l'inibitore è stato parzialmente

solubilizzato dalla condizione di pH, ma non interamente. Di conseguenza esisteva una miscela eterogenea (ad esempio, uno slurry) dell'inibitore parzialmente disciolto nella soluzione acquosa di ciclodestrina e acido citrico, e parzialmente esistente come particelle solide (cristalli) dell'inibitore. Nel tempo (tipicamente da diverse ore a un giorno), la frazione disciolta di inibitore diventerebbe complessata o associata alla ciclodestrina. Questo processo consentirebbe a più particelle solide dell'inibitore di dissolversi e poi di complessarsi. Nel tempo, il trasferimento di massa può verificarsi dall'inibitore di fase inizialmente solida, all'inibitore di fase disciolta, a uno stato complessato disciolto dell'inibitore di ciclodestrina. Più comunemente, la complessazione di ciclodestrina viene ottenuta attraverso la formazione di una soluzione omogenea del composto da complessare. Per carfilzomib, la formazione di una soluzione omogenea richiederebbe un pH molto basso dove si verificherebbero reazioni di degradazione, come quelle con il cloruro di idrogeno acido forte che forma potenziali impurità genotossiche. In questo caso, era pratico e utile eseguire il processo di complessazione in uno stato eterogeneo alla condizione di pH più lieve di 2,5 - 3,0 usando acido citrico, un acido carbossilico debole. Una volta ottenuta la concentrazione bersaglio di inibitore complessato, il processo di complessazione di slurry è stato terminato rimuovendo per filtrazione qualsiasi particella solida non disciolta dell'inibitore. La soluzione omogenea risultante potrebbe poi essere regolata per il pH secondo necessità a un intervallo di pH adatto per la somministrazione

endovenosa (ad esempio, pH 3,5 usando idrossido di sodio acquoso). Inoltre, la soluzione complessata omogenea a pH regolato potrebbe essere diluita con acqua alla concentrazione esatta desiderata per la fase successiva della fabbricazione del prodotto e per garantire la precisione del titolo dichiarato in etichetta del prodotto medicinale.

L'effetto combinato della concentrazione di ciclodestrina e del pH sulla complessazione ha una capacità di solubilizzazione maggiore rispetto a se una delle due tecniche fosse stata usata da sola. Gli estensori di solubilizzazione sono relativamente indipendenti dalla temperatura che è opportuna per la fabbricazione per mantenere condizioni fredde più preferibili per la produzione dei prodotti sterili e minimizzare qualsiasi reazione di degradazione accelerata dalla temperatura.

Una seconda combinazione include complessi di un inibitore del proteasoma peptidico e una o più ciclodestrine. Tali complessi hanno idrosolubilità migliorata rispetto al solo inibitore del proteasoma peptidico. Per esempio, soluzioni omogenee di un composto di formula (5) (carfilzomib) possono essere ottenute a un pH farmaceuticamente utile (per esempio, circa 3,5) e a concentrazioni più elevate (per esempio, circa 5 mg/mL) di quelle che potrebbero essere ottenute senza una o più ciclodestrine e i processi di complessazione tra il composto e una o più ciclodestrine fornite nel presente documento.

Oltre ad aumentare la solubilità di un inibitore del proteasoma peptidico in soluzione, le formulazioni preparate mediante i metodi forniti

nel presente documento determinano soluzioni farmaceutiche aventi una stabilità sorprendente. Sebbene le elevate concentrazioni di inibitore del proteasoma ottenute mediante i metodi di lavorazione forniti nel presente documento possano non essere prevedibilmente stabili dal punto di vista termodinamico, è stato mostrato che le soluzioni non sono influenzate dalla temperatura di conservazione (ad esempio, le soluzioni possono essere stabili da -20 °C a 25 °C), dal ciclo di congelamento e scongelamento, e dalla liofilizzazione e ricostituzione. La stabilità dell'inibitore del proteasoma peptidico complessato e della ciclodestrina è sufficiente a tollerare regolazioni del pH dopo la complessazione senza la precipitazione. Questa stabilità della soluzione consente l'uso del materiale complessato in un intervallo di pH accettabile per iniezione, stabilità del prodotto e altri scopi farmaceutici. Di conseguenza, le composizioni farmaceutiche preparate mediante i metodi forniti nel presente documento possono essere considerate soluzioni supersature che non precipitano o diminuiscono in misura significativa nella concentrazione durante il loro uso in qualsiasi numero di applicazioni mediche (ad esempio, una composizione farmaceutica finale può essere stabile per un intervallo di almeno 1-5 giorni, e potenzialmente più lungo).

Una prima combinazione può essere preparata aggiungendo una forma solida dell'inibitore del proteasoma peptidico a una soluzione acquosa di una o più ciclodestrine. Quando l'inibitore del proteasoma peptidico è un composto di formula (5) o un suo sale farmaceuticamente accettabile, la concentrazione dell'una o più ciclodestrine nella soluzione

b

è da meno di circa l'1% potenzialmente fino al limite di solubilità dell'una o più ciclodestrine, per esempio, circa il 40%. In alcune forme di realizzazione, per scopi di fabbricazione, la concentrazione dell'una o più ciclodestrine in soluzione è da circa il 15% a circa il 30%. In alcune forme di realizzazione, ai fini della ricostituzione del prodotto farmaceutico finito come soluzione per la somministrazione terapeutica o pronta per l'ulteriore diluizione prima della somministrazione, la concentrazione dell'una o più ciclodestrine in soluzione è da circa il 5% a circa il 15%, per esempio, circa il 10%. Dopo l'ulteriore diluizione, questa concentrazione potrebbe essere ulteriormente ridotta come ritenuto appropriato per l'iniezione o altre vie di erogazione di farmaci. Il rapporto molare tra l'una o più ciclodestrine nella soluzione e il composto di formula (5) è da circa 0,5 a circa 100. In alcune forme di realizzazione, questo rapporto esiste come eccesso molare di ciclodestrina per spostare l'equilibrio di stabilità di complessazione per preferire lo stato complessato anziché lo stato non complessato. Per esempio, il rapporto molare (moli di ciclodestrina divisi per moli di inibitore del proteasoma) è da circa 10 a circa 20. In alcune forme di realizzazione, il rapporto peso/peso tra ciclodestrina e inibitore del proteasoma è da circa 30 a circa 60. L'eccessiva formazione di schiuma di soluzioni di ciclodestrina può essere una complicazione per processi di fabbricazione solidi. Sorprendentemente, l'aggiunta dell'inibitore del proteasoma peptidico alla soluzione acquosa di una o più ciclodestrine può controllare la formazione di schiuma della soluzione nella prima combinazione.

In alcune forme di realizzazione, una prima combinazione è costituita essenzialmente da un inibitore del proteasoma peptidico, una ciclodestrina e acqua.

La forma solida dell'inibitore del proteasoma peptidico aggiunto alla soluzione di ciclodestrina e acqua può essere una forma cristallina del composto come descritto nel presente documento (ad esempio, il composto può essere polimorfico o un polimorfo specifico come descritto nel presente documento). In alcune forme di realizzazione, la forma solida dell'inibitore del proteasoma peptidico è amorfa.

La prima combinazione è eterogenea (ad esempio, una sospensione o slurry). Tale soluzione può essere caratterizzata dalla percentuale in peso di solidi totali e dalla distribuzione granulometrica della soluzione. Per esempio, quando l'inibitore del proteasoma peptidico è un composto di formula (5) o un suo sale farmaceuticamente accettabile, la prima combinazione può avere una percentuale in peso di solidi totali da circa l'1% a circa il 45% (per esempio, da circa l'1% a circa il 40%; da circa l'1% a circa il 35%; da circa l'1% a circa il 30%; da circa l'1% a circa il 25%; da circa l'1% a circa il 20%; da circa l'1% a circa il 15%; da circa l'1% a circa il 10%; da circa il 5% a circa il 45%; da circa il 10% a circa il 45%; da circa il 12% a circa il 45%; da circa il 15% a circa il 45%; da circa il 20% a circa il 45%; da circa il 25% a circa il 45%; da circa il 30% a circa il 45%; da circa il 35% a circa il 45%; da circa il 5% a circa il 35%; da circa il 10% a circa il 40%; da circa il 15% a circa il 37%; e da circa 18% a circa 36%). In alcune forme di realizzazione, la prima

combinazione può avere una percentuale in peso di solidi da circa il 20% a circa il 33%. In alcune forme di realizzazione, la prima combinazione può avere una percentuale in peso di solidi da circa il 30% a circa il 33%. Nel corso del tempo di fabbricazione, la proporzione di solidi che sono disciolti rispetto alla proporzione non disciolta può variare a seconda della solubilità e dell'entità della complessazione. Inizialmente, l'una o più ciclodestrine sono molto idrosolubili, e l'inibitore è moderatamente solubile, rimanendo in tal modo principalmente come miscela eterogenea o slurry.

In alcune forme di realizzazione, la prima combinazione ha una distribuzione granulometrica con particelle primarie di diametro che varia da meno di circa 1 micrometro a circa 300 micrometri o più (ad esempio, da circa 1  $\mu\text{m}$  a circa 200  $\mu\text{m}$ ; da circa 1  $\mu\text{m}$  a circa 150  $\mu\text{m}$ ; da circa 1  $\mu\text{m}$  a circa 125  $\mu\text{m}$ ; da circa 1  $\mu\text{m}$  a circa 100  $\mu\text{m}$ ; da circa 1  $\mu\text{m}$  a circa 50  $\mu\text{m}$ ; da circa 1  $\mu\text{m}$  a circa 10  $\mu\text{m}$ ; da circa 5  $\mu\text{m}$  a circa 300  $\mu\text{m}$ ; da circa 25  $\mu\text{m}$  a circa 300  $\mu\text{m}$ ; da circa 50  $\mu\text{m}$  a circa 300  $\mu\text{m}$ ; da circa 60  $\mu\text{m}$  a circa 300  $\mu\text{m}$ ; da circa 75  $\mu\text{m}$  a circa 300  $\mu\text{m}$ ; da circa 100  $\mu\text{m}$  a circa 300  $\mu\text{m}$ ; da circa 125  $\mu\text{m}$  a circa 300  $\mu\text{m}$ ; da circa 150  $\mu\text{m}$  a circa 300  $\mu\text{m}$ ; da circa 200  $\mu\text{m}$  a circa 300  $\mu\text{m}$ ; da circa 225  $\mu\text{m}$  a circa 300  $\mu\text{m}$ ; da circa 250  $\mu\text{m}$  a circa 300  $\mu\text{m}$ ; da circa 5  $\mu\text{m}$  a circa 150  $\mu\text{m}$ ; da circa 25  $\mu\text{m}$  a circa 200  $\mu\text{m}$ ; da circa 50  $\mu\text{m}$  a circa 125  $\mu\text{m}$ ; da circa 10  $\mu\text{m}$  a circa 100  $\mu\text{m}$ ; da circa 75  $\mu\text{m}$  a circa 225  $\mu\text{m}$ ; e da circa 100  $\mu\text{m}$  a circa 200  $\mu\text{m}$ ). Le particelle primarie possono esistere come particelle discrete o come agglomerati composti da una o molte particelle primarie.

13

Agglomerati di particelle primarie possono avere dimensioni sostanzialmente più grandi rispetto alle particelle primarie. In tal modo è utile incorporare un dispositivo di miscelazione a elevata energia, come un miscelatore a elevato sforzo di taglio (spesso configurato come un miscelatore statore rotore), oltre a un miscelatore a girante in sospensione generico. Il miscelatore a elevata energia nel tempo da circa 5 minuti a circa 90 minuti (ad esempio da circa 5 minuti a circa 80 minuti; da circa 5 minuti a circa 75 minuti; da circa 5 minuti a circa 60 minuti; da circa 5 minuti a circa 45 minuti; da circa 5 minuti a circa 30 minuti; da circa 10 minuti a circa 90 minuti; da circa 15 minuti a circa 90 minuti; da circa 30 minuti a circa 90 minuti; da circa 45 minuti a circa 90 minuti; da circa 50 minuti a circa 90 minuti; da circa 75 minuti a circa 90 minuti; da circa 15 minuti a circa 75 minuti; da circa 20 minuti a circa 70 minuti; da circa 30 minuti a circa 70 minuti; da circa 45 minuti a circa 75 minuti; e da circa 10 minuti a circa 45 minuti), per esempio, nel tempo di circa 60 minuti, si frantumeranno grandi agglomerati in particelle primarie disperse nella soluzione di ciclodestrina. Un'ulteriore miscelazione può aiutare disgregando le particelle primarie in frammenti più piccoli di particelle primarie. Questa progettazione di processo facilita un metodo solido in cui l'uno o più sistemi di miscelazione ottengono particelle primarie essenzialmente disperse di distribuzione dimensionale che varia da meno di circa 1 micrometro fino a circa 30 micrometri, per esempio, fino a circa 10 micrometri indipendentemente dalla distribuzione dimensionale e dai gradi di agglomerazione dei solidi di inibitore del

proteosoma. Pertanto, la variabilità inter-lotto della distribuzione granulometrica dell'inibitore del proteosoma non è significativa per elaborare le prestazioni poiché l'uno o più sistemi di miscelazione riducono gli agglomerati e le particelle primarie tipicamente nell'intervallo di distribuzione granulometrica preferibile. Per esempio, la prima combinazione può avere una distribuzione granulometrica inizialmente da meno di circa 1 micrometro fino a circa 10.000 micrometri a una distribuzione dimensionale inferiore a circa 1 micrometro fino a circa 30 micrometri dopo l'applicazione della fase di miscelazione a elevata energia.

In alcune forme di realizzazione, la prima combinazione è sostanzialmente priva di solvente organico. Per esempio, l'acqua nella prima combinazione può essere acqua per preparazioni iniettabili (WFI). In alcune forme di realizzazione, la prima combinazione è sostanzialmente priva di tampone (ad esempio, la prima combinazione manca di un acido tampone o di una base tampone).

Il metodo può inoltre comprendere la miscelazione della prima combinazione prima di alterare il pH della prima combinazione come mediante l'uso di un miscelatore ad elevato sforzo di taglio e una girante regolare. Il miscelatore generale può essere azionato, per esempio, a qualsiasi velocità di rotazione sufficiente a mantenere la sospensione di particelle fuori dal fondo del serbatoio di miscelazione. La velocità di miscelazione è una funzione della geometria del serbatoio e della girante tra altri fattori ed è sufficientemente determinata dai tecnici del ramo

tramite l'aspetto visivo dello slurry o della soluzione di miscelazione. Analogamente, la velocità del miscelatore ad alto sforzo di taglio dipende, per esempio, dal diametro dell'elemento di miscelazione, dalla geometria dello statore, dalla larghezza dello spazio vuoto e da altri fattori. L'energia immessa nello slurry può essere determinata tramite calcoli teorici o tramite misurazioni empiriche. In alternativa, la velocità di miscelazione a elevato sforzo di taglio e la durata del funzionamento ad alta velocità possono essere determinate dai tecnici del ramo tramite osservazione microscopica di campioni di slurry dopo varie velocità di miscelazione e combinazioni temporali. Dopo la disagglomerazione e la riduzione delle particelle primarie è possono essere applicati velocità e tempo di miscelazione a elevato sforzo di taglio in eccesso senza danneggiare il processo. Per esempio, in alcune forme di realizzazione, la miscelazione può includere l'agitazione della prima combinazione a una velocità da circa 500 rpm a circa 10.000 rpm. Per esempio, la miscelazione a elevato sforzo di taglio può essere effettuata a una velocità da circa 2.000 rpm a circa 3.500 rpm. Per miscelatori e serbatoi più piccoli e più grandi, le velocità rilevanti possono cambiare in modo significativo.

La miscelazione della prima combinazione può essere effettuata a una temperatura da circa 0 °C a circa 30 °C (ad esempio da circa 5 °C a circa 25 °C; da circa 10 °C a circa 30 °C; da circa 15 °C a circa 25 °C; da circa 5 °C a circa 20 °C; da circa 2 °C a circa 22 °C; e da circa 20 °C a circa 30 °C). In alcune forme di realizzazione, la miscelazione della prima combinazione viene effettuata per un tempo sufficiente a ottenere

una distribuzione granulometrica che varia da meno di circa 1 micrometro a circa 30 micrometri nella prima combinazione. La miscelazione della prima combinazione viene effettuata per un periodo di tempo da circa 30 minuti a circa 90 minuti, per esempio 60 minuti.

L'alterazione del pH della prima soluzione può includere l'aumento o la diminuzione del pH della prima soluzione mediante aggiunta di un acido o una base. In alcune forme di realizzazione, quando l'inibitore del proteasoma peptidico è un composto di formula (5) o un suo sale farmaceuticamente accettabile, il pH della prima combinazione è da circa 4 a circa 7. In alcune forme di realizzazione viene aggiunto un acido per alterare il pH, come un acido inorganico o organico. Esempi di acidi includono acido lattico, acido acetico, acido formico, acido citrico, acido ossalico, acido urico, acido succinico, acido maleico, acido fumarico, acido benzoico, acido tartarico, glicina cloridrato, bisolfato (esistente, per esempio, come sale di sodio, potassio o ammonio) e acido fosforico o sali di fosfato. In alcune forme di realizzazione, l'acido è un acido organico. In alcune forme di realizzazione, l'acido è acido citrico. Un acido adatto può avere uno o più valori di pKa, con una prima pKa da circa -6 a circa +5. Per esempio, l'acido ha una prima pKa nell'intervallo da circa +1 a circa +4,5. In alcune forme di realizzazione, l'acido ha una prima pKa nell'intervallo da circa +1,5 a circa +3,5. Si veda, per esempio, Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, Eds. P. Heinrich Stahl e Camille G. Wermuth, Verlag Helvetica Chimica Acta (Svizzera) 2002, 336-341.

In alcune forme di realizzazione, per composti in cui la solubilità e la complessazione sono di fatto potenziate tramite l'aumento del pH, il pH viene alterato dall'aggiunta di una base, per esempio, una base inorganica o organica. Esempi di basi inorganiche includono idrossido di sodio, idrossido di potassio, idrossido di ammonio, idrossido di calcio, idrossido di magnesio e sali di carbonato o bicarbonato di sodio, potassio o ammonio. Esempi di basi organiche includono piridina, metil ammina, trietil ammina, imidazolo, benzimidazolo, istidina e una base fosfazenica. Una base organica può avere una  $pK_b$  o una prima  $pK_b$  da circa -6 a circa +10. La  $pK_a$  o  $pK_b$  rilevanti dell'acido o della base devono essere rispettivamente in un intervallo sufficiente per ottenere un certo aumento della solubilità dell'inibitore. In alcune forme di realizzazione, l'acido o la base viene aggiunto/a sotto forma di una soluzione acquosa (ad esempio, una soluzione acquosa di un acido).

L'alterazione del pH della prima soluzione determina la formazione di una seconda combinazione in cui l'inibitore del proteasoma peptidico è più solubile rispetto alla prima combinazione. Per esempio, un inibitore del proteasoma peptidico può essere almeno circa il 10% più solubile (per esempio, almeno circa il 100%, almeno circa il 150%, almeno circa il 200%, almeno circa il 250%, almeno circa il 400%, almeno circa il 500%, almeno circa il 1000%, almeno circa il 1250%, almeno circa il 1500%, almeno circa il 2000%, almeno circa il 2500%, almeno circa il 3000%, almeno circa il 4000%, almeno circa il 5000%, almeno circa il 5500%, almeno circa il 6000%, almeno circa il 7500%, almeno circa

l'8000%, almeno circa il 9000% e almeno circa il 10.000% più solubile) nella seconda combinazione rispetto alla solubilità dell'inibitore nella prima combinazione.

Senza essere vincolati dalla teoria, l'alterazione del pH della prima combinazione avvia la complessazione dell'una o più ciclodestrine e dell'inibitore del proteasoma peptidico. L'aumento della complessazione altera l'equilibrio della soluzione, innescando una complessazione aggiuntiva, e infine determina la solubilizzazione dell'inibitore del proteasoma peptidico. Dopo l'aggiunta dell'additivo, la seconda combinazione può essere miscelata per un tempo sufficiente a ottenere una miscela eterogenea con inibitore sufficientemente solubilizzato e complessato, o una terza combinazione omogenea dove tutto l'inibitore è stato complessato e nessuno rimane come solidi non disciolti. Per esempio, la concentrazione dell'inibitore del proteasoma nella terza combinazione può essere da circa 1 a circa 18 mg/mL, per esempio, da circa 2 a circa 8 mg/mL, da circa 4 a circa 6 mg/mL o da circa 5 a circa 6 mg/mL. In alcune forme di realizzazione, il pH della terza combinazione è da circa 1,5 a circa 4, per esempio, da circa 2 a circa 3,5 o da circa 2,5 a circa 3,5. Considerando i casi in cui una complessazione sufficiente può essere ottenuta senza necessariamente dissolvere e complessare l'intera massa dell'inibitore presente come slurry, può essere utile terminare il processo di complessazione una volta ottenuta una concentrazione bersaglio. In questi casi, una soluzione omogenea di concentrazione desiderata dell'inibitore può essere ottenuta tramite

filtrazione del contenuto di solidi in eccesso dell'inibitore. Ciò lascia l'inibitore complessato e l'una o più ciclodestrine in una soluzione funzionalmente stabile, anche se l'equilibrio dinamico di complessazione e solubilizzazione può implicare uno stato non termodinamicamente stabile.

La complessazione dell'inibitore del proteasoma peptidico nella terza combinazione è almeno circa il 50% (ad esempio, almeno circa il 55%, almeno circa il 60%, almeno circa il 65%, almeno circa il 70%, almeno circa il 75%, almeno circa l'80%, almeno circa l'85%, almeno circa il 90%, almeno circa il 92%, almeno circa il 94%, almeno circa il 95%, almeno circa il 96%, almeno circa il 97%, almeno circa il 98%, almeno circa il 99%). In alcune forme di realizzazione, la complessazione dell'inibitore del proteasoma peptidico nella terza combinazione è almeno circa il 99%. Plausibilmente, per alcune combinazioni di concentrazione di ciclodestrina, concentrazione di inibitore, pH e tempo di complessazione è possibile preparare una soluzione complessa al 100% dell'inibitore, dove la miscela diventa omogenea.

In alcune forme di realizzazione, il metodo descritto sopra viene eseguito in un singolo recipiente. Per esempio, la miscelazione dello slurry di complessazione nel metodo può essere eseguita usando un miscelatore a elevato sforzo di taglio (ad esempio un omogeneizzatore) all'interno di un serbatoio di miscelazione a camicia a temperatura controllata.

Nella presente è fornito un metodo per preparare una composizione farmaceutica di un composto di formula (5) o una sua forma di sale farmaceuticamente accettabile, il metodo comprendendo la fornitura di una prima combinazione di un composto di formula (5), una o più ciclodestrine e acqua, in cui la prima combinazione è eterogenea e il composto o il sale ha una bassa solubilità nella prima combinazione. In alcune forme di realizzazione, almeno una dell'una o più ciclodestrine è SBECD e l'acqua è WFI. Il metodo comprende inoltre porre a contatto la prima combinazione con un acido per formare una seconda combinazione, in cui il composto è più solubile nella seconda combinazione rispetto alla prima combinazione. In alcune forme di realizzazione, l'acido è un acido citrico (ad esempio, una soluzione acquosa di acido citrico).

Un esempio del metodo include la fornitura di una prima combinazione che include acqua (ad esempio, WFI), SBECD e il composto di formula (5) o un suo sale farmaceuticamente accettabile in un recipiente. In alcune forme di realizzazione, l'acqua e SBECD sono miscelate prima dell'aggiunta del composto. La prima combinazione può essere miscelata fino a ottenere una soluzione eterogenea (ad esempio, da circa 30 a circa 90 minuti, da circa 40 a circa 80 minuti, e da circa 50 a circa 70 minuti). In alcune forme di realizzazione, la prima combinazione viene miscelata per circa 60 minuti. Se il composto si agglomera nella prima combinazione, è possibile ridurre la granulometria di qualsiasi composto agglomerato. Una volta ottenuta una miscela

h

eterogenea (ad esempio, uno slurry), viene aggiunto un acido (ad esempio, un acido organico come acido citrico) alla prima combinazione per preparare una seconda combinazione. In alcune forme di realizzazione, l'acido viene aggiunto come soluzione acquosa. La miscelazione può poi essere continuata fino alla preparazione di una terza combinazione omogenea, o per periodi di tempo minori rimanendo come miscela eterogenea con un grado desiderato di complessazione e solubilizzazione raggiunto. In alcune forme di realizzazione, la miscelazione della seconda combinazione viene condotta per un tempo che varia da circa 1 a circa 48 ore, per esempio fino a 18 ore. In alcune forme di realizzazione, la miscelazione della seconda combinazione viene condotta per circa 12 ore. Per esempio, la miscelazione può essere condotta per circa sei ore. In alcune forme di realizzazione, una concentrazione del composto nella terza combinazione varia da circa 1 a circa 15 mg/mL (ad esempio, da circa 3 a circa 12 mg/mL, da circa 4 a circa 8 mg/mL, circa 5 mg/mL). In alcune forme di realizzazione, il metodo è usato per preparare una soluzione del composto iniettabile. In altre forme di realizzazione, il metodo viene usato per preparare una soluzione di liofilizzazione come prodotto farmaceutico finito aseptico che può essere conservato, trasportato e ricostituito con acqua o altro veicolo quando pronto essere iniettato in un paziente.

Le composizioni farmaceutiche ottenute come prodotti sterili usando le procedure descritte nel presente documento sono tipicamente fabbricate applicando tecniche asettiche e filtrazione sterile prima del

riempimento nell'unità di confezionamento primario (ad esempio fiale di vetro), a meno che la preparazione non implicasse una fase di sterilizzazione e non si verificasse alcuna contaminazione prima dell'uso.

La composizione di inibitore del proteasoma peptidico disciolta in tampone acquoso o in soluzione acquosa, per esempio, dopo la filtrazione sterile, può essere facoltativamente liofilizzata (in un contenitore privo di contaminanti e a prova di contaminanti) e ricostituita in diluente acquoso appropriato appena prima dell'uso. In determinate forme di realizzazione, una composizione farmaceutica liofilizzata come fornita nel presente documento include carfilzomib, ad esempio KYPROLIS, che contiene 60 mg di carfilzomib, beta-ciclodestrina solfobutiletere 3000 mg, acido citrico 57,7 mg e idrossido di sodio per la regolazione del pH (pH bersaglio 3,5).

In alcune forme di realizzazione, il diluente è acqua sterile per preparazioni iniettabili (WFI). In alcune forme di realizzazione, il diluente è un tampone sterile (ad esempio, un tampone citrato). In alcune forme di realizzazione, il diluente comprende acido citrico. In determinate forme di realizzazione, la ricostituzione può essere effettuata secondo il seguente protocollo (ad esempio, per ottenere una concentrazione di carfilzomib di 2 mg/mL):

1. Rimuovere la fiala dal frigorifero appena prima dell'uso.
2. Ricostituire in modo asettico ciascuna fiala iniettando lentamente acqua sterile per preparazioni iniettabili 29 mL, USP,

13

indirizzando la soluzione sulla PARETE INTERNA DELLA FIALA per minimizzare la formazione di schiuma.

3. Girare delicatamente e/o capovolgere lentamente la fiala per circa 1 minuto o fino al verificarsi della dissoluzione completa di qualsiasi torta o polvere. NON AGITARE per evitare la generazione di schiuma. Se si verifica la formazione di schiuma, lasciare riposare la soluzione nella fiala da circa 2 a 5 minuti, fino a quando la formazione di schiuma svanisce.

4. Dopo la ricostituzione, KYPROLIS è pronto per la somministrazione endovenosa. Il prodotto ricostituito deve essere una soluzione limpida incolore. Se si osserva qualsiasi scolorimento o materia particellare, non usare il prodotto ricostituito.

5. Quando somministrato in una sacca endovenosa, prelevare la dose calcolata dalla fiala e diluire in iniezione di destrosio al 5% 50 mL, sacca endovenosa USP.

6. Gettare immediatamente la fiala contenente la porzione inutilizzata.

Nelle composizioni fornite nel presente documento, una fonte di controllo del pH è un tampone. Tipicamente, un tampone è presente rispettivamente come acido o base e la sua base o acido coniugato. In una forma di realizzazione, l'intervallo del sale tamponante è 1-100 mM. Per esempio, l'intervallo di sale tamponante può essere 5-50 mM (ad esempio, circa 10 mM (in formulazioni solide, la quantità di tampone è selezionata per produrre questa concentrazione dopo la

13

ricostituzione/diluizione)). La concentrazione del tampone e il pH della soluzione possono essere scelti per dare un equilibrio ottimale di solubilità e stabilità.

Esempi di tamponi adatti includono miscele di acidi deboli e sali di metalli alcalini (ad esempio sodio, potassio) della base coniugata di acidi deboli come tartrato di sodio e citrato di sodio. In alcune forme di realizzazione, il tampone è citrato di sodio/acido citrico.

La solubilizzazione di farmaci scarsamente idrosolubili mediante complessazione di ciclodestrina è stata ampiamente studiata. Le ciclodestrine sono oligosaccaridi ciclici che sono costituiti da 6, 7 o 8 unità di glucosio ( $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD) unite da legami  $\alpha$ -1,4. I diametri interni di  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD sono rispettivamente in modo approssimativo 5 Å, 6 Å, 8 Å. La cavità interna è relativamente idrofoba a causa dei gruppi  $\text{CH}_2$  ed etere, mentre l'esterno, costituito da gruppi idrossile primari e secondari, è più polare. L'acqua all'interno della cavità tende a essere sostituita da altre molecole non polari. La capacità delle ciclodestrine di formare complessi di inclusione non covalenti con molecole che si adattano parzialmente all'interno della sua cavità non polare porta alla solubilizzazione del farmaco.

Due derivati di  $\beta$ -CD idrosolubili di interesse farmaceutico sono solfobutil eter beta-ciclodestrina (SBECD) e idrossipropil beta-ciclodestrina (HPCD), entrambe le quali hanno mostrato di essere sicure e ben tollerate. Sia SBECD (nome commerciale Captisol®) sia HPCD

(nome commerciale Kleptose®) sono usati in prodotti endovenosi disponibili in commercio.

Le ciclodestrine, come fornite nel presente documento, includono alfa-, beta- e gamma-ciclodestrina. In una forma di realizzazione, l'una o più ciclodestrine sono una  $\beta$ -ciclodestrina sostituita o non sostituita, presente, per esempio, dal 5 al 35% (p/v). In alcune forme di realizzazione, la quantità di una ciclodestrina è circa del 25% (p/v). In una determinata forma di realizzazione, la quantità di una ciclodestrina in una formulazione adatta per l'iniezione è circa del 10% (p/v). In un'altra forma di realizzazione, l'una o più ciclodestrine sono una  $\beta$ -ciclodestrina sostituita. Le ciclodestrine sostituite aumentano la solubilità della ciclodestrina e mitigano gli effetti tossici associati alle ciclodestrine non sostituite. Esempi di  $\beta$ -ciclodestrine sostituite includono quelle sostituite con uno o più gruppi idrofili, come monosaccaride (ad esempio, glucosile, maltosile), carbossialchile (ad esempio, carbossimetile, carbossietile), beta-ciclodestrina idrossialchil-sostituita (ad esempio, idrossietile, 2-idrossipropile) e solfoalchiletere-sostituita. Beta-ciclodestrine particolarmente adatte includono idrossipropil beta-ciclodestrina (HPBCD) e beta-ciclodestrina solfobutiletere (SBECD). In alcune forme di realizzazione, la ciclodestrina è SBECD. Tuttavia, resta inteso che tipicamente qualsiasi sostituzione alla ciclodestrina, inclusa la sostituzione mediante gruppi idrofobi come alchili, migliorerà la sua solubilità acquosa disgregando la rete di legami idrogeno all'interno del reticolo cristallino della ciclodestrina solida, riducendo in tal modo

l'energia reticolare del solido. Il grado di sostituzione non è ritenuto critico; tuttavia, in alcune forme di realizzazione, il grado di sostituzione è almeno dell'1% e tipicamente dal 2% al 10%, come dal 3% al 6%.

In alcune forme di realizzazione possono essere usate una o più ciclodestrine. Per esempio, una miscela di due o più ciclodestrine può essere usata per complessare un inibitore del proteasoma peptidico fornito nel presente documento. In alcune forme di realizzazione, captisolo e cleptosio possono essere usati per complessare l'inibitore del proteasoma peptidico carfilzomib.

Gli inventori hanno scoperto che può essere vantaggioso minimizzare la quantità di ione cloruro (o altri anioni nucleofili) nei metodi e nelle composizioni farmaceutiche descritti nel presente documento.

Almeno una tra l'una o più ciclodestrine (aggiunte alla prima combinazione) è una ciclodestrina a basso contenuto di cloruro. Come usato nel presente documento, una "ciclodestrina a basso contenuto di cloruro" si riferisce a una ciclodestrina contenente cloruro avente meno di o uguale a cloruro di sodio allo 0,05% p/p, o se è presente una o più fonti di cloruro diverse da (o oltre a) cloruro di sodio, una "ciclodestrina a basso contenuto di cloruro" si riferisce a una ciclodestrina contenente cloruro avente un contenuto di ioni cloruro che è inferiore o uguale alla quantità di cloruro che sarebbe presente in una ciclodestrina avente cloruro di sodio allo 0,05% p/p. In alcune forme di realizzazione, la ciclodestrina a basso contenuto di cloruro è una SBECD a basso contenuto di cloruro. La determinazione della concentrazione di cloruro

può essere determinata mediante una varietà di metodi noti nell'arte (ad esempio, per ciclodestrine ottenute in commercio dalla specifica del prodotto del produttore, ad esempio, mediante tecniche gravimetriche, ad esempio, mediante tecniche potenziometriche).

In alcune forme di realizzazione, almeno una dell'una o più ciclodestrine (aggiunte alla prima combinazione) non include una quantità rilevabile di ione cloruro.

In alcune forme di realizzazione, la quantità di ione cloruro presente è sufficientemente bassa da fornire una durata di conservazione di 2 anni quando conservato a 2-8 gradi C. In determinate forme di realizzazione è presente ione cloruro, e la quantità di ione cloruro presente è sufficientemente bassa da fornire una durata di conservazione di 2 anni quando conservato a 2-8 gradi C.

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione non è superiore a 2,0. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione è diverso da 0, ma inferiore a 2,0).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione non è superiore a 1,5. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione è diverso da 0, ma inferiore a 1,5).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione non è superiore a 1,2. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione è diverso da 0, ma inferiore a 1,2).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione non è superiore a 1,0. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione è diverso da 0, ma inferiore a 1,0).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione non è superiore a 0,9. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione è diverso da 0, ma inferiore a 0,9).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione non è superiore a 0,8. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione è diverso da 0, ma inferiore a 0,8).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione non è superiore a 0,7. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione

B

cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione è diverso da 0, ma inferiore a 0,7).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione non è superiore a 0,6. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione è diverso da 0, ma inferiore a 0,6).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione non è superiore a 0,5. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione è diverso da 0, ma inferiore a 0,5).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione non è superiore a 0,4. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione è diverso da 0, ma inferiore a 0,4).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione non è superiore a 0,3. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione è diverso da 0, ma inferiore a 0,3).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione non è superiore a 0,2. In

b

determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione è diverso da 0, ma inferiore a 0,2).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione non è superiore a 0,1. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione è diverso da 0, ma inferiore a 0,1).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione è da 0,2 a 1,2 (ad esempio, da 0,3 a 1,2, ad esempio, da 0,2 a 0,4, ad esempio, da 0,3 a 0,4, ad esempio, 0,32).

In forme di realizzazione, i rapporti molari tra ione cloruro e composto descritto nel presente documento possono anche essere presenti nella seconda e/o terza combinazione.

In un aspetto sono contenute composizioni farmaceutiche che sono preparate mediante uno qualsiasi dei metodi descritti nel presente documento e hanno un rapporto molare tra ione cloruro e composto che non è superiore a 2,0. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche è diverso da 0, ma inferiore a 2,0).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche non è superiore a

1,5. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche è diverso da 0, ma inferiore a 1,5).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche non è superiore a 1,2. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche è diverso da 0, ma inferiore a 1,2).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche non è superiore a 1,0. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche è diverso da 0, ma inferiore a 1,0).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche non è superiore a 0,9. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche è diverso da 0, ma inferiore a 0,9).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche non è superiore a 0,8. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche è diverso da 0, ma inferiore a 0,8).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche non è superiore a 0,7. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche è diverso da 0, ma inferiore a 0,7).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche non è superiore a 0,6. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche è diverso da 0, ma inferiore a 0,6).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche non è superiore a 0,5. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche è diverso da 0, ma inferiore a 0,5).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche non è superiore a 0,4. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche è diverso da 0, ma inferiore a 0,4).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche non è superiore a 0,3. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo

B

ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche è diverso da 0, ma inferiore a 0,3).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche non è superiore a 0,2. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche è diverso da 0, ma inferiore a 0,2).

In alcune forme di realizzazione, il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche non è superiore a 0,1. In determinate forme di realizzazione è presente almeno un certo ione cloruro (vale a dire che il rapporto molare tra ione cloruro e composto nelle composizioni farmaceutiche è diverso da 0, ma inferiore a 0,1).

In alcune forme di realizzazione, le composizioni farmaceutiche non includono una quantità rilevabile di ione cloruro.

Nei metodi descritti nel presente documento, le composizioni fornite nel presente documento (ad esempio, soluzioni di ciclodestrina, prime combinazioni, seconde combinazioni, terze combinazioni e composizioni farmaceutiche) hanno basse concentrazioni di qualsiasi ione nucleofilo forte (ad esempio, ione cloruro, ione bromuro, ione fluoruro e ione ioduro). Per esempio, una soluzione può avere una concentrazione di ioni nucleofili fino a e includente  $8,5 \times 10^{-3}$  M. In alcune forme di realizzazione, soluzioni aventi basso contenuto di ioni nucleofili possono essere acquistate in commercio o possono essere preparate usando la tecnologia nota nell'arte, incluse, per esempio, nanofiltrazione,

13

ultrafiltrazione, diafiltrazione, cromatografia a scambio ionico, osmosi inversa ed elettrolisi.

In alcune forme di realizzazione, una composizione farmaceutica come fornita nel presente documento comprende fino a e inclusi  $8,5 \times 10^{-3}$  M di uno ione nucleofilo. In alcune forme di realizzazione, lo ione nucleofilo è presente come sale, per esempio, un sale sodico, ma il sale nucleofilo potrebbe esistere in soluzione con cationi diversi dal sodio (ad esempio cationi idrogeno, potassio, magnesio e calcio). In alcune forme di realizzazione, una composizione farmaceutica come fornita nel presente documento comprende fino a  $8,5 \times 10^{-3}$  M di uno ione nucleofilo. Per esempio, una composizione farmaceutica comprende meno di  $8,5 \times 10^{-3}$  M di uno ione nucleofilo.

Nei metodi descritti nel presente documento, le composizioni fornite nel presente documento (ad esempio, soluzioni di ciclodestrina, prime combinazioni, seconde combinazioni, terze combinazioni, e composizioni farmaceutiche) hanno basse concentrazioni di ione cloruro. Per esempio, una soluzione può avere una concentrazione di ioni cloruro fino a e incluso lo 0,03% (p/v) (per esempio, dallo 0 allo 0,03%; dallo 0,01 allo 0,03%; dallo 0,015 allo 0,03%; dallo 0,02 allo 0,03%; dallo 0,025 allo 0,03%; dallo 0 allo 0,025%; dallo 0 allo 0,2%; dallo 0 allo 0,01%; dallo 0,005% allo 0,025%; e dallo 0,015% allo 0,025%). In alcune forme di realizzazione, soluzioni aventi un basso contenuto di ione cloruro possono essere acquistate in commercio o possono essere preparate usando la tecnologia nota nell'arte, incluse, per esempio, nanofiltrazione,

ultrafiltrazione, diafiltrazione, cromatografia a scambio ionico, osmosi inversa ed elettrolisi.

In alcune forme di realizzazione, una composizione farmaceutica come fornita nel presente documento comprende fino a e includente lo 0,03% (p/v) di uno ione cloruro. In alcune forme di realizzazione, lo ione cloruro è presente come sale, per esempio, cloruro di sodio, ma il sale cloruro potrebbe esistere in soluzione con cationi diversi dal sodio (ad esempio cationi idrogeno, potassio, magnesio e calcio). In alcune forme di realizzazione, una composizione farmaceutica come fornita nel presente documento comprende fino allo 0,03% (p/v) di uno ione cloruro. Per esempio, una composizione farmaceutica comprende meno dello 0,03% (p/v) di uno ione cloruro.

Nei metodi descritti nel presente documento, le composizioni fornite nel presente documento (ad esempio, soluzioni di ciclodestrina, prime combinazioni, seconde combinazioni, terze combinazioni, e composizioni farmaceutiche) hanno basse concentrazioni di cloruro di sodio. Per esempio, una soluzione può avere una concentrazione di cloruro di sodio fino a e includente lo 0,05% (p/v) (per esempio, dallo 0 allo 0,05%; dallo 0,01 allo 0,05%; dallo 0,015 allo 0,05%; dallo 0,02 allo 0,05%; dallo 0,025 allo 0,05%; dallo 0,03 allo 0,05%; dallo 0,04 allo 0,05%; dallo 0 allo 0,045%; dallo 0 allo 0,04%; dallo 0 allo 0,035%; dallo 0 allo 0,03%; dallo 0 allo 0,025%; dallo 0 allo 0,2%; dallo 0 allo 0,01%; dallo 0,01% allo 0,04%; dallo 0,025% allo 0,045%; e dallo 0,02% allo 0,03%). In alcune forme di realizzazione, soluzioni aventi un basso

13

contenuto di cloruro di sodio possono essere acquistate in commercio o possono essere preparate usando la tecnologia nota nell'arte, incluse, per esempio, nanofiltrazione, ultrafiltrazione, diafiltrazione, cromatografia a scambio ionico, osmosi inversa ed elettrolisi.

In alcune forme di realizzazione, una composizione farmaceutica come fornita nel presente documento comprende fino a e includente lo 0,05% (p/v) di cloruro di sodio. In alcune forme di realizzazione, una composizione farmaceutica come fornita nel presente documento comprende fino allo 0,05% (p/v) di cloruro di sodio. Per esempio, una composizione farmaceutica comprende meno dello 0,05% (p/v) di cloruro di sodio.

In alcune forme di realizzazione, una soluzione di una ciclodestrina avente una bassa concentrazione di qualsiasi ione nucleofilo forte (ad esempio, ione cloruro, ione bromuro, ione fluoruro e ione ioduro) viene usata per formulare un inibitore del proteasoma peptidico (ad esempio, un composto di formula da (1) a (5) o un suo sale farmaceuticamente accettabile) fornito nel presente documento. Per esempio, soluzioni di ciclodestrine usate per formulare un inibitore del proteasoma peptidico possono avere una concentrazione di ione nucleofilo fino a e includente  $8,5 \times 10^{-3}$  M. Tali soluzioni possono essere acquistate in commercio o possono essere preparate usando la tecnologia come è noto nell'arte. Per esempio, nanofiltrazione, ultrafiltrazione, diafiltrazione, cromatografia a scambio ionico, osmosi inversa ed elettrolisi.

In alcune forme di realizzazione, una soluzione di una o più ciclodestrine usate per formulare un inibitore del proteasoma peptidico comprende fino a e include lo  $8,5 \times 10^{-3}$  M di uno ione nucleofilo. In alcune forme di realizzazione, lo ione nucleofilo è presente come sale, per esempio, un sale sodico, ma il sale nucleofilo potrebbe esistere in soluzione con cationi diversi dal sodio (ad esempio cationi idrogeno, potassio, magnesio e calcio). In alcune forme di realizzazione, una composizione farmaceutica come fornita nel presente documento comprende fino a  $8,5 \times 10^{-3}$  M di uno ione nucleofilo. Per esempio, una composizione farmaceutica comprende meno di  $8,5 \times 10^{-3}$  M di uno ione nucleofilo.

In alcune forme di realizzazione, una soluzione di una ciclodestrina avente una bassa concentrazione di ione cloruro viene usata per formulare un inibitore del proteasoma peptidico (ad esempio, un composto di formula da (1) a (5) o un suo sale farmaceuticamente accettabile) fornito nel presente documento. Per esempio, soluzioni di ciclodestrine usate per formulare un inibitore del proteasoma peptidico possono avere una concentrazione di ioni cloruro fino allo e incluso lo 0,03% (p/v) (ad esempio, dallo 0 allo 0,03%; dallo 0,01 allo 0,03%; dallo 0,015 allo 0,03%; dallo 0,02 allo 0,03%; dallo 0,025 allo 0,03%; dallo 0 allo 0,025%; dallo 0 allo 0,2%; dallo 0 allo 0,01%; dallo 0,005% allo 0,025%; e dallo 0,015% allo 0,025%). Tali soluzioni possono essere acquistate in commercio o possono essere preparate usando la tecnologia come è noto nell'arte. Per esempio, nanofiltrazione,

ultrafiltrazione, diafiltrazione, cromatografia a scambio ionico, osmosi inversa ed elettrolisi.

In alcune forme di realizzazione, una soluzione di una o più ciclodestrine usate per formulare un inibitore del proteasoma peptidico comprende fino a e include lo 0,03% (p/v) incluso di uno ione cloruro. In alcune forme di realizzazione, lo ione cloruro è presente come sale, per esempio, cloruro di sodio, ma il sale cloruro potrebbe esistere in soluzione con cationi diversi dal sodio (ad esempio cationi idrogeno, potassio, magnesio e calcio). In alcune forme di realizzazione, una composizione farmaceutica come fornita nel presente documento comprende fino allo 0,03% (p/v) di uno ione cloruro. Per esempio, una composizione farmaceutica comprende meno dello 0,03% (p/v) di uno ione cloruro.

In alcune forme di realizzazione, una soluzione di una ciclodestrina avente una bassa concentrazione di cloruro di sodio viene usata per formulare un inibitore del proteasoma peptidico (ad esempio, un composto di formula da (1) a (5) o un suo sale farmaceuticamente accettabile) fornito nel presente documento. Per esempio, soluzioni di ciclodestrine usate per formulare un inibitore del proteasoma peptidico possono avere una concentrazione di cloruro di sodio fino allo e incluso lo 0,05% (p/v) (ad esempio, dallo 0 allo 0,05%; dallo 0,01 allo 0,05%; dallo 0,015 allo 0,05%; dallo 0,02 allo 0,05%; dallo 0,025 allo 0,05%; dallo 0,03 allo 0,05%; dallo 0,04 allo 0,05%; dallo 0 allo 0,045%; dallo 0 allo 0,04%; dallo 0 allo 0,035%; dallo 0 allo 0,03%; dallo 0 allo 0,025%;

dallo 0 allo 0,2%; dallo 0 allo 0,01%; dallo 0,01% allo 0,04%; dallo 0,025% allo 0,045%; e dallo 0,02% allo 0,03%). Tali soluzioni possono essere acquistate in commercio o possono essere preparate usando la tecnologia di desalinizzazione come è noto nell'arte. Per esempio, nanofiltrazione, ultrafiltrazione, diafiltrazione, cromatografia a scambio ionico, osmosi inversa ed elettrolisi.

In alcune forme di realizzazione, una soluzione di una o più ciclodestrine usate per formulare un inibitore del proteasoma peptidico comprende fino a e include lo 0,05% (p/v) di cloruro di sodio. In alcune forme di realizzazione, una composizione farmaceutica come fornita nel presente documento comprende fino allo 0,03% (p/v) di cloruro di sodio. Per esempio, una composizione farmaceutica comprende meno dello 0,03% (p/v) di cloruro di sodio.

Oltre a produrre soluzioni stabili altamente concentrate di un inibitore del proteasoma peptidico, le formulazioni preparate mediante i metodi forniti nel presente documento possono essere ottenute senza limitazioni di degradazione chimica e stabilità di altri metodi di complessazione e formulazione. Per esempio, i metodi forniti nel presente documento evitano l'uso di acidi forti (ad esempio, HCl) per abbassare il pH durante la complessazione. Sebbene la diminuzione del pH della formulazione a un valore inferiore a 2 possa facilitare la dissoluzione dell'inibitore del proteasoma peptidico e produrre una soluzione omogenea prima della complessazione, l'acidità della soluzione può determinare la degradazione dell'inibitore del proteasoma

b

peptidico. Inoltre, l'inibitore del proteasoma peptidico contiene un gruppo funzionale chetoeossido, e l'inibitore è suscettibile all'idrolisi da parte di forti ioni nucleofili come lo ione cloruro. L'idrolisi dell'anello epossidico e l'apertura nucleofila catalizzata da acido della porzione funzionale epossidica è una via di degradazione del composto. La degradazione di un composto di formula (5) determina la formazione di un'impurità di prodotto di degradazione della cloridrina (CDP). In base alla sua struttura, questo degradante viene classificato come un alchilatore, pertanto le autorità regolatorie globali considerano questa un'impurità potenzialmente genotossica. In aggiunta, in alcune forme di realizzazione, lo ione cloruro può anche degradare l'eossido dando come risultato la formazione di un addotto di cloridrina. Come mostrato nell'Esempio 2, la riduzione dei livelli di ioni cloruro in una formulazione di un composto di formula (5) può minimizzare o eliminare tali vie di idrolisi dando come risultato stabilità e qualità del prodotto potenziate. Usando i metodi forniti nel presente documento, tuttavia, tali acidi forti e ioni nucleofili vengono evitati e, pertanto, la degradazione dell'inibitore del proteasoma peptidico a tali prodotti di degradazione può essere significativamente ridotta e, in alcuni casi, può anche essere eliminata.

Le composizioni farmaceutiche adatte all'iniezione possono includere soluzioni (laddove idrosolubili) o dispersioni e polveri sterili per la preparazione estemporanea di soluzioni o dispersioni iniettabili sterili. Per la somministrazione endovenosa, trasportatori adatti includono acqua sterile per preparazioni iniettabili, tamponi sterili, come tampone

citrato, acqua batteriostatica e Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ). In tutti i casi, la composizione deve essere sterile e deve essere fluida, in modo che vi sia una facile siringabilità. La composizione deve essere stabile alle condizioni di produzione e conservazione e deve essere conservata contro l'azione contaminante di microrganismi come batteri e funghi. Il trasportatore può essere un solvente o un mezzo di dispersione contenente, per esempio, acqua, etanolo, poliolo (per esempio, glicerolo, propilen glicole, polietilen glicole liquido), e loro miscele adatte. La corretta fluidità può essere mantenuta, per esempio, mediante l'uso di un rivestimento come lecitina, mediante il mantenimento della dimensione particellare richiesta nel caso di dispersione e mediante l'uso di tensioattivi. La prevenzione dell'azione di microrganismi può essere ottenuta mediante vari agenti antibatterici e antifungini, per esempio, parabeni, clorobutanolo, fenolo, acido ascorbico, thimerosal. In molti casi, sarà preferibile includere agenti isotonici, ad esempio, zuccheri, polialcoli come mannitolo, sorbitolo, e cloruro di sodio nella composizione. L'assorbimento prolungato delle composizioni iniettabili può essere determinato includendo nella composizione un agente che ritarda l'assorbimento, ad esempio monostearato di alluminio e gelatina.

Soluzioni iniettabili sterili possono essere preparate incorporando il composto attivo nella quantità necessaria in un solvente appropriato con uno o una combinazione di ingredienti elencati sopra, come necessario, cui fa seguito sterilizzazione per filtrazione. Generalmente, le dispersioni sono preparate incorporando il composto

attivo in un veicolo sterile, che contiene un mezzo di dispersione di base e gli altri ingredienti richiesti tra quelli elencati sopra. Nel caso di polveri sterili per la preparazione di soluzioni iniettabili sterili, i metodi di preparazione preferiti è la crioessiccazione (liofilizzazione), che rende una polvere del principio attivo più qualsiasi ingrediente desiderato aggiuntivo da una relativa soluzione precedentemente sterilizzata per filtrazione.

Le composizioni orali includono generalmente un diluente inerte o un trasportatore commestibile. Ai fini della somministrazione terapeutica orale, il composto attivo può essere incorporato con eccipienti e usato sotto forma di compresse, pastiglie o capsule, ad esempio capsule di gelatina. Le composizioni orali possono anche essere preparate usando un trasportatore fluido per uso come collutorio. Agenti leganti farmaceuticamente compatibili e/o materiali adiuvanti possono essere inclusi come parte della composizione orale. Le compresse, pillole, capsule, pastiglie e simili possono contenere qualsiasi dei seguenti ingredienti o composti di natura simile: un legante come cellulosa microcristallina, gomma adragante o gelatina; un eccipiente come amido o lattosio, un agente disintegrante come acido alginico, Primogel o amido di mais; un lubrificante come stearato di magnesio o Sterotes; un glidante come biossido di silicio colloidale; un agente edulcorante come saccarosio o saccarina; o un agente aromatizzante come menta piperita, metil salicilato o aroma di arancia.

Per la somministrazione mediante inalazione, i composti possono essere erogati sotto forma di uno spray aerosol da un contenitore o erogatore sotto pressione che contiene un propellente adatto, ad esempio un gas come anidride carbonica o un nebulizzatore. Tali metodi includono quelli descritti nel brevetto statunitense n. 6,468,798.

La somministrazione sistemica di un composto terapeutico come descritto nella presente può anche avvenire mediante mezzi transmucosali o transdermici. Per somministrazione transmucosale o transdermica, nella formulazione vengono usati penetranti appropriati per la barriera da permeare. Tali penetranti sono generalmente noti nell'arte e includono, ad esempio, per una somministrazione transmucosale, detergenti, sali biliari e derivati dell'acido fusidico. Una somministrazione transmucosale può essere conseguita attraverso l'uso di spray nasali o supposte. Per una somministrazione transdermica, i composti attivi sono formulati in unguenti, pomate, gel, o creme come generalmente noto nell'arte.

Le composizioni farmaceutiche possono anche essere preparate sotto forma di supposte (ad esempio, con basi per supposte convenzionali come burro di cacao e altri gliceridi) o clisteri di ritenzione per l'erogazione rettale.

In aggiunta, è possibile un'erogazione intranasale, come descritto, tra l'altro, in Hamajima et al., Clin. Immunol. Immunopathol., 88(2), 205-10 (1998). Possono anche essere usati liposomi (ad esempio,

come descritto nel brevetto statunitense n. 6,472,375) e la microincapsulazione. Possono anche essere usati sistemi di erogazione di microparticelle bersagliabili biodegradabili (ad esempio, come descritto nel brevetto statunitense n. 6,471,996).

In una forma di realizzazione, i composti terapeutici sono preparati con trasportatori che proteggeranno i composti terapeutici dalla rapida eliminazione dal corpo, come una formulazione a rilascio controllato, inclusi impianti e sistemi di erogazione microincapsulati. Possono essere usati polimeri biodegradabili, biocompatibili, come etilene vinil acetato, polianidridi, acido poliglicolico, collagene, poliortoesteri ed acido polilattico. Tali formulazioni possono essere preparate utilizzando tecniche standard o ottenute commercialmente, ad esempio, da Alza Corporation e Nova Pharmaceuticals, Inc. Le sospensioni liposomiali (inclusi liposomi mirati a cellule selezionate con anticorpi monoclonali contro antigeni cellulari) possono anche essere utilizzate come veicolanti farmaceuticamente accettabili. Queste possono essere preparate secondo metodi noti ai tecnici del ramo, ad esempio come descritto nel brevetto U.S. n. 4,522,811.

La composizione farmaceutica può essere somministrata in una sola volta, o può essere suddivisa in un numero di dosi più piccole da somministrare ad intervalli di tempo. Resta inteso che il dosaggio preciso e la durata del trattamento sono una funzione della malattia che viene trattata e possono essere determinati empiricamente usando protocolli di test noti o mediante estrapolazione a partire da dati di test in vivo o in

vitro. Va notato che concentrazioni e valori di dosaggio possono anche variare con la gravità della condizione da alleviare. Si deve inoltre intendere che per qualsiasi paziente particolare, regimi di dosaggio specifici devono essere regolati nel tempo in base alle esigenze individuali e al giudizio professionale della persona che somministra o supervisiona la somministrazione delle composizioni, e che gli intervalli di concentrazione esposti nella presente sono solo esemplificativi e non intendono limitare la portata o la messa in pratica delle composizioni rivendicate.

Possono essere preparate forme di dosaggio o composizioni contenenti un composto come descritto nella presente nell'intervallo dallo 0,005% al 100% con il resto costituito da trasportatore atossico. Metodi per la preparazione di queste composizioni sono noti ai tecnici del ramo. Le composizioni contemplate possono contenere lo 0,001%-100% di principio attivo, in una forma di realizzazione lo 0,1-95%, in un'altra forma di realizzazione il 75-85%.

Le composizioni farmaceutiche possono essere incluse in un contenitore, confezione, o dispenser insieme alle istruzioni per la somministrazione.

#### ***Metodi d'uso***

L'invenzione è definita dalle rivendicazioni. Qualsiasi argomento oggetto che ricade al di fuori dall'ambito delle rivendicazioni è fornito soltanto a fini informativi. Qualsiasi riferimento nella descrizione ai metodi di trattamento si riferisce ai composti, alle composizioni farmaceutiche e

13

ai medicinali della presente invenzione per l'uso in un metodo per il trattamento del corpo umano o animale mediante terapia.

Le conseguenze biologiche dell'inibizione del proteasoma in generale sono numerose. L'inibizione del proteasoma è stata suggerita per l'uso come prevenzione e/o trattamento di una moltitudine di malattie incluse malattie proliferative, malattie neurotossiche/degenerative, Alzheimer, condizioni ischemiche, infiammazione, malattie autoimmuni, HIV, cancro, rigetto di trapianto d'organo, shock settico, inibizione della presentazione dell'antigene, diminuzione dell'espressione genica virale, infezioni parassitarie, condizioni associate ad acidosi, degenerazione maculare, condizioni polmonari, malattie da deperimento muscolare, malattie fibrotiche, malattie della crescita delle ossa e dei capelli. Pertanto, formulazioni farmaceutiche per composti molto potenti specifici per il proteasoma, come la classe di molecole di chetone epossidico, forniscono un mezzo per somministrare un farmaco a un paziente e trattare queste condizioni.

A livello cellulare, l'accumulo di proteine poliubiquitinate, cambiamenti morfologici cellulari e apoptosi sono stati riportati dopo il trattamento delle cellule con vari inibitori del proteasoma. L'inibizione del proteasoma è stata anche suggerita come possibile strategia terapeutica antitumorale. Il fatto che l'epossomicina sia stata inizialmente identificata in uno screening per composti antitumorali convalida il proteasoma come bersaglio chemioterapico antitumorale. Di conseguenza, queste composizioni sono utili per trattare il cancro.

Sia i modelli *in vitro* che *in vivo* hanno dimostrato che le cellule maligne, in generale, sono suscettibili all'inibizione del proteasoma.

Infatti, l'inibizione del proteasoma è già stata validata come strategia terapeutica per il trattamento del mieloma multiplo. Questo potrebbe essere dovuto, in parte, alla dipendenza delle cellule maligne altamente proliferative dal sistema del proteasoma per rimuovere rapidamente le proteine (Rolfe et al., J. Mol. Med. (1997) 75:5-17; Adams, Nature (2004) 4: 349-360). Pertanto, nel presente documento è fornita una composizione farmaceutica comprendente un inibitore del proteasoma peptidico come fornito nel presente documento per l'uso nel trattamento del mieloma multiplo.

Come usato nel presente documento, il termine "cancro" include tumori ematologici e solidi. Il cancro si riferisce alla malattia di sangue, ossa, organi, tessuto cutaneo e sistema vascolare, inclusi, ma non limitati a, cancri della vescica, sangue, ossa, cervello, seno, cervice, torace, colon, endometrio, esofago, occhio, testa, reni, fegato, polmoni, linfonodi, bocca, collo, ovaie, pancreas, prostata, retto, renale, pelle, stomaco, testicoli, gola e utero. Cancro specifici includono, ma non sono limitati a, leucemia (leucemia linfocitica acuta (ALL), leucemia mieloide acuta (AML), leucemia linfatica cronica (CLL), leucemia mieloide cronica (CML), leucemia a cellule capellute), neoplasie a cellule B mature (linfoma linfocitico piccolo), leucemia prolinfocitica a cellule B, linfoma linfoplasmocitico (come macroglobulinemia di Waldenström), linfoma della zona marginale splenica, mieloma plasmacellulare, plasmocitoma,

malattie da deposito di immunoglobuline monoclonali, malattie delle catene pesanti, linfoma a cellule B della zona marginale extranodale (linfoma MALT), linfoma a cellule B della zona marginale nodale (NMZL), linfoma follicolare, linfoma a cellule mantellari, linfoma diffuso a cellule B, linfoma mediastinico (timico) a grandi cellule B, linfoma intravascolare a grandi cellule B, linfoma a effusione primaria e linfoma/leucemia di Burkitt), neoplasie a cellule T mature e cellule natural killer (NK) (leucemia prolinfocitica a cellule T, leucemia linfocitica granulosa a grandi cellule T, leucemia aggressiva a cellule NK, leucemia/linfoma a cellule T dell'adulto, linfoma a cellule NK/T extranodale, linfoma a cellule T di tipo enteropatico, linfoma a cellule T epatosplenico, linfoma a cellule NK blastico, micosi fungoide (sindrome di Sezary), linfoma a grandi cellule anaplastico cutaneo primario, papulosi linfomatoide, linfoma a cellule T angioimmunoblastico, linfoma a cellule T periferico non specificato e linfoma anaplastico a grandi cellule), linfoma di Hodgkin (sclerosi nodulare, cellularità mista, ricco di linfociti, deplezione o non deplezione di linfociti, predominanza di linfociti nodulari), mieloma (mieloma multiplo, mieloma indolente, mieloma indolente), malattia mieloproliferativa cronica, malattia mielodisplastica/mieloproliferativa, sindromi mielodisplastiche, disturbi linfoproliferativi associati a immunodeficienza, neoplasie delle cellule istiocitiche e dendritiche, mastocitosi, condrosarcoma, sarcoma di Ewing, fibrosarcoma, tumore maligno a cellule giganti, mieloma osseo, osteosarcoma, cancro al seno (ormono-dipendente, ormono-indipendente), cancro ginecologici (cervicale,

endometriale, tube di Falloppio, malattia trofoblastica gestazionale, ovarico, peritoneale, uterino, vaginale e vulvare), carcinoma a cellule basali (BCC), carcinoma a cellule squamose (SCC), melanoma maligno, dermatofibrosarcoma protuberans, carcinoma a cellule di Merkel, sarcoma di Kaposi, astrocitoma, astrocitoma pilocitico, tumore neuroepiteliale disembrionoplastico, oligodendrogliomi, ependimoma, glioblastoma multiforme, gliomi misti, oligoastrocitomi, medulloblastoma, retinoblastoma, neuroblastoma, germinoma, teratoma, mesotelioma maligno (mesotelioma peritoneale, mesotelioma pericardico, mesotelioma pleurico), tumore neuroendocrino gastro-enteropancreatico o gastroenteropancreatico (GEP-NET), carcinoide, tumore endocrino pancreatico (PET), adenocarcinoma coloretale, carcinoma coloretale, tumore neuroendocrino aggressivo, leiomiosarcoma, adenocarcinoma mucinoso, adenocarcinoma a cellule ad anello con castone, carcinoma epatocellulare, colangiocarcinoma, epatoblastoma, emangioma, adenoma epatico, iperplasia nodulare focale (iperplasia rigenerativa nodulare, amartoma), carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) (carcinoma polmonare a cellule squamose, adenocarcinoma, carcinoma polmonare a grandi cellule), carcinoma polmonare a piccole cellule, carcinoma tiroideo, cancro della prostata (ormono-refrattario, androgeno-indipendente, androgeno-dipendente, ormono-insensibile), e sarcomi dei tessuti molli (fibrosarcoma, istiocitoma fibroso maligno, dermatofibrosarcoma, liposarcoma, rhabdomiosarcoma, leiomiosarcoma, emangiosarcoma, sarcoma

sinoviale, il tumore maligno della guaina dei nervi periferici/neurofibrosarcoma, osteosarcoma extrascheletrico).

La composizione farmaceutica per l'uso secondo l'invenzione rivendicata si rivolge al trattamento del mieloma multiplo.

Un inibitore del proteasoma peptidico come fornito nel presente documento, o una composizione farmaceutica comprendente lo stesso, può essere somministrato per trattare il mieloma multiplo in un paziente. Per esempio, il mieloma multiplo può includere mieloma refrattario e/o mieloma multiplo refrattario.

Molti tumori dei tessuti emopoietici e linfoidi sono caratterizzati da un aumento della proliferazione cellulare, o di un particolare tipo di cellula. Le malattie mieloproliferative croniche (CMPD) sono disturbi clonali delle cellule staminali ematopoietiche caratterizzati dalla proliferazione nel midollo osseo di uno o più lignaggi mieloidi, con conseguente aumento del numero di granulociti, globuli rossi e/o piastrine nel sangue periferico. Pertanto, l'uso di un inibitore del proteasoma per il trattamento di tali malattie è interessante e in fase di esame (Cilloni et al., *Haematologica* (2007) 92: 1124-1229). CMPD può includere leucemia mieloide cronica, leucemia neutrofila cronica, leucemia eosinofila cronica, policitemia vera, mielofibrosi cronica idiopatica, trombocitemia essenziale e malattia mieloproliferativa cronica non classificabile. Viene fornito nella presente un metodo per il trattamento della CMPD comprendente somministrare a un paziente che

necessita di tale trattamento una quantità efficace del composto inibitore del proteasoma divulgato nella presente.

Le malattie mielodisplastiche/mieloproliferative, come leucemia mielomonocitica cronica, leucemia mieloide cronica atipica, leucemia mielomonocitica giovanile e malattia mielodisplastica/mieloproliferativa non classificabile, sono caratterizzate da ipercellularità del midollo osseo dovuta alla proliferazione in uno o più lignaggi mieloidi. L'inibizione del proteasoma con una composizione descritta nella presente può servire a trattare queste malattie mielodisplastiche/mieloproliferative fornendo a un paziente che necessita di tale trattamento una quantità efficace della composizione.

Le sindromi mielodisplastiche (MDS) si riferiscono a un gruppo di disturbi delle cellule staminali ematopoietiche caratterizzati da displasia ed emopoiesi inefficace in una o più delle principali linee cellulari mieloidi. Mirare a NF- $\kappa$ B con un inibitore del proteasoma in queste neoplasie ematologiche induce l'apoptosi, uccidendo così la cellula maligna (Braun et al. Cell Death and Differentiation (2006) 13:748-758). Viene inoltre fornito nella presente un metodo per trattare MDS comprendente somministrare a un paziente che necessita di tale trattamento una quantità efficace di un composto fornito nella presente. MDS include anemia refrattaria, anemia refrattaria con sideroblasti ad anello, citopenia refrattaria con displasia multilignaggio, anemia refrattaria con eccesso di blasti, sindrome mielodisplastica non

classificabile e sindrome mielodisplastica associata ad anomalia cromosomica isolata del (5q).

La mastocitosi è una proliferazione dei mastociti e il loro successivo accumulo in uno o più sistemi di organi. La mastocitosi include, ma non è limitata a, mastocitosi cutanea, mastocitosi sistemica indolente (ISM), mastocitosi sistemica con associata malattia clonale ematologica non mastocitaria (SM-AHNMD), mastocitosi sistemica aggressiva (ASM), leucemia mastocitaria (MCL), sarcoma mastocitario (MCS) e mastocitoma extracutaneo. Viene inoltre fornito nella presente un metodo per trattare la mastocitosi comprendente somministrare una quantità efficace del composto divulgato nella presente a un paziente con diagnosi di mastocitosi.

Il proteasoma regola NF- $\kappa$ B che a sua volta regola i geni coinvolti nella risposta immunitaria e infiammatoria. Per esempio, NF- $\kappa$ B è necessario per l'espressione del gene  $\kappa$  della catena leggera immunoglobulinica, del gene della catena del recettore  $\alpha$  di IL-2, del gene del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I, e di un certo numero di geni di citochine codificanti, per esempio, per IL-2, IL-6, fattore stimolante le colonie di granulociti, e IFN- $\beta$  (Palombella et al., Cell (1994) 78:773-785). Pertanto, nel presente documento sono fornite composizioni farmaceutiche come definite per l'uso nell'influenzare il livello di espressione di IL-2, MHC-I, IL-6, TNF $\alpha$ , IFN- $\beta$  o qualsiasi delle altre proteine precedentemente menzionate, ciascun metodo comprendendo somministrare a un paziente una quantità efficace di una

13

composizione di inibitore del proteasoma divulgata nel presente documento.

È qui divulgata anche la somministrazione a un paziente di una quantità terapeuticamente efficace del composto descritto nel presente documento per il trattamento di una malattia autoimmune. Una "malattia autoimmune" nel presente documento è una malattia o un disturbo derivante da e diretta/o contro i tessuti propri di un individuo. Esempi di malattie o disturbi autoimmuni includono, ma non sono limitati a, risposte infiammatorie come malattie infiammatorie della pelle, incluse psoriasi e dermatite (ad esempio, dermatite atopica); sclerodermia sistemica e sclerosi; risposte associate a malattia infiammatoria intestinale (come malattia di Crohn e colite ulcerosa); sindrome da distress respiratorio (inclusa sindrome da distress respiratorio nell'adulto; ARDS); dermatite; meningite; encefalite; uveite; colite; glomerulonefrite; condizioni allergiche come eczema e asma e altre condizioni che comportano l'infiltrazione di cellule T e risposte infiammatorie croniche; aterosclerosi; carenza di adesione leucocitaria; artrite reumatoide; lupus eritematoso sistemico (LES); diabete mellito (ad esempio diabete mellito di tipo I o diabete mellito insulino-dipendente); sclerosi multipla; sindrome di Reynaud; tiroidite autoimmune; encefalomielite allergica; Sindrome di Sjorgen; diabete a insorgenza giovanile; e risposte immunitarie associate a ipersensibilità acuta e ritardata mediata da citochine e linfociti T che si trovano tipicamente in tubercolosi, sarcoidosi, polimiosite, granulomatosi e vasculite; anemia perniziosa (malattia di Addison); malattie che

coinvolgono diapedesi leucocitaria; disturbo infiammatorio del sistema nervoso centrale (SNC); sindrome da lesione multiorgano; anemia emolitica (inclusa, ma non limitata a, crioglobulinemia o anemia Coombs-positiva); miastenia grave; malattie mediate dal complesso antigene-anticorpo; malattia della membrana basale antiglomerulare; sindrome antifosfolipidica; neurite allergica; malattia di Graves; sindrome miastenica di Lambert-Eaton; pemfigoide bolloso; pemfigo; poliendocrinopatie autoimmuni; malattia di Reiter; sindrome dell'uomo rigido; malattia di Behçet; arterite a cellule giganti; nefrite immunocomplessa; nefropatia da IgA; polineuropatie da IgM; porpora trombocitopenica immunitaria (ITP) o trombocitopenia autoimmune.

Gli screening del sistema immunitario per cellule autologhe che sono infettate da virus hanno subito una trasformazione oncogena o presentano peptidi non familiari sulla loro superficie. La proteolisi intracellulare genera piccoli peptidi per la presentazione a linfociti T per indurre risposte immunitarie mediate da MHC di classe I. Pertanto, nel presente documento è fornito un metodo per usare un inibitore del proteasoma fornito nel presente documento come agente immunomodulatorio per inibire o alterare la presentazione dell'antigene in una cellula, comprendente esporre la cellula (o somministrare a un paziente) al composto descritto nel presente documento. Forme di realizzazione specifiche includono un metodo per trattare malattie correlate all'innesto o al trapianto, come malattia del trapianto contro l'ospite o malattia dell'ospite contro il trapianto in un paziente,

comprendente la somministrazione di una quantità terapeuticamente efficace del composto descritto nel presente documento. Il termine "innesto" come usato nel presente documento si riferisce al materiale biologico derivato da un donatore per il trapianto in un ricevente. Gli innesti includono tale materiale diverso come, per esempio, cellule isolate come cellule insulari; tessuto come la membrana amniotica di un neonato, midollo osseo, cellule precursori ematopoietiche e tessuto oculare, come tessuto corneale; e organi come pelle, cuore, fegato, milza, pancreas, lobo tiroideo, polmone, rene, organi tubolari (ad esempio, intestino, vasi sanguigni o esofago). Gli organi tubolari possono essere usati per sostituire porzioni danneggiate di esofago, vasi sanguigni o dotto biliare. Gli innesti cutanei possono essere usati non solo per le ustioni, ma anche come medicazione per l'intestino danneggiato o per chiudere alcuni difetti come l'ernia diaframmatica. L'innesto è derivato da qualsiasi fonte di mammifero, incluso l'essere umano, sia esso da cadaveri o da donatori viventi. In alcuni casi, il donatore e il ricevente sono lo stesso paziente. In alcune forme di realizzazione, l'innesto è midollo osseo o un organo come il cuore, e il donatore dell'innesto e l'ospite corrispondono in termini di antigeni HLA di classe II.

Le neoplasie a cellule istiocitarie e dendritiche sono derivate da fagociti e cellule accessorie, che hanno ruoli principali nel processamento e nella presentazione di antigeni ai linfociti. È stato mostrato che la deplezione del contenuto del proteasoma in cellule dendritiche altera le

b

loro risposte indotte dall'antigene (Chapatte et al. Cancer Res. (2006) 66:5461-5468). In alcune forme di realizzazione, una composizione fornita nel presente documento può essere somministrata a un paziente con neoplasia a cellule istiocitarie o dendritiche. Neoplasie a cellule istiocitarie e cellule dendritiche includono sarcoma istiocitico, istiocitosi di cellule di Langerhans, sarcoma di cellule di Langerhans, sarcoma/tumore a cellule dendritiche interdigitanti, sarcoma/tumore a cellule dendritiche follicolari e sarcoma a cellule dendritiche aspecifiche.

È stato mostrato che l'inibizione del proteasoma è vantaggiosa per trattare malattie per cui un tipo di cellula prolifera e disturbi immunitari; pertanto, in alcune forme di realizzazione, è fornito il trattamento di malattie linfoproliferative (LPD) associate a disturbi immunitari primari (PID) comprendente la somministrazione di una quantità efficace del composto divulgato a un paziente che ne necessita. I contesti clinici più comuni di immunodeficienza associata a un'incidenza aumentata di disturbi linfoproliferativi, incluse neoplasie e linfomi a cellule B e cellule T, sono sindromi di immunodeficienza primaria e altri disturbi immunitari primari, infezione con il virus dell'immunodeficienza umana (HIV), immunosoppressione iatrogena in pazienti che hanno ricevuto allotrapianti solidi di organi o midollo osseo, e immunosoppressione iatrogena associata al trattamento con metotrexato. Altri PID comunemente associati a LPD, ma non limitati a, sono atassia telangiectasia (AT), sindrome di Wiskott-Aldrich (WAS), immunodeficienza variabile comune (CVID), immunodeficienza

combinata grave (SCID), disturbo linfoproliferativo legato all'X-collegato (XLP), sindrome da rotture di Nijmegen (NBS), sindrome da iper-IgM e sindrome linfoproliferativa autoimmune (ALPS).

L'inibizione del proteasoma è stata anche associata all'inibizione dell'attivazione di NF- $\kappa$ B e alla stabilizzazione dei livelli di p53. Pertanto, le composizioni fornite nel presente documento possono anche essere usate per inibire l'attivazione di NF- $\kappa$ B e stabilizzare i livelli di p53 nella coltura cellulare. Poiché NF- $\kappa$ B è un regolatore chiave dell'infiammazione, è un bersaglio interessante per l'intervento terapeutico antinfiammatorio. Pertanto, le composizioni fornite nel presente documento possono essere utili per il trattamento di condizioni associate a infiammazione, incluse, ma non limitate a, BPCO, psoriasi, asma, bronchite, enfisema e fibrosi cistica.

Le composizioni divulgate possono essere usate per trattare condizioni mediate direttamente dalla funzione proteolitica del proteasoma come deperimento muscolare, o mediate indirettamente tramite proteine che sono processate dal proteasoma come NF- $\kappa$ B. Il proteasoma partecipa alla rapida eliminazione e al processamento post-traduzionale di proteine (ad esempio, enzimi) coinvolte nella regolazione cellulare (ad esempio, ciclo cellulare, trascrizione genica e vie metaboliche), comunicazione intercellulare e risposta immunitaria (ad esempio, presentazione dell'antigene). Esempi specifici discussi di seguito includono proteina  $\beta$ -amiloide e proteine regolatrici come ciclina e fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B.

Una composizione fornita nel presente documento è utile per il trattamento di malattie e condizioni neurodegenerative, inclusi, ma non limitati a, ictus, danno ischemico al sistema nervoso, trauma neurale (ad esempio danno cerebrale percussivo, lesione del midollo spinale e danno traumatico al sistema nervoso), sclerosi multipla e altre neuropatie immuno-mediate (ad esempio, sindrome di Guillain-Barré e sue varianti, neuropatia assonale motoria acuta, polineuropatia demielinizzante infiammatoria acuta e sindrome di Fisher), complesso di demenza da HIV/AIDS, diabete, assonomia, neuropatia diabetica, malattia di Parkinson, malattia di Huntington, sclerosi multipla, meningite batterica, parassitaria, fungina e virale, encefalite, demenza vascolare, demenza multifartuale, demenza da corpi di Lewy, demenza del lobo frontale come malattia di Pick, demenze subcorticali (come Huntington o paralisi sopranucleare progressiva), sindromi di atrofia corticale focale (come afasia primaria), demenze metabolico-tossiche (come ipotiroidismo cronico o carenza da B12) e demenze causate da infezioni (come sifilide o meningite cronica).

La malattia di Alzheimer è caratterizzata da depositi extracellulari di proteina  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ -AP) in placche senili e vasi cerebrali.  $\beta$ -AP è un frammento peptidico da 39 a 42 amminoacidi derivati da un precursore della proteina amiloide (APP). Sono note almeno tre isoforme di APP (695, 751 e 770 amminoacidi). Lo splicing alternativo dell'mRNA genera le isoforme; il normale processamento influenza una porzione della sequenza di  $\beta$ -AP, impedendo in tal modo la generazione di  $\beta$ -AP . Si

ritiene che il processamento proteico anomalo da parte del proteasoma contribuisca all'abbondanza di  $\beta$ -AP nel cervello con Alzheimer. L'enzima di processamento di APP nei ratti contiene circa dieci subunità differenti (22 kDa-32 kDa). La subunità di 25 kDa ha una sequenza N-terminale di X-Gln-Asn-Pro-Met-X-Thr-Gly-Thr-Ser, che è identica alla subunità  $\beta$  di macrolore umano (Kojima, S. et al., Fed. Eur. Biochem. Soc., (1992) 304:57-60). L'enzima di processamento di APP si cliva in corrispondenza legame Gln15-Lys16; in presenza di ione calcio, l'enzima si cliva anche in corrispondenza del legame Met-1-Asp1, e Asp1-Ala2 si lega per rilasciare il dominio extracellulare di  $\beta$ -Asp.

È divulgato, ma non rivendicato, un metodo di trattamento della malattia di Alzheimer, inclusa la somministrazione a un paziente di una quantità efficace di una composizione fornita nel presente documento. Tale trattamento include riduzione della velocità di processamento di  $\beta$ -AP, riduzione della velocità di formazione di placche  $\beta$ -AP, riduzione della velocità di generazione di  $\beta$ -AP e riduzione dei segni clinici della malattia di Alzheimer.

Nella presente sono altresì forniti metodi per trattare cachessia e malattie da deperimento muscolare. Il proteasoma degrada molte proteine nei reticolociti maturi e nei fibroblasti in crescita. In cellule private di insulina o siero, il tasso di proteolisi quasi raddoppia. L'inibizione del proteasoma riduce la proteolisi, riducendo in tal modo sia la perdita di proteina muscolare sia il carico azotato su reni o fegato. Gli inibitori del proteasoma peptidico come forniti nel presente documento sono utili per

13

il trattamento di condizioni come cancro, malattie infettive croniche, febbre, inutilizzo dei muscoli (atrofia) e denervazione, lesione ai nervi, digiuno, insufficienza renale associata ad acidosi e insufficienza epatica. Si veda, ad esempio, il brevetto statunitense n. 5.340.736. Metodi di trattamento includono: riduzione della velocità di degradazione delle proteine muscolari in una cellula; riduzione della velocità di degradazione proteica intracellulare; riduzione della velocità di degradazione della proteina p53 in una cellula; e inibizione della crescita di tumori correlati a p53. Ciascuno di questi metodi include porre a contatto una cellula (*in vivo* o *in vitro*, ad esempio, un muscolo in un paziente) con una quantità efficace di una composizione farmaceutica divulgata nel presente documento.

La fibrosi è la formazione eccessiva e persistente di tessuto cicatriziale derivante dalla crescita iperproliferativa di fibroblasti ed è associata all'attivazione della via di segnalazione di TGF- $\beta$ . La fibrosi comporta un'ampia deposizione della matrice extracellulare e può verificarsi praticamente all'interno di qualsiasi tessuto o attraverso svariati tessuti differenti. Di norma, il livello della proteina di segnalazione intracellulare (Smad) che attiva la trascrizione di geni bersaglio dopo la stimolazione di TGF- $\beta$  è regolato dall'attività del proteasoma. Tuttavia, la degradazione accelerata dei componenti di segnalazione di TGF- $\beta$  è stata osservata nei tumori e in altre condizioni iperproliferative. Pertanto, in determinate forme di realizzazione, è fornito un metodo per trattare condizioni iperproliferative come retinopatia diabetica, degenerazione

maculare, nefropatia diabetica, glomerulosclerosi, nefropatia da IgA, cirrosi, atresia biliare, insufficienza cardiaca congestizia, sclerodermia, fibrosi indotta da radiazioni e fibrosi polmonare (fibrosi polmonare idiopatica, malattia vascolare del collagene, sarcoidosi, malattie polmonari interstiziali e disturbi polmonari estrinseci). Il trattamento delle vittime di ustioni è spesso ostacolato dalla fibrosi, pertanto, in alcune forme di realizzazione, un inibitore fornito nel presente documento può essere somministrato mediante somministrazione topica o sistemica per trattare le ustioni. La chiusura della ferita dopo l'intervento chirurgico è spesso associata a cicatrici sfiguranti che possono essere prevenute mediante inibizione della fibrosi.

È divulgato, ma non rivendicato, un metodo per la prevenzione o la riduzione delle cicatrici è fornito nel presente documento.

Un'altra proteina processata dal proteasoma è NF- $\kappa$ B, un membro della famiglia delle proteine Rel. La famiglia Rel di proteine attivatrici trascrizionali può essere suddivisa in due gruppi. Il primo gruppo richiede il processamento proteolitico e include p50 (NF- $\kappa$ B1, 105 kDa) e p52 (NF-x2, 100 kDa). Il secondo gruppo non richiede il processamento proteolitico e include p65 (RelA, Rel (c-Rel) e RelB). Sia omo- sia eterodimeri possono essere formati da membri della famiglia Rel; NF- $\kappa$ B, per esempio, è un eterodimero p50-p65. Dopo la fosforilazione e l'ubiquitinazione di I $\kappa$ B e p105, le due proteine vengono degradate e processate, rispettivamente, per produrre NF- $\kappa$ B attivo che si trasloca dal citoplasma al nucleo. Il p105 ubiquitinato viene anche

processato mediante proteasomi purificati (Palombella et al., Cell (1994) 78:773-785). NF- $\kappa$ B attivo forma un complesso potenziatore stereospecifico con altri attivatori trascrizionali e, ad esempio, HMG I(Y), inducendo l'espressione selettiva di un particolare gene.

NF- $\kappa$ B regola i geni coinvolti nella risposta immunitaria e infiammatoria, e gli eventi mitotici. Per esempio, NF- $\kappa$ B è necessario per l'espressione del gene  $\kappa$  della catena leggera immunoglobulinica, del gene della catena del recettore  $\alpha$  di IL-2, del gene del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I, e di un certo numero di geni di citochine codificanti, per esempio, per IL-2, IL-6, fattore stimolante le colonie di granulociti, e IFN- $\beta$  (Palombella et al., Cell (1994) 78:773-785). Alcune forme di realizzazione includono metodi per influenzare il livello di espressione di IL-2, MHC-I, IL-6, TNF $\alpha$ , IFN- $\beta$  o qualsiasi delle altre proteine precedentemente menzionate, ciascun metodo includendo somministrare a un paziente una quantità efficace di una composizione divulgata nel presente documento. Complessi includenti p50 sono mediatori rapidi di risposte infiammatorie e immunitarie acute (Thanos, D. e Maniatis, T., Cell (1995) 80:529-532).

NF- $\kappa$ B partecipa anche nell'espressione dei geni di adesione cellulare che codificano per E-selectina, P-selectina, ICAM e VCAM-1 (Collins, T., Lab. Invest. (1993) 68:499-508). In alcune forme di realizzazione è fornito un metodo per inibire l'adesione cellulare (ad esempio, adesione cellulare mediata da E-selectina, P-selectina, ICAM o VCAM-1), incluso il contatto di una cellula con (o la somministrazione

13

a un paziente) una quantità efficace di una composizione farmaceutica divulgata nel presente documento.

L'ischemia e la lesione da riperfusione determinano l'ipossia, una condizione in cui vi è una carenza di ossigeno che raggiunge i tessuti del corpo. Questa condizione induce una degradazione aumentata di I $\kappa$ -B $\alpha$ , determinando in tal modo l'attivazione di NF- $\kappa$ B. È stato dimostrato che la gravità della lesione che determina l'ipossia può essere ridotta con la somministrazione di un inibitore del proteasoma. Pertanto, nel presente documento è fornito un metodo per trattare una condizione ischemica o una lesione da riperfusione comprendente la somministrazione a un paziente che necessita di tale trattamento di una quantità efficace di un composto divulgato nel presente documento. Esempi di tali condizioni o lesioni includono, ma non sono limitati a, sindrome coronarica acuta (placche vulnerabili), malattia occlusiva arteriosa (occlusioni cardiaca, cerebrale, arteriosa periferica e vascolare), aterosclerosi (sclerosi coronarica, coronaropatia), infarti, insufficienza cardiaca, pancreatite, ipertrofia miocardica, stenosi e restenosi.

NF- $\kappa$ B si lega specificamente anche al promotore/potenziatore di HIV. Rispetto alla Nef di mac239, la proteina regolatrice dell'HIV Nef di pbj14 differisce per due amminoacidi nella regione che controlla il legame di protein chinasi. Si ritiene che la protein chinasi segnali la fosforilazione di I $\kappa$ B, innescando la degradazione di I $\kappa$ B attraverso la via ubiquitina-proteasoma. Dopo la degradazione, NF- $\kappa$ B i viene rilasciato nel nucleo migliorando così la trascrizione dell'HIV (Cohen, J., Science, (1995)

267:960). Nella presente è fornito un metodo per inibire o ridurre l'infezione da HIV in un paziente, e un metodo per diminuire il livello di espressione genica virale, ciascun metodo includendo la somministrazione al paziente una quantità efficace di una composizione divulgata nel presente documento.

Le infezioni virali contribuiscono alla patologia di molte malattie. Condizioni cardiache come miocardite in corso e cardiomiopatia dilatata sono state collegate al coxsackievirus B3. In un'analisi comparativa di microarray di genoma intero di cuori murini infetti, subunità proteasomiche specifiche erano uniformemente sovraregolate nei cuori di topi che avevano sviluppato miocardite cronica (Szalay et al, Am J Pathol 168:1542-52, 2006). Alcuni virus utilizzano il sistema ubiquitina-proteasoma nella fase di ingresso virale in cui il virus viene rilasciato dall'endosoma nel citosol. Il virus dell'epatite murina (MHV) appartiene alla famiglia dei Coronaviridae che include anche il coronavirus della sindrome acuta respiratoria grave (SARS). Yu e Lai (J Virol 79:644-648, 2005) hanno dimostrato che il trattamento di cellule infettate con MHV con un inibitore del proteasoma ha determinato una diminuzione della replicazione virale, correlata al titolo virale ridotto rispetto a quello di cellule non trattate. Il virus dell'epatite B umana (HBV), un membro della famiglia dei virus Hepadnaviridae, richiede analogamente proteine di involucro codificate da virus per propagarsi. L'inibizione della via di degradazione del proteasoma induce una riduzione significativa della quantità di proteine dell'involucro secrete (Simsek et al, J Virol 79:12914-

12920, 2005). Oltre a HBV, altri virus dell'epatite (A, C, D ed E) possono anche utilizzare la via di degradazione di ubiquitina-proteasoma per secrezione, morfogenesi e patogenesi. Di conseguenza, in determinate forme di realizzazione è fornito un metodo per trattare un'infezione virale, come SARS o epatite A, B, C, D ed E, comprendente porre a contatto una cellula con (o somministrare a un paziente) una quantità efficace del composto divulgato nel presente documento.

La sovrapproduzione di citochine indotte da lipopolisaccaridi (LPS) come TNF $\alpha$  è considerata centrale per i processi associati a shock settico. Inoltre, è generalmente accettato che la prima fase nell'attivazione di cellule mediante LPS sia il legame di LPS a recettori di membrana specifici. Le subunità  $\alpha$  e  $\beta$  del complesso del proteasoma 20S sono state identificate come proteine leganti LPS, suggerendo che la trasduzione del segnale indotta da LPS può essere un importante bersaglio terapeutico nel trattamento o nella prevenzione della sepsi (Qureshi, N. et al., J. Immun. (2003) 171: 1515-1525). Pertanto, in determinate forme di realizzazione, le composizioni come fornite nel presente documento possono essere usate per l'inibizione di TNF $\alpha$  per prevenire e/o trattare lo shock settico.

La proteolisi intracellulare genera piccoli peptidi per la presentazione a linfociti T per indurre risposte immunitarie mediate da MHC di classe I. Il sistema immunitario sottopone a screening cellule autologhe che sono infettate da virus o hanno subito una trasformazione oncogena. È divulgato ma non rivendicato un metodo per inibire la

B

presentazione dell'antigene in una cellula, inclusa l'esposizione della cellula a una composizione descritta nel presente documento. È divulgato ma non rivendicato un metodo per sopprimere il sistema immunitario di un paziente (ad esempio, inibire il rigetto di trapianto, l'allergia, l'asma), inclusa la somministrazione al paziente di una quantità efficace di una composizione descritta nel presente documento. Le composizioni fornite nel presente documento possono anche essere usate per trattare malattie autoimmuni come lupus, artrite reumatoide, sclerosi multipla e malattie infiammatorie intestinali come colite ulcerosa e malattia di Crohn.

È divulgato, ma non rivendicato, un metodo per alterare il repertorio di peptidi antigenici prodotti dal proteasoma o altro Ntn con attività multicatalitica. Per esempio, se l'attività di PGPH del proteasoma 20S è selettivamente inibita, un diverso insieme di peptidi antigenici sarà prodotto dal proteasoma e presentato in molecole di MHC sulle superfici delle cellule rispetto a quanto verrebbe prodotto e presentato senza alcuna inibizione enzimatica, o con, per esempio, l'inibizione selettiva dell'attività simile a chimotripsina del proteasoma.

Alcuni inibitori del proteasoma bloccano sia la degradazione sia il processamento di NF- $\kappa$ B *in vitro* e *in vivo*. Gli inibitori del proteasoma bloccano anche la degradazione di I $\kappa$ B- $\alpha$  e l'attivazione di NF- $\kappa$ B (Palombella, et al. Cell (1994) 78:773-785; e Traenckner, et al., EMBO J. (1994) 13:5433-5441). In alcune forme di realizzazione è fornito un metodo per inibire la degradazione di I $\kappa$ B- $\alpha$ , inclusa la messa a contatto

della cellula con una composizione descritta nel presente documento. È divulgato ma non rivendicato un metodo per ridurre il contenuto cellulare di NF-κB in una cellula, un muscolo, un organo o un paziente, incluso il contatto della cellula, del muscolo, dell'organo o del paziente con una composizione descritta nel presente documento.

Altri fattori di trascrizione eucariotica che richiedono il processamento proteolitico includono il fattore generale di trascrizione TFIIA, la proteina accessoria VP16 del virus herpes simplex (fattore della cellula ospite), la proteina 2 del fattore regolatorio di IFN inducibile da virus, e la proteina 1 legante l'elemento regolatore dello sterolo legata alla membrana.

Sono inoltre forniti nel presente documento metodi per influenzare cicli di cellule eucariote dipendenti dalla ciclina, inclusa l'esposizione di una cellula (*in vitro* o *in vivo*) a una composizione divulgata nel presente documento. Le cicline sono proteine coinvolte nel controllo del ciclo cellulare. Il proteasoma partecipa alla degradazione delle cicline. Esempi di cicline includono cicline mitotiche, cicline G1 e ciclina B. La degradazione delle cicline permette a una cellula di uscire da uno stadio del ciclo cellulare (ad esempio, mitosi) ed entrare in un altro (ad esempio, divisione). Si ritiene che tutte le cicline siano associate a protein chinasi p34cdc2 o a chinasi correlate. Il segnale di bersagliamento della proteolisi è localizzato sugli amminoacidi 42-RAALGNISEN-50 (motivo di distruzione). Vi sono evidenze che la ciclina viene convertita in una forma vulnerabile a una ubiquitina ligasi o che una

ligasi specifica per ciclina viene attivata durante la mitosi (Ciechanover, A., Cell, (1994) 79:13-21). L'inibizione del proteasoma inibisce la degradazione della ciclina e, pertanto, inibisce la proliferazione cellulare, per esempio, in cancro correlati alla ciclina (Kumatori et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87:7071-7075). Nella presente è fornito un metodo per trattare una malattia proliferativa in un paziente (ad esempio, cancro, psoriasi o restenosi), inclusa la somministrazione al paziente di una quantità efficace di una composizione divulgata nel presente documento. Nella presente è altresì fornito un metodo per trattare in un paziente un'inflammatione correlata alla ciclina, inclusa la somministrazione a un paziente di una quantità terapeuticamente efficace di una composizione descritta nel presente documento.

Sono divulgati ma non rivendicati metodi per influenzare la regolazione dipendente dal proteasoma di oncoproteine e metodi per trattare o inibire la crescita del cancro, ciascun metodo includendo l'esposizione di una cellula (*in vivo*, ad esempio, in un paziente, o *in vitro*) a una composizione divulgata nel presente documento. Le proteine E6 derivate da HPV-16 e HPV-18 stimolano la coniugazione dipendente da ATP e ubiquitina e la degradazione di p53 nei lisati di reticolociti grezzi. È stato dimostrato che l'oncogene recessivo p53 si accumula alla temperatura non permissiva in una linea cellulare con un E1 termolabile mutato. Livelli elevati di p53 possono portare all'apoptosi. Esempi di proto-oncoproteine degradate dal sistema dell'ubiquitina includono c-Mos, c-Fos e c-Jun. È divulgato un metodo per trattare l'apoptosi

13

correlata a p53 che include la somministrazione a un paziente di una quantità efficace di una composizione divulgata nel presente documento.

È divulgato ma non rivendicato che le composizioni divulgate sono utili per il trattamento di un'infezione parassitaria, come infezioni causate da parassiti protozoi. Si considera che il proteasoma di questi parassiti sia coinvolto principalmente nelle attività di differenziazione e replicazione cellulare (Paugam et al., Trends Parasitol. 2003, 19(2): 55-59). Inoltre, è stato mostrato che le specie di entamoeba perdono la capacità di encistazione quando esposte a inibitori del proteasoma (Gonzales, et al., Arch. Med. Res. 1997, 28, Spec No: 139-140). Le composizioni divulgate sono utili per il trattamento di infezioni parassitarie negli esseri umani causate da un parassita protozoo selezionato tra Plasmodium sps. (inclusi P. falciparum, P. vivax, P. malariae e P. ovale, che causano la malaria), Trypanosoma sps. (inclusi T. cruzi, che causa la malattia di Chagas e T. brucei che causa la malattia del sonno africana), Leishmania sps. (inclusi L. amazonensis, L. donovani, L. infantum, L. mexicana, ecc.), Pneumocystis carinii (un protozoo noto per causare polmonite in pazienti con AIDS e altri pazienti immunosoppressi), Toxoplasma gondii, Entamoeba histolytica, Entamoeba invadens e Giardia lamblia. Le composizioni divulgate sono utili per il trattamento di infezioni parassitarie in animali e bestiame indotte da un parassita protozoo selezionato tra Plasmodium hermani, Cryptosporidium sps., Echinococcus granulosus, Eimeria tenella, Sarcocystis neurona e Neurospora crassa. Altri composti utili come

inibitori del proteasoma nel trattamento di malattie parassitarie sono descritti in WO 98/10779.

Le composizioni divulgate possono inibire irreversibilmente l'attività del proteasoma in un parassita. È stato mostrato che tale inibizione irreversibile induce l'arresto dell'attività enzimatica senza recupero nei globuli rossi e nei globuli bianchi. La lunga emivita delle cellule del sangue può fornire protezione prolungata in relazione alla terapia contro esposizioni ricorrenti a parassiti. La lunga emivita delle cellule del sangue può fornire una protezione prolungata in relazione alla chemioprolifassi contro le infezioni future.

I procarioti hanno ciò che è equivalente alla particella proteasomica 20S degli eucarioti. Sebbene la composizione della subunità della particella 20S dei procarioti sia più semplice di quella degli eucarioti, essa ha la capacità di idrolizzare i legami peptidici in modo simile. Per esempio, l'attacco nucleofilo sul legame peptidico si verifica attraverso il residuo di treonina sulla regione N-terminale delle subunità  $\beta$ . È divulgato ma non rivendicato un metodo per trattare infezioni procariotiche comprendente la somministrazione a un paziente di una quantità efficace della composizione di inibitore del proteasoma divulgata nel presente documento. Le infezioni procariotiche possono includere malattie causate da micobatteri (come tubercolosi, lebbra o ulcera di Buruli) o archeobatteri.

È stato anche dimostrato che gli inibitori che si legano al proteasoma 20S stimolano la formazione ossea nelle colture di organi

ossei. Inoltre, quando tali inibitori sono stati somministrati per via sistemica ai topi, alcuni inibitori del proteasoma hanno aumentato il volume osseo e i tassi di formazione ossea di oltre il 70% (Garrett, I. R. et al., J. Clin. Invest. (2003) 111: 1771-1782), suggerendo quindi che il meccanismo ubiquitina-proteasoma regola la differenziazione degli osteoblasti e la formazione ossea. Pertanto, le composizioni divulgate possono essere utili nel trattamento e/o nella prevenzione di malattie associate alla perdita ossea, come l'osteoporosi.

Nella presente è fornito un metodo per trattare una malattia o condizione selezionata tra cancro, malattia autoimmune, condizione correlata all'innesto o al trapianto, malattia neurodegenerativa, condizione associata a fibrosi, condizioni correlate a ischemia, infezione (virale, parassitaria o procariotica) e malattie associate a perdita ossea, comprendente la somministrazione di un inibitore del proteasoma come fornito nel presente documento. Per esempio, un composto di formula (5).

Il tessuto osseo è un'ottima fonte di fattori che hanno la capacità di stimolare le cellule ossee. Pertanto, gli estratti di tessuto osseo bovino contengono non solo proteine strutturali che sono responsabili del mantenimento dell'integrità strutturale dell'osso, ma anche fattori di crescita ossea biologicamente attivi che possono stimolare la proliferazione delle cellule ossee. Tra questi ultimi fattori vi è una famiglia recentemente descritta di proteine chiamate proteine morfogenetiche ossee (BMP). Tutti questi fattori di crescita hanno effetti su altri tipi di

cellule, così come sulle cellule ossee, tra cui Hardy, M. H., et al., *Trans Genet* (1992) 8:55-61 descrive l'evidenza che le proteine morfogenetiche ossee (BMP) sono espresse in modo differenziato nei follicoli piliferi durante lo sviluppo. Harris, S. E., et al., *J Bone Miner Res* (1994) 9:855-863 descrive gli effetti del TGF- $\beta$  sull'espressione di BMP-2 e altre sostanze nelle cellule ossee. L'espressione di BMP-2 nei follicoli maturi si verifica anche durante la maturazione e dopo il periodo di proliferazione cellulare (Hardy, et al. (1992, supra). Pertanto, i composti forniti nella presente possono anche essere utili per la stimolazione della crescita del follicolo pilifero.

Infine, le composizioni divulgate sono utili anche come agenti diagnostici (ad esempio, in kit diagnostici o per l'uso in laboratori clinici) per lo screening di proteine (ad esempio, enzimi, fattori di trascrizione) processate da Ntn idrolasi, incluso il proteasoma. Le composizioni divulgate sono anche utili come reagenti di ricerca per legare in modo specifico la subunità X/MB1 o la catena  $\alpha$  e inibire le attività proteolitiche ad essa associate. Per esempio, è possibile determinare l'attività di (e specifici inibitori di) altre subunità del proteasoma.

La maggior parte delle proteine cellulari sono soggette a processi proteolitici durante la maturazione o l'attivazione. Gli inibitori enzimatici divulgati nella presente possono essere utilizzati per determinare se un processo o un prodotto cellulare, di sviluppo o fisiologico è regolato dall'attività proteolitica di una particolare Ntn idrolasi. Uno di questi metodi include ottenere un organismo, una preparazione cellulare intatta,

B

o un estratto cellulare; esporre l'organismo, la preparazione cellulare o l'estratto cellulare a una composizione divulgata nella presente; esporre l'organismo, la preparazione cellulare o l'estratto cellulare esposti al composto a un segnale, e monitorare il processo o il prodotto. L'elevata selettività dei composti divulgati nella presente consente una rapida e accurata eliminazione o implicazione del Ntn (per esempio, il proteasoma 20S) in un dato processo cellulare, di sviluppo, o fisiologico.

### **Somministrazione**

Le composizioni per l'uso preparate come descritto nel presente documento possono essere somministrate in varie forme, a seconda del disturbo da trattare e dell'età, della condizione e del peso corporeo del paziente, come è ben noto nell'arte. Ad esempio, laddove le composizioni debbano essere somministrate per via orale, esse possono essere formulate come compresse, capsule, granuli, polveri, o sciroppi; o, per somministrazione parenterale, possono essere formulate come iniezioni (endovenose, intramuscolari o sottocutanee), preparazioni per infusione a gocce, o supposte. Per applicazione mediante la membrana mucosa oftalmica, possono essere formulate come colliri o unguenti oculari. Queste formulazioni possono essere preparate mediante mezzi convenzionali unitamente ai metodi descritti nel presente documento, e, se lo si desidera, il principio attivo può essere miscelato con qualsiasi additivo o eccipiente convenzionale, come un legante, un agente disgregante, un lubrificante, un correttivo, un agente solubilizzante, un coadiuvante di sospensione, un agente emulsionante, o un agente di

rivestimento oltre a una ciclodestrina e un tampone. Sebbene il dosaggio varierà a seconda dei sintomi, dell'età e del peso corporeo del paziente, della natura e della gravità del disturbo da trattare o prevenire, della via di somministrazione e della forma del farmaco, in generale, un dosaggio giornaliero da 0,01 a 2000 mg del composto è raccomandato per un paziente umano adulto, e questo può essere somministrato in una singola dose o in dosi divise. La quantità di principio attivo che può essere combinata con un materiale veicolante per produrre una forma di dosaggio singola sarà generalmente quella quantità del composto che produce un effetto terapeutico. In generale, le composizioni destinate all'uso parenterale (ad esempio, iniezione endovenosa, sottocutanea) includono una ciclodestrina sostituita. Le composizioni somministrate attraverso altre vie, in particolare la via orale, includono una ciclodestrina sostituita o non sostituita.

La tempistica di somministrazione e/o la quantità della composizione precise che produrranno i risultati più efficaci in termini di efficacia di trattamento in un dato paziente dipenderanno dall'attività, dalla farmacocinetica e dalla biodisponibilità di un particolare composto, dalla condizione fisiologica del paziente (inclusi età, sesso, tipo e stadio della malattia, condizioni fisiche generali, capacità di risposta a un determinato dosaggio e tipo di farmaco), dalla via di somministrazione, eccetera. Tuttavia, le linee guida di cui sopra possono essere usate come base per la messa a punto del trattamento, ad esempio determinando la tempistica e/o la quantità ottimale di somministrazione, che non

13

richiederà altro che una sperimentazione di routine consistente nel monitorare il paziente e nel regolare il dosaggio e/o la tempistica.

L'espressione "farmaceuticamente accettabile" è impiegata nella presente per riferirsi a quei ligandi, materiali, composizioni e/o forme di dosaggio che sono, nell'ambito di un sano giudizio medico, adatti per l'uso a contatto con i tessuti di esseri umani e animali senza eccessiva tossicità, irritazione, risposta allergica o altri problemi o complicanze, commisurati a un ragionevole rapporto rischio/beneficio.

La frase "veicolante farmaceuticamente accettabile", come usata nella presente, significa un materiale, una composizione, o un veicolo farmaceuticamente accettabile, come una carica, un diluente, un eccipiente, un solvente o un materiale incapsulante liquido o solido. Ciascun veicolante deve essere "accettabile" nel senso di essere compatibile con gli altri ingredienti della formulazione e non dannoso per il paziente. Alcuni esempi di materiali che possono servire da veicolanti farmaceuticamente accettabili includono: (1) zuccheri, come lattosio, glucosio, e saccarosio; (2) amidi, come amido di mais, amido di patata, e  $\beta$ -ciclodestrina sostituita o non sostituita; (3) cellulosa, e suoi derivati, come carbossimetilcellulosa sodica, etilcellulosa e acetato di cellulosa; (4) gomma adragante in polvere; (5) malto; (6) gelatina; (7) talco; (8) eccipienti, come burro di cacao e cere per supposte; (9) oli, come olio di arachidi, olio di semi di cotone, olio di girasole, olio di sesamo, olio d'oliva, olio di mais e olio di soia; (10) glicoli, come propilen glicole; (11) polioli, come glicerina, sorbitolo, mannitolo e polietilen glicole; (12) esteri, come

etil oleato ed etil laurato; (13) agar; (14) agenti tamponanti, come idrossido di magnesio e idrossido di alluminio; (15) acido alginico; (16) acqua apirogena; (17) soluzione salina isotonica; (18) soluzione di Ringer; (19) alcol etilico; (20) soluzioni di tampone fosfato; e (21) altre sostanze compatibili non tossiche impiegate nelle formulazioni farmaceutiche. In determinate forma di realizzazione, composizioni farmaceutiche fornite nella presente sono apirogene, ossia, non inducono significativi aumenti di temperatura quando somministrate a un paziente.

L'espressione "sale farmaceuticamente accettabile" si riferisce ai sali di addizione di acidi organici, inorganici e relativamente atossici dell'uno o più inibitori. Questi sali possono essere preparati in situ durante l'isolamento e la purificazione finale dell'uno o più inibitori, oppure facendo reagire separatamente un inibitore del proteasoma peptidico purificato nella sua forma di base libera con un acido organico o inorganico adatto, e isolando il sale così formato. Sali rappresentativi includono i sali bromidrato, cloridrato, solfato, bisolfato, fosfato, nitrato, acetato, valerato, oleato, palmitato, stearato, laurato, benzoato, lattato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoptonato, lattobionato, sali di laurilsolfonato, e sali di amminoacidi, e simili. (Si veda, per esempio, Berge et al. (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66: 1-19.)

In alcune forme di realizzazione, gli inibitori del proteasoma peptidico forniti nel presente documento possono contenere uno o più

gruppi funzionali acidi e, pertanto, sono in grado di formare sali farmaceuticamente accettabili con basi farmaceuticamente accettabili. L'espressione "sali farmaceuticamente accettabili" si riferisce, in questi casi, ai sali di addizione basica inorganici o organici relativamente atossici di uno o più inibitori. Anche questi sali possono essere preparati in situ durante l'isolamento e la purificazione finale dell'uno o più inibitori, o facendo reagire separatamente l'uno o più inibitori nella loro forma di acido libero con una base adatta, come idrossido, carbonato o bicarbonato di un catione metallico farmaceuticamente accettabile, con ammoniaca o con una ammina primaria, secondaria o terziaria organica farmaceuticamente accettabile. Sali alcalini o alcalino terrosi rappresentativi includono i sali di litio, sodio, potassio, calcio, magnesio e alluminio. Ammine organiche rappresentative utili per la formazione di sali di addizione basica includono etilammina, dietilammina, etilendiammina, etanolammina, dietanolammina, piperazina (si veda, per esempio, Berge et al., sopra).

Agenti umettanti, emulsionanti e lubrificanti, come sodio lauril solfato e stearato di magnesio, nonché agenti coloranti, agenti di rilascio, agenti di rivestimento, agenti dolcificanti, aromatizzanti e profumanti, conservanti e antiossidanti possono anche essere presenti nelle composizioni.

Esempi di antiossidanti farmaceuticamente accettabili includono:  
(1) antiossidanti solubili in acqua come acido ascorbico, cisteina cloridrato, bisolfato di sodio, metabisolfito di sodio, solfito di sodio; (2)

13

antiossidanti solubili in olio come ascorbil palmitato, idrossianisolo butilato (BHA), idrossitoluene butilato (BHT), lecitina, propil gallato, alfa-tocoferolo; e (3) agenti chelanti dei metalli come acido citrico, acido etilendiamminotetraacetico (EDTA), sorbitolo, acido tartarico, acido fosforico.

Formulazioni adatte per somministrazione orale possono essere sotto forma di capsule, cachet, pillole, compresse, pastiglie orosolubili (usando una base aromatizzata, solitamente saccarosio e gomma di acacia o adragante), polveri, granuli, o come soluzione o sospensione in un liquido acquoso o non acquoso, come un'emulsione olio in acqua o acqua in olio, o come un elisir o sciroppo o come pastiglie (usando una matrice inerte, come gelatina e glicerina, o saccarosio e gomma di acacia) e/o come collutori e simili, ciascuno contenendo una quantità predeterminata di uno o più inibitori dell'invenzione come principio attivo. Una composizione può anche essere somministrata come bolo, elettuario, o pasta.

In forme di dosaggio solide per somministrazione orale (capsule, compresse, pillole, confetti, polveri, granuli, e simili), l'ingrediente attivo viene miscelato con uno o più trasportatori farmaceuticamente accettabili, come citrato di sodio o fosfato dicalcico e/o qualsiasi tra i seguenti: (1) cariche o espandenti, come amidi, ciclodestrine, lattosio, saccarosio, glucosio, mannitolo e/o acido silicico; (2) leganti come, per esempio, carbossimetilcellulosa, alginati, gelatina, polivinilpirrolidone, saccarosio, e/o acacia; (3) umettanti, come glicerolo; (4) agenti

disgreganti, come agar-agar, carbonato di calcio, amido di patata o tapioca, acido alginico, alcuni silicati, e carbonato di sodio; (5) agenti ritardanti di soluzione, come paraffina; (6) acceleratori di assorbimento, come composti di ammonio quaternario; (7) agenti umettanti, come, per esempio, alcol cetilico e glicerolo monostearato (8) assorbenti, come caolino e argilla di bentonite; (9) lubrificanti, come talco, stearato di calcio, stearato di magnesio, polietilen glicoli solidi, sodio lauril solfato, e loro miscele; e (10) agenti coloranti. Nel caso di capsule, compresse, e pillole, le composizioni farmaceutiche possono anche comprendere agenti tamponanti. Composizioni solide di tipo simile possono anche essere impiegate come cariche in capsule di gelatina molli e dure usando tali eccipienti come lattosio o zuccheri del latte, nonché polietilen glicoli ad alto peso molecolare, e simili.

Una compressa può essere realizzata mediante compressione o stampaggio, facoltativamente con uno o più ingredienti accessori. Compresse pressate possono essere preparate usando un legante (ad esempio, gelatina o idrossipropilmetil cellulosa), lubrificante, diluente inerte, conservante, disgregante (ad esempio, sodio amido glicolato o carbossimetilcellulosa sodica reticolata), agente disperdente o attivo in superficie. Le compresse pressate possono essere realizzate stampando in una macchina adatta una miscela degli uno o più inibitori in polvere umidificati con un diluente liquido inerte.

Compresse, e altre forme di dosaggio solide, come confetti, capsule, pillole, e granuli, possono essere facoltativamente incise o

preparate con rivestimenti e involucri, come rivestimenti enterici e altri rivestimenti ben noti nell'arte della formulazione farmaceutica. Esse possono anche essere formulate in modo da fornire un rilascio lento o controllato del principio attivo al suo interno usando, ad esempio, idrossipropilmetilcellulosa in proporzioni variabili per fornire il profilo di rilascio desiderato, altre matrici polimeriche, liposomi e/o microsfele. Esse possono essere sterilizzate mediante, ad esempio, filtrazione attraverso un filtro che trattiene i batteri, o mediante incorporazione di agenti sterilizzanti in forma di composizioni solide sterili che possono essere disciolte in acqua sterile, o qualche altro mezzo iniettabile sterile immediatamente prima dell'uso. Queste composizioni possono anche facoltativamente contenere agenti opacizzanti e possono essere di una composizione tale per cui essi rilasciano l'uno o più principi attivi soltanto, o di preferenza, in una determinata porzione del tratto gastrointestinale, facoltativamente, in modo ritardato. Esempi di composizioni di incorporazione che possono essere usate includono sostanze polimeriche e cere. Il principio attivo può anche essere in una forma micro-incapsulata, se opportuno, con uno o più degli eccipienti descritti sopra.

Forme di dosaggio liquide per somministrazione orale includono emulsioni, microemulsioni, soluzioni, sospensioni, sciroppi ed elisir farmaceuticamente accettabili. In aggiunta al principio attivo, le forme di dosaggio liquide possono contenere diluenti inerti usati comunemente nell'arte come, ad esempio, acqua o altri solventi, agenti solubilizzanti ed

emulsionanti come alcol etilico, alcol isopropilico, etil carbonato, etil acetato, alcol benzilico, benzil benzoato, propilen glicole, 1,3-butilen glicole, oli (in particolare, oli di semi di cotone, arachidi, mais, germe, oliva, ricino e sesamo), glicerolo, alcol tetraidrofurfurilico, polietilen glicoli ed esteri di acidi grassi di sorbitano, e loro miscele.

Oltre ai diluenti inerti, le composizioni orali possono includere anche adiuvanti come agenti umettanti, agenti emulsionanti e di sospensione, agenti dolcificanti, aromatizzanti, coloranti, profumanti e conservanti.

Le sospensioni, in aggiunta all'uno o più inibitori attivi, possono contenere agenti di sospensione, per esempio, alcoli isostearilici etossilati, sorbitolo di poliossietilene ed esteri di sorbitano, cellulosa microcristallina, metaidrossido di alluminio, bentonite, agar-agar e gomma adragante, e loro miscele.

Le formulazioni per somministrazione rettale o vaginale possono essere presentate come supposta, che può essere preparata miscelando uno o più inibitori con uno o più eccipienti o veicolanti non irritanti adatti comprendenti, ad esempio, burro di cacao, polietilen glicole, una cera per supposte o un salicilato, che sia solida a temperatura ambiente ma liquida a temperatura corporea e che, pertanto, si scioglierà nel retto o nella cavità vaginale e rilascerà l'agente attivo.

Formulazioni che sono adatte per somministrazione vaginale includono anche ovuli, tamponi, creme, gel, paste, schiume, o

formulazioni spray contenenti tali veicolanti che sono noti nell'arte per essere appropriati.

Forme di dosaggio per somministrazione topica o transdermica di uno o più inibitori includono polveri, spray, unguenti, paste, creme, lozioni, gel, soluzioni, cerotti e inalanti. Il componente attivo può essere miscelato in condizioni sterili con un trasportatore farmaceuticamente accettabile, e con qualsiasi conservante, tampone o propellente che può essere richiesto.

Gli unguenti, le paste, le creme e i gel possono contenere, in aggiunta all'uno o più inibitori, eccipienti come grassi animali e vegetali, oli, cere, paraffine, amido, gomma adragante, derivati di cellulosa, polietilen glicoli, siliconi, bentoniti, acido silicico, talco e ossido di zinco, o loro miscele.

Polveri e spray possono contenere, in aggiunta all'uno o più inibitori, eccipienti come lattosio, talco, acido silicico, idrossido di alluminio, silicati di calcio e polvere di poliammide, o miscele di queste sostanze. Gli spray possono in aggiunta contenere propellenti abituali, come clorofluoroidrocarburi e idrocarburi non sostituiti volatili, come butano e propano.

Un inibitore del proteasoma peptidico può essere somministrato mediante aerosol. Ciò si consegue preparando un aerosol acquoso, una preparazione liposomiale, o particelle solide contenenti la composizione. Potrebbe essere usata una sospensione non acquosa (ad esempio, propellente fluorocarburo). In alcune forme di realizzazione, sono

preferiti nebulizzatori sonici perché riducono al minimo l'esposizione dell'agente al taglio, che può risultare nella degradazione del composto.

Ordinariamente, un aerosol acquoso viene realizzato formulando una soluzione o sospensione acquosa dell'agente insieme a veicolanti e stabilizzanti farmaceuticamente accettabili convenzionali. I veicolanti e gli stabilizzanti variano a seconda dei requisiti della particolare composizione, ma tipicamente includono tensioattivi non ionici (Tween, Pluronic, esteri di sorbitano, lecitina, Cremophor), co-solventi farmaceuticamente accettabili come polietilen glicole, proteine innocue come albumina sierica, esteri di sorbitano, acido oleico, lecitina, amminoacidi come glicina, tamponi, sali, zuccheri, o alditoli. Gli aerosol sono generalmente preparati da soluzioni isotoniche.

I cerotti transdermici hanno il valore aggiunto di fornire un'erogazione controllata di uno o più inibitori al corpo. Tali forme di dosaggio possono essere realizzate sciogliendo o disperdendo l'agente nel mezzo appropriato. Possono essere usati anche potenziatori di assorbimento per aumentare il flusso dell'uno o più inibitori attraverso la cute. La velocità di tale flusso può essere controllata fornendo una membrana che controlla la velocità o disperdendo l'uno o più inibitori in una matrice polimerica o gel.

Composizioni farmaceutiche adatte per somministrazione parenterale comprendono uno o più inibitori del proteasoma peptidico in combinazione con una o più soluzioni, dispersioni, sospensioni o emulsioni sterili acquose o non acquose farmaceuticamente accettabili,

o polveri sterili che possono essere ricostituite in soluzioni o dispersioni iniettabili sterili subito prima dell'uso, che possono contenere antiossidanti, tamponi, batteriostatici, soluti che rendono la formulazione isotonica rispetto al sangue del ricevente previsto o agenti di sospensione o addensanti.

Esempi di veicolanti acquosi e non acquosi adatti che possono essere impiegati nelle composizioni farmaceutiche fornite nel presente documento includono acqua per preparazioni iniettabili (ad esempio, acqua sterile per preparazioni iniettabili), etanolo, polioli (come glicerolo, propilen glicole, polietilenglicole), tamponi (come tampone citrato) e loro miscele adatte, oli vegetali, come olio di oliva, ed esteri organici iniettabili, come etil oleato. Una corretta fluidità può essere mantenuta, ad esempio, mediante l'uso di materiali di rivestimento, come lecitina, mediante il mantenimento della dimensione particellare richiesta nel caso di dispersioni e mediante l'uso di tensioattivi.

Le composizioni farmaceutiche tipicamente includono un veicolante farmaceuticamente accettabile. Secondo l'uso fattone nel presente documento, l'espressione "trasportatore farmaceuticamente accettabile" include tampone, acqua sterile per iniettabili, mezzi di dispersione, rivestimenti, agenti antibatterici e antifungini, agenti isotonici e ritardanti di assorbimento compatibili con la somministrazione farmaceutica. In alcune forme di realizzazione, un trasportatore farmaceuticamente accettabile è un tampone (ad esempio, tampone citrato). In alcune forme di realizzazione, un veicolante

farmaceuticamente accettabile è acqua sterile per preparazioni iniettabili. In alcune forme di realizzazione, un veicolante farmaceuticamente accettabile comprende acido citrico.

Queste composizioni farmaceutiche possono contenere anche adiuvanti come conservanti, agenti umettanti, agenti emulsionanti, e agenti disperdenti. La prevenzione dell'azione di microorganismi può essere garantita dall'inclusione di vari agenti antibatterici e antifungini, per esempio, parabeni, clorobutanolo, fenolo, acido sorbico. Può anche essere desiderabile includere nelle composizioni agenti di regolazione della tonicità, come zuccheri. In aggiunta, l'assorbimento prolungato della forma farmaceutica iniettabile può essere indotto dall'inclusione di agenti che ritardano l'assorbimento come monostearato di alluminio e gelatina.

In alcuni casi, al fine di prolungare l'effetto di un farmaco, è desiderabile rallentare l'assorbimento del farmaco da un'iniezione sottocutanea o intramuscolare. Per esempio, l'assorbimento ritardato di una forma di farmaco somministrata per via parenterale viene realizzato dissolvendo o sospendendo il farmaco in un veicolo oleoso.

Le forme di deposito iniettabili vengono realizzate formando matrici di uno o più inibitori in polimeri biodegradabili come polilattide-poliglicolide. A seconda del rapporto tra farmaco e polimero e della natura del particolare polimero impiegato, la velocità di rilascio del farmaco può essere controllata. Esempi di altri polimeri biodegradabili includono poli(ortoesteri) e poli(anidridi). Formulazioni depot iniettabili sono

preparate anche intrappolando il farmaco in liposomi o microemulsioni che sono compatibili con un tessuto corporeo.

Le preparazioni di agenti possono essere somministrate per via orale, parenterale, topica o rettale. Sono, ovviamente, fornite mediante forme adatte per ciascuna via di somministrazione. Per esempio, vengono somministrate sotto forma di compresse o capsule, mediante iniezione, inalazione, lozione oculare, unguento, supposta, infusione; per via topica mediante lozione o unguento; e per via rettale mediante supposte. In alcune forme di realizzazione, la somministrazione è orale.

Le frasi "somministrazione parenterale" e "sommministrato per via parenterale", come utilizzate nella presente, indicano modalità di somministrazione diverse dalla somministrazione enterale e topica, solitamente mediante iniezione, e includono, senza limitazione, iniezione e infusione endovenose, intramuscolari, intrarteriose, intratecali, intracapsulari, intraorbitali, intracardiache, intradermiche, intraperitoneali, transtracheali, sottocutanee, sottocuticolari, intrarticolari, sottocapsulari, subaracnoidee, intraspinali, e intrasternali.

Le frasi "somministrazione sistemica", "sommministrato per via sistemica", "somministrazione periferica", e "sommministrato per via periferica", come utilizzate nella presente, indicano la somministrazione di un ligando, farmaco, o altro materiale diversa da direttamente nel sistema nervoso centrale, in modo tale che entri nel sistema del paziente e quindi, sia sottoposto a metabolismo e altri processi simili, ad esempio somministrazione sottocutanea.

Gli inibitori del proteasoma peptidico descritti nel presente documento possono essere somministrati agli esseri umani e ad altri animali per la terapia mediante qualsiasi via di somministrazione adatta, inclusa la via orale, nasale, come, ad esempio, uno spray, rettale, intravaginale, parenterale, intracisternale e topica, come mediante polveri, unguenti o gocce, anche per via buccale e sublinguale.

Indipendentemente dalla via di somministrazione selezionata, un inibitore del proteasoma peptidico, che può essere usato in una forma idrata adatta, e/o le composizioni farmaceutiche fornite nella presente, viene formulato in una forma di dosaggio farmaceuticamente accettabile mediante metodi convenzionali noti ai tecnici del ramo.

I livelli di dosaggio effettivi degli ingredienti attivi nelle composizioni farmaceutiche fornite nella presente possono essere variati in modo da ottenere una quantità dell'ingrediente attivo che sia efficace per conseguire la risposta terapeutica desiderata per un/una particolare paziente, composizione e modalità di somministrazione, senza che sia tossica per il paziente.

La concentrazione di un composto divulgato in una miscela farmaceuticamente accettabile varierà a seconda di diversi fattori, inclusi il dosaggio del composto da somministrare, le caratteristiche farmacocinetiche dell'uno o più composti impiegati, e la via di somministrazione. In generale, le composizioni fornite nel presente documento possono essere fornite in una soluzione acquosa contenente circa lo 0,1-10% p/v di un composto divulgato nel presente documento,

tra le altre sostanze, per la somministrazione parenterale. Tipici intervalli di dose sono da circa 0,01 a circa 50 mg/kg di peso corporeo al giorno, somministrati in 1-4 dosi divise. Ciascuna dose divisa può contenere composti uguali o differenti. Il dosaggio sarà una quantità efficace che dipende da svariati fattori, incluse la salute generale di un paziente e la formulazione e la via di somministrazione dell'uno o più composti selezionati.

In un'altra forma di realizzazione, la composizione farmaceutica è una soluzione orale o una soluzione parenterale. Un'altra forma di realizzazione è una preparazione liofilizzata che può essere ricostituita prima della somministrazione. Come solido, questa formulazione può anche includere compresse, capsule o polveri.

Nella presente è altresì fornita una terapia congiunta in cui uno o più altri agenti terapeutici sono somministrati con un inibitore del proteasoma peptidico o una composizione farmaceutica comprendente un inibitore del proteasoma peptidico. Tale trattamento congiunto può essere ottenuto mediante il dosaggio simultaneo, sequenziale o separato dei singoli componenti del trattamento.

Una composizione fornita nel presente documento (ad esempio, composizioni farmaceutiche che includono carfilzomib, ad esempio KYPROLIS, che contiene 60 mg di carfilzomib, beta-ciclodestrina solfobutiletere 3000 mg, acido citrico 57,7 mg e idrossido di sodio per la regolazione del pH (pH bersaglio 3,5)) può essere somministrata in modo congiunto con uno o più altri inibitori del proteasoma.

B

Una composizione fornita nel presente documento (ad esempio, composizioni farmaceutiche che includono carfilzomib, ad esempio KYPROLIS, che contiene 60 mg di carfilzomib, beta-ciclodestrina solfobutiletere 3000 mg, acido citrico 57,7 mg e idrossido di sodio per la regolazione del pH (pH bersaglio 3,5)) può essere somministrata in modo congiunto con uno o più chemioterapici. Chemioterapici adatti possono includere prodotti naturali come alcaloidi della vinca (ossia vinblastina, vincristina e vinorelbina), taxani (ad esempio, docetaxel, paclitaxel, ad esempio, docetaxel), epidipodofillotossine (ossia, etoposide, teniposide), antibiotici (dactinomicina (actinomicina D) daunorubicina, doxorubicina e idarubicina; ad esempio, doxorubicina), antracicline, mitoxantrone, bleomicine, plicamicina (mitramicina) e mitomicina, enzimi (L-asparaginasi che metabolizza sistematicamente L-asparagina e priva le cellule che non hanno la capacità di sintetizzare la propria asparagina); agenti antiplastrinici; agenti alchilanti antiproliferativi/antimitotici come mostarde azotate (mecloretamina, ifosfamide, ciclofosfamide e analoghi, melfalan, clorambucile, ad esempio, melfalan), etilenimine e metilmelammine (esametilmelamina e tiotepa), alchil-solfonati (busulfan), nitrosouree (carmustina (BCNU) e analoghi, streptozocina), trazeni-dacarbazina (DTIC); antimetaboliti antiproliferativi/antimitotici come analoghi dell'acido folico (metotrexato), analoghi delle pirimidine (fluorouracile, floxuridina e citarabina), analoghi delle purine e relativi inibitori (mercaptipurina, tioguanina, pentostatina e 2-clorodesossiadenosina); inibitori dell'aromatasi (anastrozolo,

13

exemestano e letrozolo); complessi di coordinazione del platino (cisplatino, carboplatino), procarbазina, idrossiurea, mitotano, amminoglutetimide; agenti leganti il DNA / citotossici (ad esempio, Zalypsis); inibitori dell'istone deacetilasi (HDAC) (ad esempio, tricostatina, butirrato di sodio, apicidan, acido suberoil anilide idroamico (SAHA (Vorinostat)), tricostatina A, depsipeptide, apicidina, A-161906, scriptaid, PXD-101, CHAP, acido butirrico, depudecina, oxamflatina, fenilbutirrato, acido valproico, MS275 (N-(2-amminofenil)-4-[N-(piridin-3-ilmetossi-carbonil)amminometil]benzammide), LAQ824/LBH589, CI994, MGCD0103, ACY-1215, Panbinostat); ormoni (ossia estrogeni) e agonisti ormonali come gli agonisti dell'ormone rilasciante l'ormone leutinizzante (LHRH) (goserelina, leuprolide e triptorelina). Altri agenti chemioterapici possono includere mecloretamina, camptotecina, ifosfamida, tamoxifene, raloxifene, gemcitabina, navelbina, o qualsiasi variante analoga o derivata dei precedenti.

Una composizione farmaceutica come fornita nel presente documento (ad esempio, composizioni farmaceutiche che includono carfilzomib, ad esempio KYPROLIS, che contiene 60 mg di carfilzomib, sulfobutiletere beta-ciclodestrina 3000 mg, acido citrico 57,7 mg e idrossido di sodio per la regolazione del pH (pH bersaglio 3,5)) può essere somministrata in modo congiunto con uno o più inibitori di istone deacetilasi (HDAC) (ad esempio, tricostatina, butirrato di sodio, apicidina, acido idrossamico suberoil anilide ("SAHA" (Vorinostat)), tricostatina A, depsipeptide, apicidina, A-161906, scriptaid, PXD-101, CHAP, acido

13

butirrico, depudecina, oxamflatina, fenilbutirrato, acido valproico, MS275 (N-(2-amminofenil)-4-[N-(piridin-3-ilmetossi-carbonil)amminometil]benzammide) LAQ824/LBH589, CI994, MGCD0103, ACY-1215, Panobinostat; ad esempio, SAHA, ACY-1215, Panobinostat).

Una composizione farmaceutica come fornita nel presente documento (ad esempio, composizioni farmaceutiche che includono carfilzomib, ad esempio KYPROLIS, che contiene 60 mg di carfilzomib, beta-ciclodestrina solfobutiletere 3000 mg, acido citrico 57,7 mg e idrossido di sodio per la regolazione del pH (pH bersaglio 3,5)) può essere somministrata in modo congiunto con una o più mostarde azotate (mecloretamina, ifosfamida, ciclofosfamida e analoghi, melfalan, clorambucile, ad esempio, melfalan).

Una composizione farmaceutica come fornita nel presente documento (ad esempio, composizioni farmaceutiche che includono carfilzomib, ad esempio KYPROLIS, che contiene 60 mg di carfilzomib, beta-ciclodestrina solfobutiletere 3000 mg, acido citrico 57,7 mg e idrossido di sodio per la regolazione del pH (pH bersaglio 3,5)) può essere somministrata in modo congiunto con uno o più agenti leganti il DNA/citotossici (ad esempio, Zalypsis).

Una composizione farmaceutica come fornita nel presente documento (ad esempio, composizioni farmaceutiche che includono carfilzomib, ad esempio KYPROLIS, che contiene 60 mg di carfilzomib, beta-ciclodestrina solfobutiletere 3000 mg, acido citrico 57,7 mg e

idrossido di sodio per la regolazione del pH (pH bersaglio 3,5)) può essere somministrata in modo congiunto con uno o più taxani (ad esempio, docetaxel, paclitaxel, ad esempio docetaxel).

Una composizione farmaceutica come fornita nel presente documento (ad esempio, composizioni farmaceutiche che includono carfilzomib, ad esempio KYPROLIS, che contiene 60 mg di carfilzomib, beta-ciclodestrina solfobutiletere 3000 mg, acido citrico 57,7 mg e idrossido di sodio per la regolazione del pH (pH bersaglio 3,5)) può essere somministrata in modo congiunto con uno o più antibiotici (dactinomicina (actinomicina D) daunorubicina, doxorubicina e idarubicina; ad esempio, doxorubicina).

Una composizione farmaceutica come fornita nel presente documento (ad esempio, composizioni farmaceutiche che includono carfilzomib, ad esempio KYPROLIS, che contiene 60 mg di carfilzomib, beta-ciclodestrina solfobutiletere 3000 mg, acido citrico 57,7 mg e idrossido di sodio per la regolazione del pH (pH bersaglio 3,5)) può essere somministrata in modo congiunto con una o più citochine. Le citochine includono, ma non sono limitate a, interferone- $\gamma$ ,  $-\alpha$  e  $-\beta$ , interleuchine 1-8, 10 e 12, fattore stimolante le colonie di granulociti-monociti (GM-CSF), TNF- $\alpha$  e  $-\beta$  e TGF- $\beta$ .

Una composizione farmaceutica fornita nel presente documento (ad esempio, composizioni farmaceutiche che includono carfilzomib, ad esempio KYPROLIS, che contiene 60 mg di carfilzomib, beta-ciclodestrina solfobutiletere 3000 mg, acido citrico 57,7 mg e idrossido di

B

sodio per la regolazione del pH (pH bersaglio 3,5)) può essere somministrata in modo congiunto con uno o più steroidi. Steroidi adatti possono includere, ma non sono limitati a, 21-acetossipregnenolone, alclometasone, algestone, amcinonide, beclometasone, betametasona, budesonide, cloroprednisone, clobetasolo, clocortolone, cloprednolo, corticosterone, cortisone, cortivazolo, deflazacort, desonide, desoximetasona, dexametasone, diflorasona, diflucortolone, difuprednato, enoxolone, fluazacort, flucloronide, flumetasone, flunisolide, acetone di fluocinolone, fluocinonide, fluocortin butilico, fluocortolone, fluorometolone, acetato di fluperolone, acetato di fluprednidene, fluprednisolone, flurandrenolide, fluticasone propionato, formocortal, alcinonide, alobetasol propionato, alometasone, idrocortisone, loteprednol etabonato, mazipredone, medrisone, meprednisone, metilprednisolone, mometasone furoato, parametasone, prednicarbato, prednisolone, prednisolone 25-dietilamminoacetato, prednisolone sodio fosfato, prednisone, prednival, prednilidene, rimexolone, tixocortolo, triamcinolone, triamcinolone acetone, triamcinolone benetonide, triamcinolone esacetone e loro sali e/o derivati (ad esempio, idrocortisone, desametasone, metilprednisolone e prednisolone; ad esempio, desametasone).

Le composizioni farmaceutiche fornite nel presente documento possono essere somministrate in modo congiunto con desametasone (ad esempio, composizioni farmaceutiche che includono carfilzomib, ad esempio KYPROLIS, che contiene 60 mg di carfilzomib, beta-

ciclodestrina solfobutiletere 3000 mg, acido citrico 57,7 mg e idrossido di sodio per la regolazione del pH (pH bersaglio 3,5)). La terapia congiunta può includere i regimi posologici forniti sull'etichetta di KYPROLIS, ad esempio,

1. KYPROLIS è somministrato per via endovenosa nell'arco di 2-10 minuti, su due giorni consecutivi, ogni settimana per tre settimane (Giorni 1, 2, 8, 9, 15 e 16), seguito da un periodo di riposo di 12 giorni (Giorni da 17 a 28). Ciascun periodo di 28 giorni è considerato un ciclo di trattamento (Tabella A).

Nel ciclo 1, KYPROLIS è somministrato a una dose di 20 mg/m<sup>2</sup>. Se tollerata nel Ciclo 1, la dose deve essere aumentata a 27 mg/m<sup>2</sup> a partire dal Ciclo 2 e continuata a 27 mg/m<sup>2</sup> nei cicli successivi. Il trattamento può essere continuato fino alla progressione della malattia o fino a quando non si verifica una tossicità inaccettabile.

La dose viene calcolata usando l'area effettiva della superficie corporea del paziente al basale. I pazienti con un'area superficiale corporea maggiore di 2,2 m<sup>2</sup> dovrebbero ricevere una dose basata su un'area superficiale corporea di 2,2 m<sup>2</sup>. Non è necessario effettuare regolazioni della dose per variazioni di peso inferiori o uguali al 20%.

**Tabella A1: Regime di dosaggio di KYPROLIS per pazienti con mieloma multiplo**

13

		Ciclo 1									
		Settimana 1			Settimana 2			Settimana 3			Settimana 4
KYPR	OLIS (20 mg/m <sup>2</sup> ):	Gior no 1	Gior no 2	Gior ni 3-7	Gior no 8	Gior no 9	Gior ni 10- 14	Gior no 15	Gior no 16	Gior ni 17- 21	Giorni 22-28
				20	20	Ness un dosa ggio	20	20	Ness un dosa ggio	20	20
		Cicli 2 e oltre <sup>a</sup>									
		Settimana 1			Settimana 2			Settimana 3			Settimana 4
KYPR	OLIS (27 mg/m <sup>2</sup> ):	Gior no 1	Gior no 2	Gior ni 3-7	Gior no 8	Gior no 9	Gior ni 10- 14	Gior no 15	Gior no 16	Gior ni 17- 21	Giorni 22-28
		27	27	Ness un dosa ggio	27	27	Ness un dosa ggio	27	27	Ness un dosa ggio	Nessu n dosag gio

<sup>a</sup> Se è tollerato il dosaggio del ciclo precedente.

2. Idratare i pazienti per ridurre il rischio di tossicità renale e di sindrome da lisi tumorale (TLS) da trattamento con KYPROLIS. Mantenere uno stato di volume di fluido adeguato per tutto il trattamento e monitorare da vicino l'ematochimica. Prima di ciascuna dose nel Ciclo 1, somministrare da 250 mL a 500 mL di soluzione salina normale endovenosa o altro fluido endovenoso appropriato. Somministrare da 250 mL a 500 mL ulteriori di fluidi endovenosi secondo necessità dopo la somministrazione di KYPROLIS. Continuare l'idratazione endovenosa, secondo necessità, nei cicli successivi. Monitorare anche i pazienti durante questo periodo per il sovraccarico da fluidi.

3. Pre-medicare con desametasone 4 mg per via orale o endovenosa prima di tutte le dosi di KYPROLIS durante il Ciclo 1 e prima di tutte le dosi di KYPROLIS durante il primo ciclo di incremento della dose fino a 27 mg/m<sup>2</sup> per ridurre l'incidenza e la gravità delle reazioni di infusione. Ripristinare la premedicazione di desametasone (4 mg per via orale o endovenosa) se questi sintomi si sviluppano o si rimaniscono durante i cicli successivi.

Una composizione farmaceutica fornita nel presente documento (ad esempio, composizioni farmaceutiche che includono carfilzomib, ad esempio KYPROLIS, che contiene 60 mg di carfilzomib, beta-ciclodestrina solfobutiletere 3000 mg, acido citrico 57,7 mg e idrossido di

sodio per la regolazione del pH (pH bersaglio 3,5)) può essere somministrata in modo congiunto con uno o più agenti immunoterapici. Agenti immunoterapici adatti possono includere, ma non sono limitati a, modulatori di MDR (verapamil, valsopodar, biricodar, tariquidar, laniquidar), ciclosporina, pomalidomide, talidomide, CC-4047 (Actimid), lenalidomide (Revlimid) e anticorpi monoclonali. Gli anticorpi monoclonali possono essere nudi o coniugati come rituximab, tositumomab, alemtuzumab, epratuzumab, ibritumomab tiuxetano, gemtuzumab ozogamicina, bevacizumab, cetuximab, erlotinib e trastuzumab. Una composizione farmaceutica fornita nel presente documento può essere somministrata in modo congiunto con lenalidomide (Revlimid).

Una composizione farmaceutica fornita nel presente documento (ad esempio, composizioni farmaceutiche che includono carfilzomib, ad esempio KYPROLIS, che contiene 60 mg di carfilzomib, beta-ciclodestrina solfobutiletere 3000 mg, acido citrico 57,7 mg e idrossido di sodio per la regolazione del pH (pH bersaglio 3,5)) può essere somministrata in modo congiunto con uno o più inibitori della topoisomerasi (ad esempio, irinotecano, topotecano, camptotecina, lamellarina D ed etoposide).

Una composizione farmaceutica fornita nel presente documento (ad esempio, composizioni farmaceutiche che includono carfilzomib, ad esempio KYPROLIS, che contiene 60 mg di carfilzomib, beta-ciclodestrina solfobutiletere 3000 mg, acido citrico 57,7 mg e idrossido di sodio per la regolazione del pH (pH bersaglio 3,5)) può essere

somministrata in modo congiunto con uno o più inibitori di m-TOR (ad esempio, CCI-779, AP23573 e RAD-001).

Una composizione farmaceutica fornita nel presente documento (ad esempio, composizioni farmaceutiche che includono carfilzomib, ad esempio KYPROLIS, che contiene 60 mg di carfilzomib, beta-ciclodestrina solfobutiletere 3000 mg, acido citrico 57,7 mg e idrossido di sodio per la regolazione del pH (pH bersaglio 3,5)) può essere somministrata in modo congiunto con uno o più inibitori della protein chinasi (ad esempio, sorafenib, imatinib, dasatinib, sunitinib, pazopanib e nilotinib; ad esempio, sorafenib).

Una composizione farmaceutica fornita nel presente documento (ad esempio, composizioni farmaceutiche che includono carfilzomib, ad esempio KYPROLIS, che contiene 60 mg di carfilzomib, beta-ciclodestrina solfobutiletere 3000 mg, acido citrico 57,7 mg e idrossido di sodio per la regolazione del pH (pH bersaglio 3,5)) può essere somministrata in modo congiunto con uno o più inibitori di CDK (ad esempio, dinaciclib).

Una composizione farmaceutica fornita nel presente documento (ad esempio, composizioni farmaceutiche che includono carfilzomib, ad esempio KYPROLIS, che contiene 60 mg di carfilzomib, beta-ciclodestrina solfobutiletere 3000 mg, acido citrico 57,7 mg e idrossido di sodio per la regolazione del pH (pH bersaglio 3,5)) può essere somministrata in modo congiunto con uno o più inibitori di KSP(Eg5) (ad esempio, Array 520).

13

Una composizione farmaceutica fornita nel presente documento (ad esempio, composizioni farmaceutiche che includono carfilzomib, ad esempio KYPROLIS, che contiene 60 mg di carfilzomib, beta-ciclodestrina solfobutiletere 3000 mg, acido citrico 57,7 mg e idrossido di sodio per la regolazione del pH (pH bersaglio 3,5)) può essere somministrata in modo congiunto con uno o più inibitori delta di PI3K (ad esempio, GS-1101 PI3K).

Una composizione farmaceutica fornita nel presente documento (ad esempio, composizioni farmaceutiche che includono carfilzomib, ad esempio KYPROLIS, che contiene 60 mg di carfilzomib, beta-ciclodestrina solfobutiletere 3000 mg, acido citrico 57,7 mg e idrossido di sodio per la regolazione del pH (pH bersaglio 3,5)) può essere somministrata in modo congiunto con uno o più doppi inibitori: inibitori delta e gamma di PI3K (ad esempio, CAL-130).

Una composizione farmaceutica fornita nel presente documento (ad esempio, composizioni farmaceutiche che includono carfilzomib, ad esempio KYPROLIS, che contiene 60 mg di carfilzomib, beta-ciclodestrina solfobutiletere 3000 mg, acido citrico 57,7 mg e idrossido di sodio per la regolazione del pH (pH bersaglio 3,5)) può essere somministrata in modo congiunto con uno o più inibitori di multichinasi (ad esempio, TG02).

Una composizione farmaceutica fornita nel presente documento (ad esempio, composizioni farmaceutiche che includono carfilzomib, ad esempio KYPROLIS, che contiene 60 mg di carfilzomib, beta-

ciclodestrina solfobutiletere 3000 mg, acido citrico 57,7 mg e idrossido di sodio per la regolazione del pH (pH bersaglio 3,5)) può essere somministrata in modo congiunto con uno o più inibitori delta di PI3K (ad esempio, TGR-1202).

Una composizione farmaceutica fornita nel presente documento (ad esempio, composizioni farmaceutiche che includono carfilzomib, ad esempio KYPROLIS, che contiene 60 mg di carfilzomib, beta-ciclodestrina solfobutiletere 3000 mg, acido citrico 57,7 mg e idrossido di sodio per la regolazione del pH (pH bersaglio 3,5)) può essere somministrata in modo congiunto con

(i) uno o più dei seguenti:

- o uno o più secondi agenti chemioterapici (ad esempio, uno o più inibitori di HDAC, ad esempio, SAHA, ACY-1215, Panobinostat; una o più mostarde azotate, ad esempio melfalan; uno o più agenti leganti il DNA/citotossici, ad esempio, Zylapsis; uno o più taxani, ad esempio, docetaxel; uno o più antibiotici (dactinomicina (actinomicina D), daunorubicina, doxorubicina e idarubicina; ad esempio, doxorubicina);
- o uno o più altri inibitori del proteasoma (ad esempio, un altro composto di formule (1)-(5));
- o una o più citochine;
- o uno o più agenti immunoterapici (ad esempio, Revlimid);
- o uno o più inibitori della topoisomerasi;
- o uno o più inibitori di m-TOR;
- o uno o più inibitori di protein chinasi (ad esempio, sorafenib);

- o uno o più inibitori di CDK (ad esempio, Dinaciclib);
- o uno o più inibitori di KSP(Eg5) (ad esempio, Array 520);
- o uno o più inibitori delta di PI3K (ad esempio, GS-1101 PI3K);
- o uno o più doppi inibitori: inibitori delta e gamma di PI3K (ad esempio, CAL-130);
- o uno o più inibitori di multichinasi (ad esempio, TG02);
- o uno o più inibitori delta di PI3K (ad esempio, TGR-1202);
- e
- (ii) uno o più steroidi (ad esempio, desametasone).

Una composizione farmaceutica che include carfilzomib (ad esempio, KYPROLIS, che contiene 60 mg di carfilzomib, sulfobutiletere beta-ciclodestrina 3000 mg, acido citrico 57,7 mg e idrossido di sodio per la regolazione del pH (pH bersaglio 3,5) può essere somministrata in modo congiunto con

- (i) uno dei seguenti:
  - o uno o più secondi agenti chemioterapici (ad esempio, uno o più inibitori di HDAC, ad esempio, SAHA, ACY-1215, Panobinostat; uno o più mostarde azotate, ad esempio melfalan; uno o più agenti leganti il DNA/citotossici, ad esempio, Zylapsis; uno o più taxani, ad esempio, docetaxel; uno o più antibiotici (dactinomicina (actinomicina D), daunorubicina, doxorubicina e idarubicina; ad esempio, doxorubicina);
  - o uno o più altri inibitori del proteasoma (ad esempio, un altro composto di formule (1)-(5));

- o una o più citochine;
  - o uno o più agenti immunoterapici (ad esempio, Revlimid);
  - o uno o più inibitori della topoisomerasi;
  - o uno o più inibitori di m-TOR;
  - o uno o più inibitori di protein chinasi (ad esempio, sorafenib);
  - o uno o più inibitori di CDK (ad esempio, Dinaciclib);
  - o uno o più inibitori di KSP(Eg5) (ad esempio, Array 520);
  - o uno o più inibitori delta di PI3K (ad esempio, GS-1101 PI3K);
  - o uno o più doppi inibitori: inibitori delta e gamma di PI3K (ad esempio, CAL-130);
  - o uno o più inibitori di multichinasi (ad esempio, TG02);
  - o uno o più inibitori delta di PI3K (ad esempio, TGR-1202);
  - e
- (ii) desametasone.

#### **ESEMPI**

##### ***Esempio 1. Preparazione di una sospensione di principio farmaceutico attivo carfilzomib (CFZ-API) in sulfobutiletere beta-ciclodestrina (SBECD)***

Questo Esempio descrive la preparazione di una sospensione di CFZ-API in SBECD a 400 L di dimensione del lotto. Dimensioni di lotto più piccole sono state eseguite in proporzioni equivalenti dei costituenti, come alle dimensioni di lotto di 290 L, 90 L e 1-3 L.

13

In un serbatoio raffreddato con camicia in acciaio inossidabile da 525 L controllato a 2 °C - 8 °C, è stata preparata una sospensione di carfilzomib-API (CFZ-API) 2,0 kg, acqua per preparazioni iniettabili (WFI) 246 kg e *beta*-ciclodestrina solfobutiletere (SBECD) 100 kg. Nello specifico, nel serbatoio raffreddato con camicia in acciaio inossidabile da 525 L controllato a 2 °C - 8 °C, SBECD 100 kg è stata disciolta WFI 246 kg. La sospensione di carfilzomib è stata poi preparata usando 2,0 kg di CFZ-API. La miscelazione è stata eseguita usando un miscelatore a girante per mantenere la sospensione dei solidi di CFZ-API e disciogliere la SBECD. Nello stesso recipiente è stato usato un miscelatore a elevato sforzo di taglio rotore-statore (omogeneizzatore) di tipo a sonda nonché la girante a basso sforzo di taglio. Il miscelatore a elevato sforzo di taglio è stato azionato per approssimativamente 1 ora rendendo una sospensione uniforme e una riduzione della granulometria per qualsiasi particella primaria più grande o API agglomerata. Dopo che è stata ottenuta una sospensione, 1,96 kg di acido citrico sono stati aggiunti come soluzione acquosa al 16%. Il pH della soluzione è stato poi abbassato inducendo una solubilizzazione parziale di CFZ-API seguita da e complessazione a causa della presenza di SBECD. La miscelazione è stata continuata per altre 24 ore sia con la girante sia con il miscelatore a elevato sforzo di taglio ed è stata ottenuta una concentrazione disciolta di CFZ-API maggiore di 5,1 mg/mL. La sospensione contenente più di 5,1 mg/mL di CFZ-API complessato disciolto è stata filtrata con un filtro chiarificante da 0,45 micrometri, poi diluita accuratamente fino a una

concentrazione disciolta di 5,0 mg/mL e il pH regolato con una soluzione di idrossido di sodio 1 N per ottenere pH 3,5. La soluzione è stata filtrata sterile, con due filtri sterilizzanti sequenziali da 0,22 micrometri, poi riempita in fiale da 12,36 mL ciascuna, contenenti 61,8 mg per fiala di CFZ-API. Le fiale sono state parzialmente tappate e caricate su un liofilizzatore e liofilizzate per 103 ore usando una temperatura di congelamento di -45 °C, temperatura di essiccazione primaria di -15 °C, ed essiccazione secondaria di +30 °C. Le fiale liofilizzate sono state completamente tappate e incappucciate, poi conservate alla temperatura di stabilità del prodotto di 2 °C - 8 °C fino a due anni prima dell'uso. Al momento dell'uso, la fiala è stata ricostituita con acqua sterile per preparazioni iniettabili a dare una soluzione ricostituita 2 mg/mL per iniezione, avente pH 3,5 e tonicità accettabile per l'iniezione diretta nei pazienti. In alternativa, la soluzione ricostituita è stata ulteriormente diluita in una sacca endovenosa per l'ulteriore diluizione e infusione senza indurre la precipitazione.

Come mostrato nella Figura 1, il processo di complessazione basato su slurry determina una solubilizzazione aumentata di CFZ-API nel tempo (superiore a 5 milligrammi per millilitro, che è sostanzialmente superiore alla solubilità acquosa intrinseca di CFZ-API, che è inferiore a 10 microgrammi per millilitro). In aggiunta, il processo dipendente meno dalle proprietà fisico-chimiche di CFZ-API (ad esempio, granulometria, area superficiale, grado di agglomerazione, forma polimorfica, ecc.). A differenza della maggior parte della produzione o dei test farmaceutici, la

velocità di dissoluzione (o velocità di solubilizzazione) in questo processo è efficacemente indipendente dalla granulometria di API (si veda, ad esempio, la Figura 2) poiché il processo eroga un'entità equivalente di solubilizzazione nell'arco del periodo di tempo di 24 ore affinché si verifichi la complessazione indipendentemente dal fatto che l'API avesse inizialmente una granulometria media di API grande o piccola (rispettivamente 21,1 micrometri e 7,5 micrometri). È stato inoltre determinato che nel processo descritto sopra, concentrazioni più elevate di SBECD aumentavano la solubilità di CFZ-API (si veda la Figura 3). Infine, è stato osservato che la solubilità complessata di CFZ/SBECD era efficacemente indipendente dalla temperatura di lavorazione o conservazione (si veda, ad esempio, la Figura 4 dove l'entità solubilizzata è mostrata in funzione della concentrazione di SBECD a pH 3,5 per due temperature di 5 °C e 25 °C che non mostrano alcuna differenza apparente). Pertanto, temperature di lavorazione inferiori sono preferite (2 °C - 8 °C) per minimizzare il potenziale per qualsiasi reazione di degradazione indotta termicamente che può verificarsi. In altri processi, temperature più comunemente più elevate sono necessarie per aumentare la solubilità, tuttavia, in questo processo, una solubilità più elevata viene ottenuta attraverso l'aumento della concentrazione di ciclodestrina e/o del pH anziché dall'aumento della temperatura e ciò consente ai degradanti termici di essere minimizzati in questo processo.

***Esempio 2. Effetto dello ione cloruro sulla stabilità di carfilzomib***

13

Un disegno statistico multivariato di esperimenti è stato condotto per valutare i fattori che controllano il livello del prodotto di degradazione della cloridrina in funzione dei parametri di lavorazione e del tempo di conservazione per sei mesi. La complessazione è stata eseguita nella proporzione e nei parametri dati nell'Esempio 1, con le seguenti modifiche: (i) il processo di complessazione è stato eseguito alla dimensione di lotto di 2 L; (ii) il pH finale della soluzione prima del riempimento delle fiale è stato variato ai fini dell'esperimento da 3,0 a 4,0; (iii) il cloruro di sodio è stato addizionato in SBECD in alcuni esperimenti per creare una condizione di elevato contenuto di cloruro di sodio; (iv) il contenuto di acqua del prodotto finale liofilizzato in fiale tappate è stato prodotto in condizioni di elevato e basso contenuto di cloruro di sodio tramite terminazione precoce e tappatura delle fiale per creare una condizione di contenuto di acqua residua più elevato.

### Materiali.

**Tabella 2. Materiali**

<b>Articolo</b>	<b>Produttore</b>
Carfilzomib sostanza farmaceutica	Cambridge Major Laboratories
Acido citrico, anidro	J.T. Baker
Solfobutileter- $\beta$ -ciclodestrina (Captisol®)	CyDex Pharmaceuticals, Inc.
Cloruro di sodio	EMD Chemicals, Inc.
Acqua per iniezioni (WFI)	EMD Chemicals, Inc.

13

<b>Articolo</b>	<b>Produttore</b>
Soluzione di idrossido di sodio 1,000 N	EMD Chemicals, Inc.
Miscelatore di testa (girante, basso sforzo di taglio)	IKA Works
Girante	NA
Miscelatore a taglio elevato	Silverson
Bagno d'acqua ricircolante	Thermo Electron Corporation
vetro stampato da 20 mm 50 mL,	Wheaton
tappi flurotech a sfiato singolo da 20 mm	West Pharma
Liofilizzatore Genesis SQ 35 EL	VirTis
filtro azionato da siringa da 0,22 µm	Millipore
Sistema filtrante PES da 0,22 µm	Coming
pH-metro	Beckman
elettrodo a pH	Orion ROSS
tampone pH 1,68	ThermoElectron Corp.
tampone pH 4,0	VWR

### **Metodi.**

#### ***Processo di complessazione:***

La soluzione di carfilzomib complessato per la preliofilizzazione della soluzione in massa iniettabile includeva carfilzomib acquoso 5 mg/mL, Captisol® (SBECD) 250 mg/mL e acido citrico 4,86 mg/mL, pH regolato con idrossido di sodio acquoso. La composizione delle soluzioni in massa per liofilizzazione ha seguito la procedura descritta in dettaglio nell'Esempio 1 con le seguenti manipolazioni per creare soluzioni con attributi specifici differenti:

1. Il pH è stato regolato a 3,0 e 4,0
2. Il cloruro di sodio è stato addizionato nel Captisol® per creare una condizione di "elevato contenuto di cloruro".

Captisol® fabbricato da Cydex, una filiale di Ligand, ha un intervallo di analisi di prodotto standard per cloruro di sodio dallo 0,05% allo 0,2% (p/v). Per la sperimentazione era disponibile un lotto di Captisol® che aveva un basso contenuto di cloruro di solo lo 0,05% (p/v) come cloruro di sodio. 400 g di questo Captisol® sono stati richiesti per lotto per il processo da eseguire in lotti in scala da 2 L di lavorazione di complessazione (nelle stesse proporzioni e parametri generali per l'Esempio 1). Per creare la condizione di "elevato contenuto di cloruro", 0,6 g di NaCl sono stati aggiunti a 399,4 g di Captisol® che imitavano pertanto ciò di cui sarebbe stato costituito un lotto contenente Captisol® cloruro allo 0,2%.

***Liofilizzazione:***

Al fine di generare due (2) condizioni di contenuto di umidità nelle fiale liofilizzate finali sono stati liofilizzati due (2) insiemi di campioni di

61,8 mg/fiala (di CFZ-API). Il primo ciclo ha generato l'insieme di campioni "secchi" di fiale contenenti approssimativamente acqua residua allo 0,6% per i parametri di liofilizzazione dell'Esempio 1. Per il secondo insieme di campioni, la liofilizzazione è stata terminata e le fiale sono state tappate prima nella fase di essiccazione secondaria per generare le fiale in condizione "umida", con umidità residua di approssimativamente il 2,4% di acqua per fiala inizialmente.

Un (1) lotto di placebo è stato preparato come controllo contenente Captisol® 250 mg/mL e acido citrico 4,86 mg/mL, regolato a pH 3,5 con NaOH.

***Test analitici:***

La soluzione in massa di carfilzomib complessato è stata analizzata durante la fabbricazione mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) per quantificare accuratamente la concentrazione di sostanza farmaceutica carfilzomib disciolta e complessata. Successivamente è stata aggiunta acqua supplementare per diluire accuratamente la soluzione complessata in massa. Dopo questa fase di diluizione, HPLC è stata usata di nuovo per garantire l'ottenimento di una concentrazione bersaglio di 5,0 mg/mL. Campioni delle tre (3) soluzioni in massa finali sono stati analizzati per i test di potenza e di conferma della purezza mediante HPLC. I campioni di stabilità sono stati analizzati dopo sei mesi di conservazione a 5 °C e 25 °C mediante HPLC per potenza e purezza. Il metodo coulometrico di

13

Karl Fischer è stato usato per la determinazione del contenuto di acqua nel prodotto farmaceutico liofilizzato.

**Trattamento dei dati:**

Stat-Ease DX7 è stato usato per analizzare i risultati.

**Risultati.**

I risultati della formazione di un prodotto di degradazione della cloridrina (CDP) a 6 mesi per 5 °C e 25 °C sono riassunti nella Tabella 3 di seguito.

Tabella 3. Risultati della formazione di CDP dopo 6 mesi a 5 °C e 25 °C

pH	Acqua (%)	Cloruro di sodio (%)	% di area di CDP dopo 6 mesi (dati HPLC)	
			5 °C	25 °C
4,00	2	0,05	0,02	0,35
3,00	2	0,05	0,02	0,55
3,00	0,7	0,05	0,00	0,14
4,00	0,7	0,05	0,00	0,09
4,00	2	0,2	0,18	1,71
3,00	2	0,2	0,28	2,57
4,00	0,7	0,2	0,08	0,36
3,00	0,7	0,2	0,13	0,70

Le analisi ANOVA di seguito (Tabella 4 e 5) di CDP mostrano che il contenuto di cloruro è il fattore principale nella formazione di CDP. Un contenuto di cloruro più elevato porta a livelli maggiori di CDP. Anche al livello basso di contenuto di cloruro (0,05% (p/v)), si osserva ancora la formazione della cloridrina, ma a una concentrazione accettabilmente bassa rispetto a cloruro allo 0,2%. In aggiunta, il prodotto farmaceutico contenente bassi livelli di ione cloruro mostrava una formazione inaccettabile di prodotto di cloridrina a 25 °C dopo 6 mesi di conservazione. La Figura 5 illustra la relazione tra CDP e l'interazione a due fattori del contenuto di acqua e cloruro. La linea superiore è a elevato contenuto di cloruro e la linea inferiore è a basso contenuto di cloruro. L'asse delle x rappresenta il contenuto di acqua, con lo 0,7% a sinistra e il 2% a destra. A livelli di cloruro più elevati, i livelli di produzione di CDP aumentano. Questo aumento è ancora più evidente in condizioni di contenuto di acqua più elevato, come è possibile osservare dalla pendenza della curva superiore. A bassi livelli di cloruro vi è poca differenza osservata tra condizioni a basso o elevato contenuto di acqua.

Tabella 4. Analisi ANOVA - CDP (RRT 0,86) a 6 mesi, 5 °C

Risposta 1		CDP (RRT0.87) PA 6M 5C				
ANOVA per il modello fattoriale selezionato						
Analisi della tabella di varianza [Somma parziale dei quadrati - Tipo III]						
Fonte	Somma dei quadrati	df	Quadrati medi	Valore di F	Valore p Prob > F	
Modello	0,028	1	0,028	6,88	0,0394	significativo
<i>C-Contenuto di cloruro</i>	<i>0,028</i>	<i>1</i>	<i>0,028</i>	<i>6,88</i>	<i>0,0394</i>	
Residuo	0,024	6	4.013E-003			
Cor totale	0,052	7				

Tabella 5. Analisi ANOVA - CDP (RRT 0,86) a 6 mesi, 25 °C

B

<b>Risposta 1</b>		<b>CDP (RRT0.87) PA 6M 25C</b>				
<b>ANOVA per il modello fattoriale selezionato</b>						
<b>Analisi della tabella di varianza [Somma parziale dei quadrati - Tipo III]</b>						
<b>Fonte</b>	<b>Somma dei quadrati</b>	<b>df</b>	<b>Quadrati medi</b>	<b>Valore di F</b>	<b>Valore p Prob &gt; F</b>	
Modello	4,81	3	1,60	14,42	0,0130	significativo
<i>B- Contenuto di acqua</i>	2,05	1	2,05	18,43	0,0127	
<i>C- Contenuto di cloruro</i>	2,05	1	2,05	18,43	0,0127	
<i>BC</i>	0,71	1	0,71	6,42	0,0644	
Residuo	0,45	4	0,11			
Cor totale	5,26	7				

**Esempio 3. Effetto degli acidi cloridrico e citrico sul prodotto di degradazione delle cloridrine**

È stato condotto uno studio per determinare l'impatto dell'uso dell'acido cloridrico nel processo di complessazione confrontando i livelli

di impurità del prodotto di degradazione CDP nell'arco del tempo di conservazione con il lotto prodotto senza HCl, e conservato per lo stesso periodo di tempo. Durante la produzione, il pH di tutti i lotti è stato regolato al termine del processo a 3,5 usando idrossido di sodio.

Come presentato nella Tabella 6, i lotti prodotti con l'aggiunta di HCl (2, 3, e 4) mostravano una formazione chiara del prodotto di degradazione della cloridrina (CDP) nel corso del tempo di conservazione, mentre alla temperatura di conservazione raccomandata di 5 °C, CDP era per lo più al di sotto del limite di segnalazione di HPLC (0,1%) o non rilevato (ND) nei lotti 1 e 5 (dove non è stato usato HCl). Chiaramente, un maggior contenuto di cloruro proveniente da HCl come acido per l'avvio della complessazione ha determinato una maggiore (e livelli inaccettabili di) formazione di CDP. Pertanto, l'uso dell'acido citrico più debole da solo per avviare la complessazione in SBECD ha minimizzato la formazione di CDP.

Tabella 6. Risultati per formazione di CDP (% di area) a 5 °C e 25 °C

13

Tempo (mese)	Lotto 1 Acido citrico (senza HCl)		Lotto 2 Acido cloridrico		Lotto 3 Acido cloridrico		Lotto 4 Acido cloridrico		Lotto 5 Acido citrico (senza HCl)	
	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C
0	≤ 0,1	ND	0,16	0,16	0,26	0,26	0,15	0,15	≤ 0,1	≤ 0,1
3	≤ 0,1	0,13	0,24	0,78	0,36	1,4	0,19	0,78	≤ 0,1	0,19
6	≤ 0,1	≤ 0,1	0,26	1,1	0,37	1,9	0,22	1,1	≤ 0,1	0,31
12	≤ 0,1	-	0,24		0,46	-	0,25	-	≤ 0,1	-
18	≤ 0,1	-	0,35		0,52	-	0,29	-	≤ 0,1	-
24	≤ 0,1	-	0,33		0,64	-	0,32	-	0,12	-

**Esempio 4.**

La solubilità di carfilzomib in funzione della concentrazione di ciclodestrina SBECD è stata determinata in soluzioni acquose contenenti acido citrico (30 mM), a pH 1,5 e pH 3,5, e a temperature tra cui 5 °C e 25 °C. Il profilo di solubilità è mostrato nella Figura 6. Non sono state osservate differenze significative di solubilità tra le temperature bassa ed elevata testate. Gli esperimenti in condizioni acide al di sotto dei valori di pH bersaglio e titolati a pH 1,5 o 3,5 usando soluzione acquosa di idrossido di sodio. Le misurazioni della concentrazione solubilizzata

b

erano quelle dei campioni analizzati dopo 24 ore di tempo all'equilibratura.

### ***Esempio 5***

Un approccio di indicizzazione è stato usato per modellare e determinare un sorprendente rapporto di complessazione di ciclodestrina ("CD"):carfilzomib ("CFZ").

#### **[1] Studio di solubilità di fase**

SBE- $\beta$ -CD è stato disciolto in WFI per ottenere concentrazioni di CD% differenti.

Solidi di CFZ-API in eccesso sono stati caricati nella soluzione SBE- $\beta$ -CD e omogeneizzati per 1 ora tramite un miscelatore a elevato sforzo di taglio in stile sonda per disperdere agglomerati di API prima della loro successiva dissoluzione.

Il pH dello slurry è stato abbassato usando acido per avviare la solubilizzazione e in tal modo la complessazione. La miscelazione dall'alto con una girante in stile marino è stata continuata fino a 48 ore. La è stata regolata verso l'alto a pH 3,5 con NaOH<sub>(acq)</sub>.

CFZ totale disciolto in funzione della concentrazione di SBE- $\beta$ -CD è stato determinato tramite campionamento, filtrazione e analisi HPLC.

#### **[2] Studio di miscelazione**

SBE- $\beta$ -CD è stato disciolto in WFI per ottenere una soluzione al 25% (p/v). Una sospensione di CFZ-API nella soluzione di SBE- $\beta$ -CD è

stata preparata mediante omogeneizzazione secondo lo studio di solubilità.

Solidi di API sono stati aggiunti in tutti gli esperimenti per rendere teoricamente una soluzione finale di ~ 6 mg/mL per imitare il processo commerciale.

Dopo l'omogeneizzazione, il pH è stato abbassato usando acidi citrici per influenzare la solubilizzazione, continuando al contempo la miscelazione fino a 24 ore. Poi, tutte le preparazioni sono state regolate a pH 3,5. La concentrazione disciolta in funzione del tempo è stata misurata mediante campionamento, filtrazione, poi analisi HPLC per monitorare la cinetica della complessazione nel processo basato su slurry.

### **[3] Risultati (solubilità di fase)**

Il diagramma della solubilità di fase (Figura 7) mostra che la solubilità acquosa di CFZ aumentava in funzione della concentrazione di SBE- $\beta$ -CD. Il profilo di solubilità in fase concava verso il basso può essere classificato come comportamento di complessazione di tipo An. Partendo da un pH basso si ha un aumento significativo della solubilità, mentre la temperatura ha un effetto trascurabile.

### **[4] Risultati (studio di miscelazione)**

La Figura 8 mostra i dati di solubilizzazione di CFZ durante la miscelazione in funzione del tempo a valori di pH 1,5 e 3 (a 5 °C), nonché per etanolo al 5%.

La solubilizzazione molto rapida è stata osservata quando la miscelazione è iniziata con pH più basso.

La solubilizzazione durante la miscelazione e il pH 3 ha mostrato una velocità iniziale analogamente rapida, che poi rallenta notevolmente e non raggiunge l'equilibrio entro 24 ore.

L'aggiunta di etanolo a pH 3 non ha avuto un impatto sul comportamento di solubilizzazione, il che indica che la formazione di micelle è improbabile in una fase di limitazione della velocità per questo sistema.

#### **[5] Selezione e interpretazione del modello**

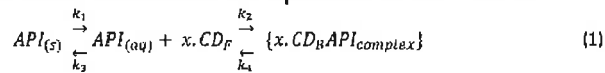
Un modello di dissoluzione con trasferimento di massa di primo ordine ("The approach to solubility equilibrium in crystallizing and dissolving systems." Dalziel, S.M.; White, E.T. & Johns, M.R. 2002 Dev. Chem. Eng. Mineral Process 10(516) 521-537) era uno scarso adattamento ai dati nel tempo, indicando che la velocità di solubilizzazione complessiva è in gran parte governata da un meccanismo di velocità più lento rispetto alla dissoluzione.

È improbabile che gli stati intermedi micellari siano stati considerati determinanti per la velocità poiché gli esperimenti di complessazione nel tempo in etanolo acquoso al 5% non erano sostanzialmente diversi nelle velocità complessive.

È stata applicata la legge dell'azione di massa, come data dall'equazione (1), con stato di equilibrio descritto dall'equazione (3). Pertanto, la forza trainante della complessazione nello stato limitato di

B

non dissoluzione (equazione 4) è la misura in cui il sistema è lontano dall'equilibrio, e la velocità cinetica complessiva diventa proporzionale alla ciclodestrina libera aumentata alla potenza x, che corrisponde al suo rapporto stechiometrico complessato con l'API.



$$CD_T = CD_F + CD_B \quad (2a)$$

$$C_T = API_{(dissolto)} + API_{(complessato)} \quad (2b)$$

$$K_{stab} = \frac{[x \cdot CD_B API_{complex}]^x}{[API_{(aq)}]^x \cdot [CD_F]^x} \quad (3)$$

$$Forza\ trainante\ della\ complessazione = (K_{stab} - K_t) \quad (4)$$

Se la dissoluzione non è limitante la velocità, la solubilità intrinseca è ridotta, e nessun altro stato intermedio, allora la velocità di complessazione =  $(k_2 - k_4)$

$$C_T \propto [CD_F]^x \quad (5)$$

Alla condizione limite di  $CD_T = 0$ ,  $C_T =$  solubilità intrinseca di CFZ al pH e alla temperatura dati. Il tracciamento di  $C_T$  sull'asse Y e  $CD_F$  sull'asse X in unità molari dovrebbe convergere in una relazione lineare se l'asse X è trasformato nella potenza di  $1/x$ . La soluzione per x fornisce la stechiometria della complessazione

$API_{(s)}$

*principio attivo farmaceutico, fase solida*

$API_{(acq)}$

*principio attivo farmaceutico, fase disciolta*

$CD_F$

*ciclodestrina, libera (non complessata)*

13

$CD_B$

*ciclodestrina, legata (complessata)*

$CD_T$

*ciclodestrina, totale*

$x$

*coefficiente stechiometrico*

$k_n$

*costanti di velocità di reazione*

$K_{stab}$

*Costante di stabilità all'equilibrio di complessazione*

$K_t$

*Coordinata di reazione di complessazione e tempo  $t$*

**Dati sperimentali e modellizzazione:**

- Dati nel tempo per la concentrazione di *API* osservata per varie condizioni come  $CD\%$ , pH, velocità di miscelazione, temperatura.
- Coordinate multiple per  $CD_T$  e *API* solubilizzata (totale: disciolto e complessato)

**[6] Trasformazione dei dati sperimentali**

Le concentrazioni di ciclodestrina e carfilzomib osservate sono state convertite in unità molari.

La solubilità intrinseca di carfilzomib era ridotta e mantenuta come costante nell'analisi anziché essere corretta, a causa delle limitazioni di precisione (equazione 2b).

Le concentrazioni libere e legate di ciclodestrina sono state calcolate dall'equazione (2a), ipotizzando molteplici scenari di stechiometrie di complessazione ( $x:1$ ).

È stato generato un grafico che mostra la solubilizzazione osservata in funzione della ciclodestrina libera ( $CD_F$ ), indicizzata all'inverso della sua stechiometria di complessazione ( $1/x$ ). I dati trasformati sono stati valutati per mostrare dove il grafico si avvicina alla linearità (escluso il valore di solubilità intrinseco). Questo era approssimativamente  $x = 2 - 3$ . Si veda la Figura 9.

#### **[7] Conclusioni**

La solubilità acquosa di CFZ è aumentata in funzione della concentrazione di SBE- $\beta$ -CD. Il profilo di solubilità può essere classificato come tipo An.

Un rapporto stechiometrico di 2 o 3 ciclodestrine per molecola di API nello stato complessato è stato osservato per CFZ con SBE- $\beta$ -CD.

Lo scarso adattamento di un modello di dissoluzione con trasferimento di massa di primo ordine a questi dati, e la mancanza di cambiamento significativo al tasso di complessazione osservato in soluzione etanolica acquosa (Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles. Messner M., Jansook P., Kurkov SV e Loftsson Int J Pharm. 15 marzo 2010;387(1-2):199-208) hanno suggerito che né la dissoluzione né la formazione di micelle sono la fase di limitazione della velocità. Più probabilmente la velocità di processo complessiva è governata dalla velocità di complessazione ( $k_2$ ). Ciò implica che le

proprietà fisiche di API come la granulometria e l'area superficiale, nonché le variabili di processo come la progettazione e il funzionamento del miscelatore (che influenzano  $k_1$ ) possono non essere fondamentali per le prestazioni e la robustezza del processo. Lo spazio di progettazione del processo commerciale e gli studi di convalida hanno verificato ciò.

Una relazione della legge di potenza della velocità di complessazione con la concentrazione di ciclodestrina libera aumentata all'esponente stechiometrico si correla al comportamento cinetico osservato: inizialmente veloce ( $0 \rightarrow 4,5$  mg/mL nelle prime 2 ore), poi molto lento per equilibrare ( $4,5 \rightarrow 5,5$  mg/mL in  $>20$  ore).

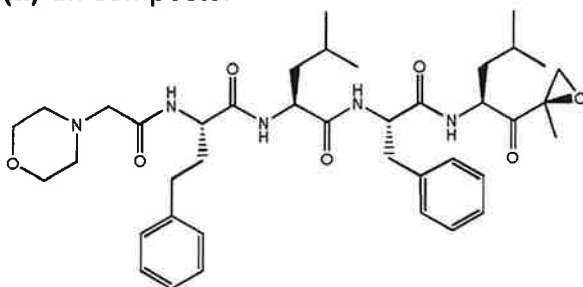
B

## RIVENDICAZIONI

1. Metodo per preparare una composizione farmaceutica, il metodo comprendendo:

(i) fornire una prima combinazione comprendente:

(a) un composto:



o un suo sale farmaceuticamente accettabile;

(b) una ciclodestrina ("CD") a basso contenuto di cloruro che è una ciclodestrina contenente cloruro avente meno di o uguale a cloruro di sodio allo 0,05% p/p, o se è presente una o più fonti di cloruro diverse da o in aggiunta a cloruro di sodio, una ciclodestrina contenente cloruro avente un contenuto di ioni cloruro che è inferiore o uguale alla quantità di cloruro che sarebbe presente in una ciclodestrina avente cloruro di sodio allo 0,05% p/p, e

(c) acqua;

in cui la prima combinazione è eterogenea e il composto o il sale ha una bassa solubilità nella prima combinazione; e

(ii) porre a contatto la prima combinazione con un acido per formare una seconda combinazione, in cui il composto è più solubile nella seconda combinazione rispetto alla prima combinazione, e l'acido è selezionato tra acido lattico, acido acetico, acido formico, acido citrico,

acido ossalico, acido urico, acido succinico, acido maleico, acido fumarico, acido benzoico, acido tartarico, bisolfato e acido fosforico o sali di fosfato,

in cui il metodo viene eseguito in assenza di acido cloridrico.

2. Metodo della rivendicazione 1, in cui la prima combinazione è sostanzialmente priva di solvente organico.

3. Metodo della rivendicazione 1 o 2, in cui la prima combinazione è sostanzialmente priva di tampone.

4. Metodo di qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui la ciclodestrina è HPBCD o SBECD.

5. Metodo della rivendicazione 1, in cui la ciclodestrina è SBECD.

6. Metodo della rivendicazione 1, in cui il rapporto molare tra ione cloruro e composto nella prima combinazione non è superiore a 0,32.

7. Metodo della rivendicazione 1, in cui la fornitura di una prima combinazione (fase (i)) comprende l'aggiunta del composto a una soluzione della ciclodestrina e dell'acqua.

8. Metodo di qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui il metodo comprende inoltre la miscelazione della seconda combinazione per un tempo sufficiente a ottenere una terza combinazione omogenea.

9. Metodo della rivendicazione 8, in cui la concentrazione disciolta e complessata del composto nella terza combinazione è da 1 mg/mL a 20 mg/mL, in particolare da 4 a 8 mg/mL.

10. Metodo della rivendicazione 8 o 9, in cui il pH della terza combinazione è da 2 a 4.

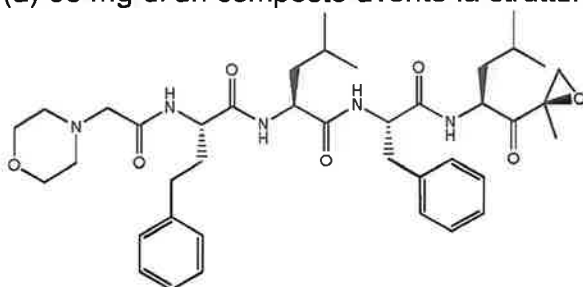
11. Metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni da 8 a 10, in cui il metodo comprende inoltre la liofilizzazione della terza combinazione per fornire un liofilizzato.

12. Metodo di qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui la composizione farmaceutica comprende inoltre acido citrico.

13. Metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui la composizione farmaceutica ha una concentrazione di cloruro fino a e includente lo 0,03% p/v.

14. Composizione farmaceutica liofilizzata per uso nel trattamento del mieloma multiplo, la composizione farmaceutica liofilizzata comprendendo:

(a) 60 mg di un composto avente la struttura di



o un suo sale farmaceuticamente accettabile;

(b) 3000 mg di ciclodestrina solfobutiletere ("SBECD") a basso contenuto di cloruro; che è una ciclodestrina contenente cloruro avente meno di o uguale a cloruro di sodio allo 0,05% p/p, o se è presente una o più fonti di cloruro diverse da o in aggiunta a cloruro di sodio, una ciclodestrina contenente cloruro avente un contenuto di ioni cloruro che è inferiore o uguale alla quantità di cloruro che sarebbe presente in una ciclodestrina avente cloruro di sodio allo 0,05% p/p, e

b

(c) un sistema di tamponamento del pH comprendente 57,7 mg di acido citrico e idrossido di sodio, il sistema tampone sufficiente a fornire un pH di circa 3,5 quando disciolto in circa 29 mL di acqua; in cui, dopo la dissoluzione della formulazione farmaceutica liofilizzata in circa 29 mL di acqua, la soluzione risultante ha una concentrazione di cloruro di sodio fino a e includente lo 0,05% (p/v) come definito in (b).

15. Composizione farmaceutica liofilizzata per uso della rivendicazione 14, in cui la SBECD ha una concentrazione di ioni cloruro dello 0,03% p/p o inferiore come definito nella rivendicazione 14.

Si attesta la perfetta accuratezza della traduzione che precede.

**LEGENDA DELLE TAVOLE DEI DISEGNI****TAVOLA 1/6**

Figura 1

"Carfilzomib Conc." = Conc. di carfilzomib

"Time (hours)" = Tempo (ore)

Figura 2

"Carfilzomib Conc." = Conc. di carfilzomib

"Time (hours)" = Tempo (ore)

"small API" = API piccolo

"large API" = API grande

**TAVOLA 2/6**

Figure 3-4

"Solubility of CFZ as function of SBE-b-CD" = Solubilità di CFZ in  
funzione di SBE-b-CD

"Drug solubility" = Solubilità del farmaco

"CD concentration (%)" = Concentrazione di CD (%)

**TAVOLA 3/6**

Figura 5

"Interaction" = Interazione

"Chloride Content" = Contenuto di cloruro

"Water Content" = Contenuto di acqua

"dry" = secco

"wet" = umido

"Design-Expert® Software" = Software Design-Expert®

13

“Factor Coding: Actual PR428 (RRT0.87) PA 6M” = Codifica fattoriale: PR428 reale (RRT0.87) PA 6M

“Actual Factor” = Fattore reale

“C1 low” = C1 basso

“C2 high” = C2 elevato

#### **TAVOLA 4/6**

Figura 6

“Solubilized concentration” = Concentrazione solubilizzata

“SBECD Concentration (%)” = Concentrazione di SBECD (%)

#### **TAVOLA 5/6**

Figura 7

“Phase Solubility Profiles” = Profili di solubilità di fase

“Drug solubility” = Solubilità del farmaco

“CD concentration (%)” = Concentrazione di CD (%)

Figura 8

“Solubilization Profile” = Profilo di solubilizzazione

“Time (hours)” = Tempo (ore)

#### **TAVOLA 6/6**

Figura 9

“Molar solubilized carfilzomib versus complexation indexed free cyclodextrin” = Carfilzomib solubilizzato molare rispetto alla ciclodestrina libera indicizzata per complessazione

“Dissolved concentration” = Concentrazione disciolta

13

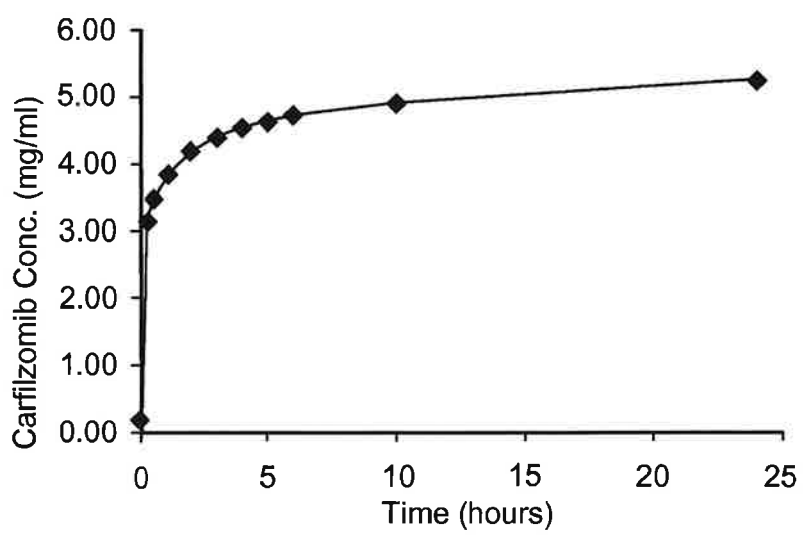


FIG. 1

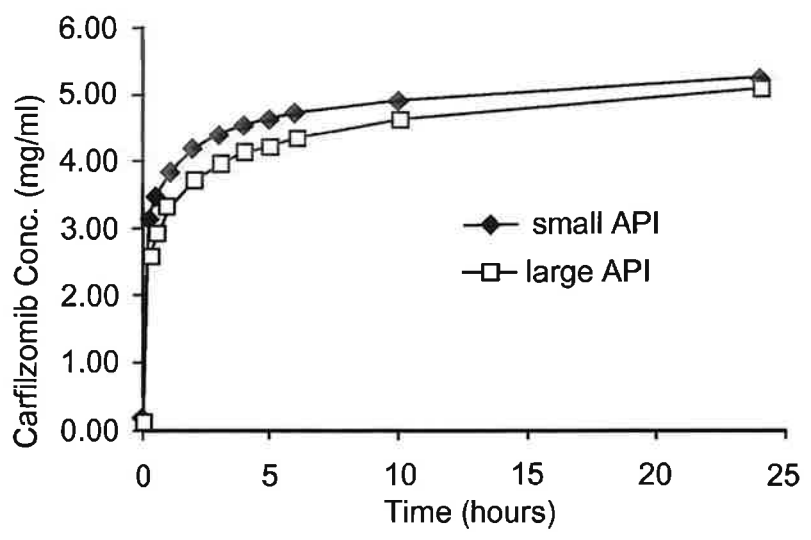


FIG. 2

b

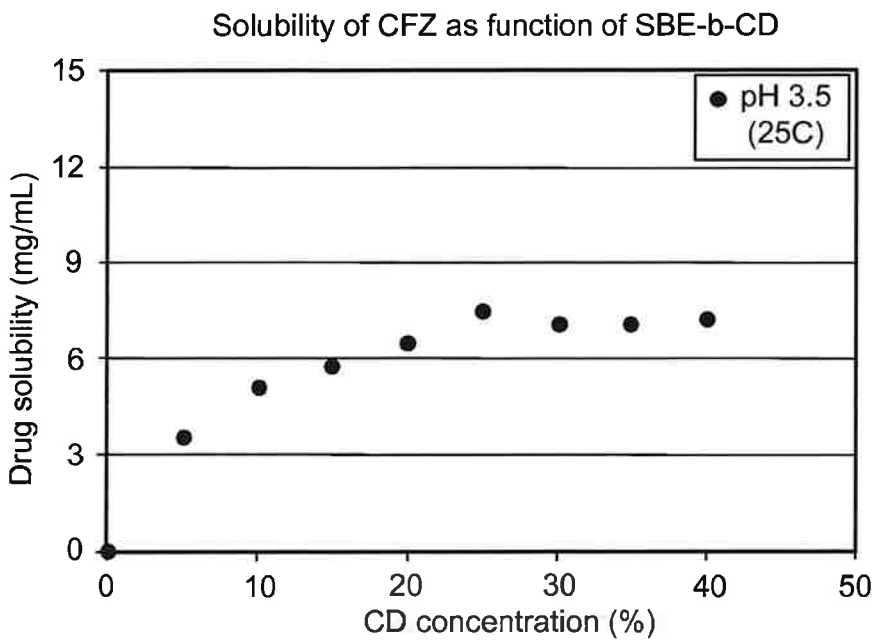


FIG. 3

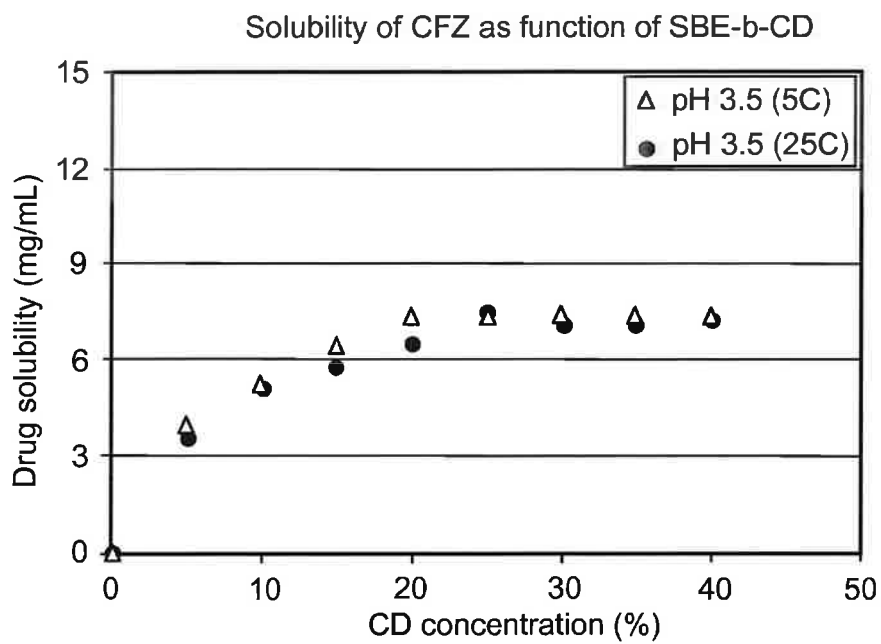
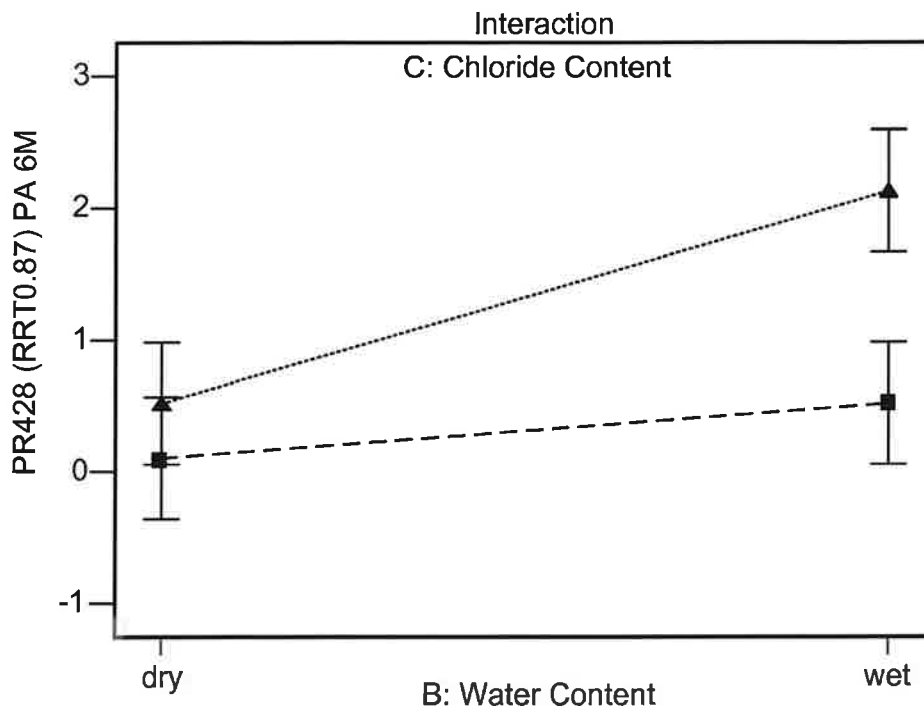
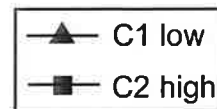


FIG. 4

13



Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual  
PR428 (RRT0.87) PA 6M



X1 = B: Water Content  
X2 = C: Chloride Content

Actual Factor  
A: pH = 3.50

FIG. 5

h

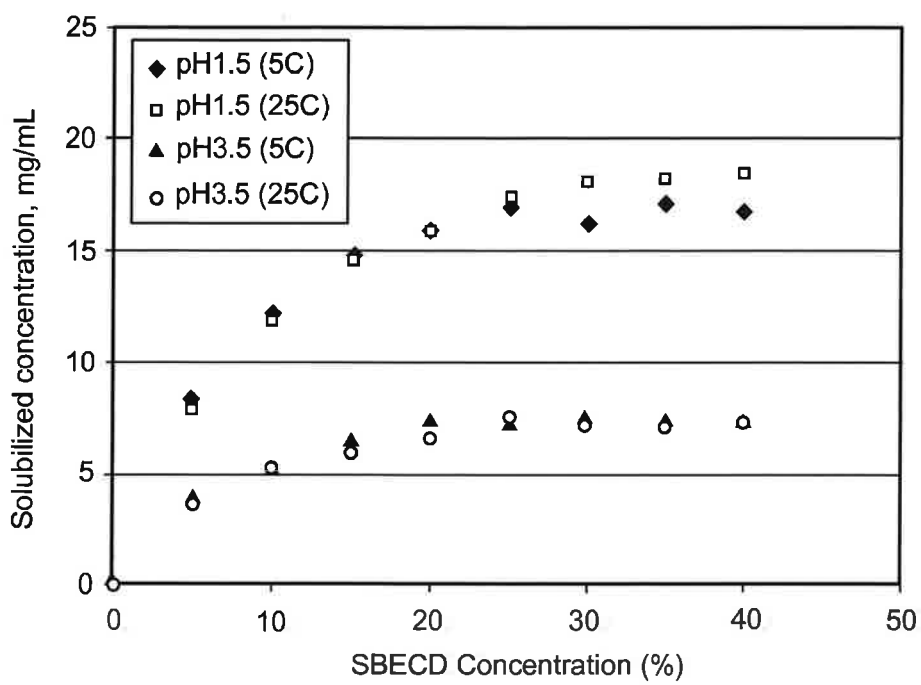


FIG. 6

13

FIG. 7

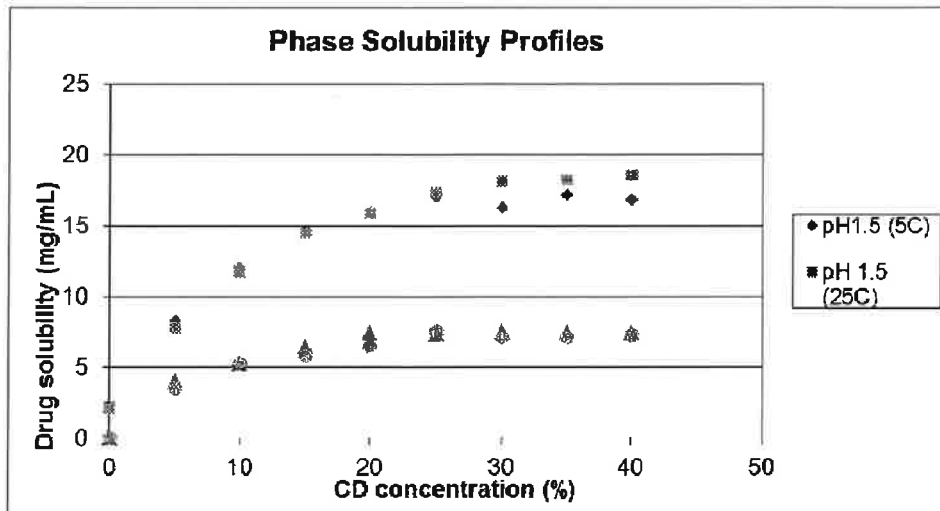
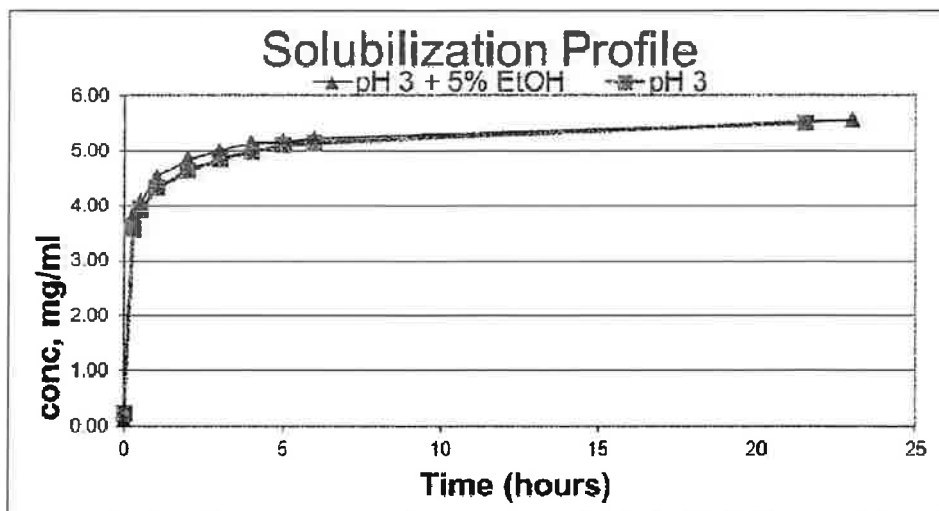


FIG. 8



13

FIG. 9

Molar solubilized carfilzomib versus complexation indexed free cyclodextrin

