

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 201891027 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2019.02.28

(51) Int. Cl. C07D 471/04 (2006.01)  
A61K 31/4439 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2016.12.10

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ ПРОИЗВОДНЫЕ ИНДОЛА, СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 1500520-0

(32) 2015.12.18

(33) SE

(86) PCT/EP2016/025175

(87) WO 2017/102097 2017.06.22

(71) Заявитель:

ВИВОЛЮКС АБ (SE)

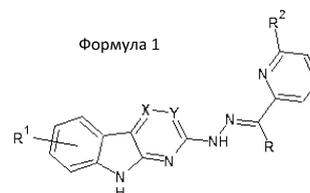
(72) Изобретатель:

Линдер Стиг (SE)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение относится к хорошо охарактеризованным и стабильным фармацевтическим композициям, содержащим производные индола общей формулы 1, способу получения дигидрохлоридных солей с высоким содержанием фармакологически активного изомера, подходящему для промышленного производства, и их применению в фармацевтических композициях. Изобретение также относится к способу применения указанных соединений для лечения рака. Изобретение также относится к способам применения этих соединений в комбинации с другими терапевтическими средствами, обычно используемыми для лечения раковых заболеваний.



A1

201891027

201891027

A1

## ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ ПРОИЗВОДНЫЕ ИНДОЛА, СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ

### Область техники

Настоящее изобретение относится к улучшенной и стабильной фармацевтической композиции производных индола с высоким содержанием их фармакологически активного изомера. Настоящее изобретение также относится к способу лечения рака с помощью композиций и к способу их получения. Изобретение, кроме того, относится к обеспечению возможности крупномасштабного синтеза фармакологически активных соединений.

### 10 Уровень техники

Производные индола и их фармацевтически приемлемые соли раскрыты в заявках WO 2012/128689 и WO 2014/046589 в виде смесей цис/транс-изомеров (Z/E-изомеры) в N-метилиденовой группе. Эти соединения полезны при лечении солидных злокачественных опухолей. Полагают, что противораковый эффект основан на свойстве соединений образовывать хелаты с железом. Поскольку скорость изомеризации в физиологических условиях представлялась существенной, предположили, что фармакологическое действие изомеров было по существу аналогичным или даже одинаковым.

Eshba *et al.* раскрывают производные N-(1-пиридин-2-ил-метилен)-N-(9H-1,3,4,9-тетраза-флуорен-2-ил)-гидразина в качестве противовирусных и противораковых агентов, при этом только одно соединение проявляет цитотоксическую активность. Желательно, чтобы фармацевтическая композиция была четко охарактеризована, в частности, ее фармакологически активные компоненты. Поэтому обязательно, чтобы, если соединение существует в двух изоформах, более активный изомер указанных соединений преобладал в содержащей их фармацевтической композиции. Кроме того, фармацевтическая композиция должна быть достаточно стабильной, чтобы храниться в течение длительного периода времени без заметного изменения ее состава.

Для пациентов, страдающих раком, необходимо разрабатывать новые и эффективные противораковые лекарственные средства. Прежде, чем получен готовый продукт, разработка лекарственного средства в целом сопряжена с множеством трудностей.

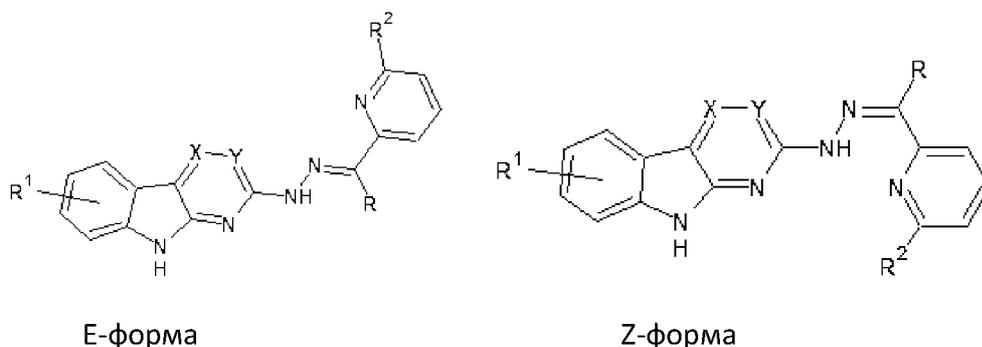
30 Изначально многообещающее соединение идентифицируют и экспериментально

тестируют в различных моделях *in vitro*, и после этого начинают доклинические исследования, чаще всего с помощью различных мышинных моделей. До этого момента необходимо синтезировать только небольшие количества соединения, а требования к чистоте ниже, чем требуемые в клинических исследованиях, проводимых на людях. В разработке лекарственных средств присутствует много стадий, которые являются критическими, например, идентификация и выделение активного соединения, исследование того, является ли конкретный изомер более сильнодействующим, чем другой, дополнительно имеет допустимую степень чистоты, стабильности, а также то, что указанное соединение может производиться в крупных масштабах. Эти стадии не являются тривиальными, и многие многообещающие соединения/лекарственные средства не могут выйти на рынок из-за описанных выше производственных проблем.

### Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение основано на обнаружении того, что смесь E- и Z-форм формулы 1 может быть преобразована в E-форму их дигидрохлоридных солей с высокой стерической чистотой.

### Формула 1



Первой задачей настоящего изобретения является обеспечение хорошо охарактеризованных и стабильных фармацевтических композиций с высоким содержанием фармацевтически активного изомера (E) соединений или их фармацевтически приемлемой соли, представленного общей формулой 1, где: R представляет собой H или метил, или метилен, замещенный линейным или разветвленным C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкилом,

$R^1$  выбран из группы, состоящей из H, линейного или разветвленного  $C_1$ - $C_4$  алкила, метокси, метокси, замещенного 1-3 атомами фтора, бромида, галогена;

$R^2$  представляет собой H или линейный или разветвленный  $C_1$ - $C_4$  алкил;

X представляет собой CH или N;

5 Y представляет собой CH или N, и

где по меньшей мере 95 масс.% (масс./масс.) фармакологически активного соединения или его фармацевтически приемлемой соли находится в форме E-изомера, как определено в п. 1 настоящей формулы изобретения.

10 Фармацевтические композиции предназначены для применения при лечении рака. В одном из аспектов по меньшей мере 96 масс.%, или 97 масс.%, или 98 масс.%, или по меньшей мере 98,5 масс.% указанного соединения находится в E-форме. В еще одном аспекте по меньшей мере 99 масс.%, предпочтительно по меньшей мере 99,5 масс.%, наиболее предпочтительно по меньшей мере 99,8 масс.% фармакологически активного соединения находится в форме E-изомера. В идеальном варианте 100 масс.% указанного

15 соединения находится в форме E-изомера. Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению также может дополнительно содержать по меньшей мере один фармакологически приемлемый эксципиент и/или носитель.

Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения соединение общей формулы 1 может быть дополнительно замещено линейным или разветвленным  $C_1$ - $C_4$

20 алкилом в одном из положений 6, 7, 8, 9 моно-, ди- или триазакарбазолила, не замещенного  $R^1$ .

Предпочтительные соединения общей формулы 1, а также 1a и 1b, перечислены в таблице 1.

В одном из вариантов осуществления R и  $R^1$  представляют собой  $CH_3$ , и  $R^2$  представляет собой H. Предпочтительно R представляет собой  $CH_3$ , и  $R^1$  представляет собой  $\beta$ - $CH_3$ , и  $R^2$

25 представляет собой H. Более предпочтительно X и Y представляют собой N.

В другом варианте осуществления R представляет собой  $CH_2CH_3$ ,  $R^1$  представляет собой  $CH_3$ , и  $R^2$  представляет собой H. Предпочтительно R представляет собой  $CH_2CH_3$ ,  $R^1$

представляет собой 6-CH<sub>3</sub>, и R<sup>2</sup> представляет собой H. Более предпочтительно X и Y представляют собой N.

В еще одном варианте осуществления R представляет собой CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, R<sup>1</sup> представляет собой CH<sub>3</sub>, и R<sup>2</sup> представляет собой H. Предпочтительно R представляет собой CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>,

5 R<sup>1</sup> представляет собой 6-CH<sub>3</sub>, и R<sup>2</sup> представляет собой H. Более предпочтительно X и Y представляют собой N.

Наиболее предпочтительными соединениями согласно настоящему изобретению являются соединения A, B и C (см. таблицу 1).

10 В одном из вариантов осуществления фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению содержит фармакологически активное соединение общей формулы 1 в форме фармацевтически приемлемой соли в кристаллической форме. Соль может представлять собой любую соль, подходящую для стабилизации свободного основания формулы 1, т. е., кислые соли, такие как, например, хлориды, нитраты и сульфаты. Соль может представлять собой моно- или дисоль. Предпочтительно соль

15 представляет собой моно- или дигидрохлоридную соль. Наиболее предпочтительной является дигидрохлоридная соль.

Экципиент(ы) может(гут) представлять собой любой из маннита, глюкозы, сахарозы или других подходящих производных сахаров. В предпочтительном варианте осуществления экципиент представляет собой D-маннит. Концентрация D-маннита может составлять от

20 0,5 до 20% (масс./об.). Предпочтительно концентрация составляет от 1,0 до 15 масс.% (масс./об.). Более предпочтительно концентрация составляет от 3 до 10% (масс./об.). Наиболее предпочтительно концентрация составляет от 4 до 6% (масс./об.). В другом аспекте более предпочтительно, чтобы концентрация D-маннита составляла приблизительно 5% (масс./об.).

Таблица 1. Иллюстративные соединения согласно изобретению

Соединение	R	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	X	Y
<b>A</b>	CH <sub>3</sub>	6-CH <sub>3</sub>	H	N	N
<b>B</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	6-CH <sub>3</sub>	H	N	N
<b>C</b>	CH <sub>2</sub> C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	6-CH <sub>3</sub>	H	N	N

<b>D</b>	CH <sub>3</sub>	7-Cl	H	N	N
<b>E</b>	CH <sub>3</sub>	6-Cl	H	N	N
<b>F</b>	CH <sub>3</sub>	8-OCH <sub>3</sub>	H	N	N
<b>G</b>	CH <sub>3</sub>	8-OCF <sub>3</sub>	H	N	N
<b>H</b>	CH <sub>3</sub>	9-Br	H	N	N <sup>5</sup>
<b>I</b>	CH <sub>3</sub>	8-Cl	H	N	N
<b>J</b>	CH <sub>3</sub>	8-CH <sub>3</sub>	H	N	N
<b>K</b>	H	6-CH <sub>3</sub>	H	CH	CH

В настоящем изобретении также предложен способ получения описанной выше  
10 фармацевтической композиции. Способ включает следующие стадии:

- i. обеспечение раствора соединения общей формулы 1 в виде свободного основания,
- ii. взаимодействие раствора с соляной кислотой в этаноле в количествах, достаточных для образования соединения общей формулы 1b, т. е., дигидрохлоридной  
15 соли, и где дигидрохлоридная соль спонтанно выпадает в осадок;
- iii. очистке осадка, содержащего дигидрохлоридную соль, полученную на стадии (ii), от растворителя;
- iv. растворение осадка, содержащего дигидрохлоридную соль со стадии (iii), в водном растворителе, необязательно содержащем фармацевтически приемлемый  
20 эксципиент, и
- v. лиофилизация смеси с получением лиофилизированного порошка или осадка.

Растворитель для свободного основания общей формулы 1 может представлять собой, например, метанол. Очистка осадка от растворителя, т. е. стадия (iii), может быть проведена, например, в вакууме посредством струи воздуха или инертного газа.

25 Количество E-изомера находится в тех же пределах, что и количество описанной выше фармацевтической композиции.

В одном из вариантов осуществления водный растворитель представляет собой воду. Предпочтительно стерильную воду.

Экципиент(ы) может(гут) представлять собой такой(ие), как описано выше. Порядок растворения осадка не является ограничивающим для способа и может быть изменен.

- 5 Осадок может находиться, например, в твердой форме, может быть смешан с эксципиентом, в, например, твердой форме, и добавлен в водный растворитель при перемешивании. Или эксципиент может быть растворен в водном растворе, в который добавляют твердый осадок, и растворен при перемешивании.

- 10 Еще одной задачей является обеспечение фармацевтического препарата для инъекций или инфузий в форме водного раствора указанной стабильной при хранении фармацевтической композиции.

Путем разведения лиофилизированного порошка со стадии (v) в водном растворителе, например, воде для инъекций (WFI), получают фармацевтический препарат.

- 15 Концентрация фармакологически активного соединения может составлять от 0,05 до 40 мг/мл. В одном из вариантов осуществления концентрация фармакологически активного соединения составляет от 0,1 до 30 мг/мл. Более предпочтительно фармакологически активное соединение может составлять от 0,5 до 20 мг/мл. Еще более предпочтительно фармакологически активное соединение может составлять от 0,75 до 10 мг/мл.

- 20 Концентрация указанного фармакологически активного соединения может наиболее предпочтительно составлять приблизительно 1 мг/мл.

pH препарата составляет менее 4. pH указанного препарата зависит от концентрации фармакологически активного соединения и обычно составляет от 0,5 до 4. Например, pH препарата, имеющего концентрацию фармакологически активного соединения 1 мг/мл, составляет от 2 до 3.

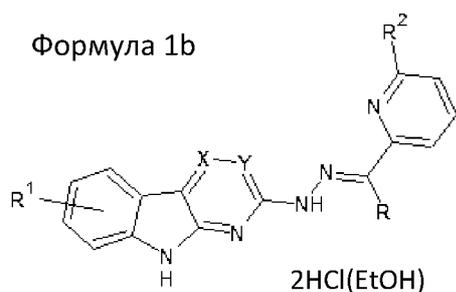
- 25 Разведение может быть проведено за одну или несколько стадий, таких как растворение лиофилизата путем добавления первого количества растворителя, после чего добавления растворителя до желаемой конечной концентрации.

- 30 Водный растворитель для разведения лиофилизированного порошка, содержащего указанное фармацевтически активное соединение, может также содержать фармакологически приемлемый эксципиент, как описано выше.

Другой задачей настоящего изобретения является обеспечение способа облегчения, уменьшения или лечения рака у субъекта с помощью фармацевтической композиции согласно изобретению, по отдельности или в комбинации с другим противораковым лечением.

5 Путь введения фармацевтического препарата может представлять собой инфузию или инъекцию. Вместе с тем, может быть использован любой подходящий способ введения препарата или композиции. Препарат или композиция могут быть введены, например, внутриаартериально, внутримышечно, внутривенно, перорально, ректально, энтерально, внутриочагово или внутриопухолево, и интратекально.

10 Другой задачей настоящего изобретения является обеспечение осадка, иллюстрируемого общей формулой 1b,



где по меньшей мере 95 масс.% (масс./масс.) фармакологически активного соединения общей формулы 1b находится в форме E-изомера.

15 Количество E-изомера может находиться в тех же пределах, что и количество описанной выше фармацевтической композиции.

Соединение общей формулы 1b представляет собой осадок производного индола формулы 1, где заместители R, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, X и Y являются такими, как определено выше для формулы 1. Предпочтительные соединения общей формулы 1b перечислены в таблице 1.

20 Наиболее предпочтительные соединения общей формулы 1b имеют такие заместители, как в соединениях A, B и C в таблице 1.

Другой задачей настоящего изобретения является обеспечение способа получения осадка, содержащего указанные соединения или фармацевтически приемлемые соли, описанные выше, где указанный способ соответствует стадиям i) - iii) способа, описанным

25 выше для фармацевтической композиции.

В одном из аспектов дихлористоводородную кислоту в этаноле (т. е. стадия ii) добавляют за две стадии, где на первой стадии добавляют 1,0 - 1,15 экв. соляной кислоты в этаноле, а на второй стадии добавляют от 2,0 до 2,5 эквивалентов соляной кислоты в этаноле. В качестве альтернативы, добавление может быть проведено за одну или несколько 5 стадий. Соль спонтанно выпадает в осадок на стадии (ii).

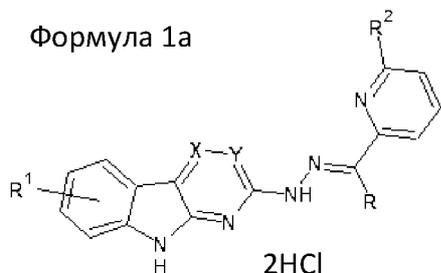
Осадок, описанный выше, также может быть использован в фармацевтической композиции.

Осадок может быть использован непосредственно или после сушки перед дальнейшим превращением в лиофилизат.

10 Содержание этанола в указанном осадке составляет от 2 до 15 масс.% относительно массы указанного осадка. Предпочтительно составляет от 4 до 13 масс.% или от 9 до 11 масс.% относительно массы указанного осадка. В одном из вариантов осуществления количество этанола составляет от 10,4 до 10,6 масс.% относительно массы указанного осадка.

15 Кроме того, настоящее изобретение относится к лиофилизату, содержащему соединение общей формулы 1a,

Формула 1a



где по меньшей мере 95 масс.%(масс./масс.) фармакологически активного соединения общей формулы 1b находится в форме E-изомера. Количество E-изомера может 20 находится в тех же пределах, что и количество описанной выше фармацевтической композиции.

Соединение общей формулы 1a представляет собой дигидрохлоридную соль производных индола, описанных выше для формулы I.

Наиболее предпочтительными соединениями являются замещенные соединения, как 25 описано выше для формул 1 и 1b.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу получения указанного лиофилизата, включающему следующие стадии:

- a) растворение осадка общей формулы 1b в водном растворителе,
- b) фильтрация полученного раствора,
- 5 c) лиофилизация раствора со стадии b) с получением лиофилизата, содержащего соединение общей формулы 1a.

В одном из аспектов осадок может быть растворен в водном растворителе при перемешивании на стадии a). Процесс более детально описан в подробном описании изобретения.

- 10 Осадок со стадии a) может быть замещенным, как любое из соединений, описанных для формулы 1 или 1b. В другом аспекте осадок может содержать одно или комбинацию описанных соединений. В еще одном аспекте отдельные осадки, содержащие различные соединения согласно настоящему изобретению, могут быть смешаны.

- Водный растворитель может дополнительно содержать по меньшей мере один фармакологически приемлемый эксципиент. Эксципиент и концентрация эксципиента могут быть такими, как описано выше.
- 15

- Раствор, полученный на стадии b), предпочтительно может быть отфильтрован через по меньшей мере один стерильный фильтр, в некоторых вариантах осуществления раствор, полученный на стадии b), фильтруют через два стерильных фильтра. Полученный раствор
- 20 может, например, быть выделен в стерильную нерасфасованную массу перед проведением стадии c). Раствором со стадии b) также могут быть заполнены флаконы, подходящие для лиофилизации.

Еще одной задачей настоящего изобретения является обеспечение осадка или лиофилизата, как описано выше, для применения в фармацевтической композиции.

- 25 Фармацевтическая композиция (т. е., лиофилизат) и осадок согласно настоящему изобретению стабильны в течение по меньшей мере 12 месяцев при комнатной температуре. Предпочтительно фармацевтическая композиция (т. е., лиофилизат) и осадок стабильны в течение по меньшей мере 24 месяцев при комнатной температуре.

Еще одной задачей настоящего изобретения является обеспечение фармацевтической композиции, т. е., лиофилизата, содержащей указанные соединения, для применения при лечении рака.

5 В одном из аспектов лиофилизат согласно настоящему изобретению может содержать только одно фармакологически активное соединение согласно настоящему изобретению, такое, как, например, соединение A2, B2 или C2. В другом аспекте лиофилизат согласно настоящему изобретению может содержать комбинацию соединений согласно настоящему изобретению. В еще одном аспекте лиофилизат, содержащий указанные соединения или фармацевтически приемлемые соли согласно настоящему изобретению, 10 может содержать по меньшей мере одно из соединений согласно настоящему изобретению в комбинации с по меньшей мере одним другим фармакологически активным соединением для применения при лечении рака.

Соединения согласно настоящему изобретению могут быть введены по отдельности или в виде смеси. Соединения могут также быть введены в одно и то же время или до или 15 после введения другого лекарственного средства или противоракового лечения.

Описанные выше фармацевтическая композиция, осадок или препарат могут, например, применяться для предупреждения или лечения заболевания или расстройства, характеризующегося патологически пролиферирующими клетками.

Фармацевтический препарат может подходить для инфузий или инъекций путем 20 разведения указанной композиции в водном растворителе. Предпочтительно препарат применяют для инфузий.

Конечная концентрация фармакологически активного соединения может составлять от 0,5 до 30 мг/мл.

Фармацевтическая композиция и препарат могут иметь pH в диапазоне от 0,5 до 4. 25 Предпочтительно pH составляет от 1 до 3. Как упоминалось выше, pH зависит от концентрации фармацевтически активного соединения и, например, pH препарата с концентрацией 1 мг/мл составляет от 2 до 3.

Фармацевтическая композиция или препарат может дополнительно содержать дополнительный терапевтический агент.

Предпочтительно фармацевтическую композицию и препарат согласно настоящему изобретению применяют для лечения рака.

Рак может представлять собой солидную, жидкую и гематологическую опухоль.

Кроме того, описанные выше лекарственное средство, фармацевтический препарат, композицию, осадок или лиофилизат могут применяться в комбинации с другим противораковым лечением, таким как химиотерапия, иммунологическая или иммуномодулирующая терапия, гормональная терапия, хирургическое удаление опухоли, фотодинамическая терапия, лазерная терапия, гипертермия, криотерапия, ингибирование ангиогенеза, радиационная терапия, или их комбинацией.

10 Кроме того, настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или расстройства, характеризующегося патологически пролиферирующими клетками, такого как рак, где субъекту, нуждающемуся в таком лечении, вводят эффективное количество фармакологически активного соединения согласно настоящему изобретению.

Эффективное количество указанного фармакологически активного соединения или соединений различается в зависимости от пациента и формы рака. Например, количество составляет приблизительно от 0,1 до 10 мг/кг массы тела, предпочтительно от 0,5 до 5 мг/кг и более предпочтительно от 1 до 4 мг/кг массы тела. Общая доза, вводимая субъекту, может составлять от 5 до 800 мг, в зависимости от состояния субъекта и формы рака, и независимо от массы тела указанного субъекта. В одном из аспектов доза, вводимая субъекту, составляет от 30 до 300 мг. Доза может быть еще ниже при назначении в комбинации с другим противораковым лечением, как показано ниже.

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения рака, описанному выше, в комбинации с другим противораковым лечением.

25 Различные варианты осуществления, описанные выше, могут быть объединены друг с другом или использованы по отдельности.

Детали одного или более вариантов осуществления изобретения изложены в подробном описании изобретения, приведенном ниже. Другие признаки, задачи и преимущества изобретения будут очевидны из описания и графических материалов, и из прилагаемой формулы изобретения, включенной в настоящий документ посредством ссылки.

### Краткое описание графических материалов

Следующие графические материалы иллюстрируют аспекты изобретения и не предназначены для ограничения его объема, определенного формулой изобретения.

5 На фиг. 1 показан путь синтеза осадка (A1) соединения А и стадия превращения осадка в соответствующую соль, т. е., лиофилизат (A2).

На фиг. 2a показана хроматограмма ВЭЖХ, демонстрирующая 99,8% чистоту соединения A1, а на фиг. 2b показана структура Е-изомера соединения A1, подтвержденная рентгеновской хроматографией.

На фиг. 3 показаны кривые доза-эффект для соединения А в различных линиях клеток.

10 На фиг. 4a-d показаны кривые доза-эффект для соединений А, В и С в клетках НСТ116 (А) и в клетках НерG2, клетках RKO, клетках HeLa, клетках СЕМ и клетках ТНР-1 для соединения А (b), для соединения В (c) и для соединения С (d).

### Подробное описание изобретения

15 Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными раскрытыми в настоящем документе конфигурациями, стадиями способа и материалами, поскольку такие конфигурации, стадии способа и материалы могут в некоторой степени различаться. Также следует понимать, что используемая в настоящем документе терминология предназначена исключительно для описания конкретных вариантов осуществления и не является ограничивающей, так как объем настоящего изобретения  
20 ограничен только прилагаемой формулой изобретения и ее эквивалентами.

Все цитированные источники включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме и для всех целей в такой же степени, как если бы каждая отдельная публикация, или патент, или патентная заявка были специально и индивидуально указаны как включенные посредством ссылки в полном объеме для всех целей.

25 Настоящее изобретение можно наилучшим образом понять со ссылкой на следующие приведенные в настоящем документе определения, графические материалы и примеры.

В настоящем описании подразумевается, что соединение общей формулы 1 включает любой его фармацевтически приемлемый осадок, сольват, соль или пролекарство.

В настоящем описании термин «осадок» означает сокристаллические соединения дигидрохлорида и этанола, или этанолат дигидрохлорида, или сольват дигидрохлорида этанола, полученные осаждением, например, продукт стадии осаждения в реакции 4 на фиг. 1. Соединения могут представлять собой осадок любого соединения формулы 1

5 согласно настоящему изобретению.

В настоящем описании термин «фармацевтически приемлемые соединения» включает осадки, сольваты и лиофилизаты соединений, описанных в настоящем описании.

В настоящем описании термин «изомер» относится к соединениям, имеющим одинаковый состав и молекулярную массу, но отличающимся физическими и/или химическими свойствами. Такие вещества имеют одинаковое количество и вид атомов, но различаются по структуре. Структурная разница может заключаться в строении (геометрические изомеры) или в способности вращать плоскость поляризованного света (стереоизомеры). Термин «стереоизомер» относится к изомерам одинакового строения, которые отличаются расположением своих атомов в пространстве.

10 В настоящем описании, если не указано иное, термин «фармацевтически приемлемый эксципиент» означает нетоксичный, инертный твердый, полутвердый или жидкий наполнитель, разбавитель, инкапсулирующее вещество или вспомогательный компонент препарата любого типа.

В настоящем описании, если не указано иное, термин «фармацевтически активное соединение» охватывает любое вещество, которое будет обеспечивать терапевтически полезный фармакологический эффект при введении реципиенту, включая как человека, так и животных.

В настоящем описании термин «вводить» или «введение» означает предоставление лекарственного средства субъекту способом, который является фармакологически полезным.

В настоящем описании, если не указано иное, термин «цитотоксическое соединение» относится к соединению, обладающему способностью останавливать рост клеток или уничтожать их, т. е., имеющему высокую цитотоксическую активность.

В настоящем описании, если не указано иное, термин «производное» относится к соединению, образованному из исходной структуры, либо напрямую, путем химического

30

взаимодействия исходной структуры, либо «модификацией», представляющей собой частичную замену исходной структуры, или путем дизайна и синтеза *de novo*.

Производные могут быть синтетическими или могут представлять собой продукты метаболизма клетки или *in vitro* ферментативной реакции.

- 5 В настоящем описании подразумевается, что термин «рак» означает любое злокачественное неопластическое заболевание, т. е., любой злокачественный рост или опухоль, вызванные патологическим и неконтролируемым делением клеток. В частности, подразумевается, что термин «рак» включает как солидные, локализованные опухоли, так и несолидные формы рака. Например, указанные формы рака могут быть выбраны из
- 10 группы, состоящей из лейкоза (ALL (острого лимфобластного лейкоза), AML (острого миелобластного лейкоза), CLL (хронического лимфоцитарного лейкоза), CML (хронического миелоидного лейкоза), CMML (хронического миеломоноцитарного лейкоза)), Т-клеточного лейкоза, множественной миеломы, карциномы яичника, рака предстательной железы, аденокарциномы шейки матки, плоскоклеточной карциномы,
- 15 рака молочной железы, колоректального рака, рака тонкой кишки, рака анального канала, рака желудка-кишечного тракта, рака почки, злокачественной меланомы, рака почечной лоханки и мочеточника, рака уретры, рака мочевого пузыря, рака печени, рака аппендикса, рака поджелудочной железы, рака легкого, рака пищевода, рака губы/ротовой полости, рака носа, рака гортани, рака головного мозга/центральной
- 20 нервной системы, рака кожи, рака щитовидной железы и вилочковой железы, саркомы, рака головы и шеи, неходжкинской лимфомы (НХЛ), лимфомы Ходжкина и псевдомиксомы брюшной полости.

Настоящее изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции с преобладающим содержанием Е-изомера. Монокристалльный рентгеноструктурный

25 анализ подтвердил, что Е-изомер преобладал в твердом состоянии.

С помощью способа согласно настоящему изобретению получают хорошо охарактеризованную и стабильную фармацевтическую композицию, содержащую по меньшей мере 95 масс.% (подтверждено ВЭЖХ, см. фиг. 2) фармацевтически активного соединения (Е-изомера).

30 **ПРИМЕРЫ**

### Пример 1. Синтез соединения А

В первых экспериментах соединение А (свободное основание) разбавляли в ацетоне/ацетилате/ацетонитриле, в этой комбинации растворителей был растворим и легко отфильтровывался Е-изомер, но не Z-изомер. Конечное содержание Е-изомера при использовании этой комбинации растворителей составляло приблизительно 92%.

Описанная комбинация растворителей хорошо работала во время маломасштабного производства, но не подходила для увеличения его масштабов из-за большого количества требуемого растворителя. Поэтому авторами был разработан синтез соединения А, основанный на синтезе производных 1,2,4-триазино[5,6-*b*]индола, описанном Kgo Kong, *et al.*, 2005 (см. фиг. 1). Авторы разработали методику с использованием метанола (MeOH) в качестве растворителя и соляной кислоты в этаноле (HCl/EtOH) в качестве носителя HCl (EtOH также служит в качестве антирастворителя). При последующей разработке увеличения масштабов процесса была улучшена эффективность реакционного объема. Кроме того, также был разработан подходящий способ превращения свободного основания (А) в конечный осадок гидрохлорида (А1) в больших масштабах (см. фиг. 1, примеры 1 и 2). Свободное основание (А) было нерастворимо в одном MeOH, но после добавления приблизительно 1 эквивалента HCl/EtOH был получен прозрачный раствор.

Из-за наблюдаемых дисульфидных соединений реакцию можно проводить в атмосфере азота, чтобы избежать окисления кислородом воздуха. Влажный осадок, полученный на стадии 1 реакции, может также быть высушен в вакууме, или влажный осадок может быть дополнительно обработан без предварительной сушки. При сушке в вакууме образование примесей сводится к минимуму, так как примеси могут образовываться при сушке на воздухе. Взаимодействие продукта стадии 2 реакции с небольшим избытком 2-ацетилпиридина (1,5 экв.) в этаноле (20 мл/г соединения) при 50 °С по прошествии 5 часов привело к образованию продукта, но слишком медленному превращению (прибл. 8%).

На фиг. 1 показаны стадии 1-3 синтеза соединения А (смесь Е- и Z-изомеров; систематическое название по ИЮПАК: 2-[(1E,Z)-1-(2-{6-метил-5H-[1,2,4]триазино[5,6-*b*]индол-3-ил}гидразин-1-илиден)этил]пиридин).

Стадия 1. К водной суспензии 7-метилизатина (4,75 кг, 29,5 моль) добавляли 2,85 кг (31,3 моль) тиосемикарбазида и 6,15 кг (44,5 моль) карбоната калия. Перемешиваемую смесь

нагревали с обратным холодильником в течение 3 часов, затем охлаждали до комнатной температуры. Медленно добавляли уксусную кислоту (100%, 3,3 кг, 55,0 моль) до достижения рН, равного 7,1. Суспензию фильтровали через фильтр под давлением и промывали фильтровальный осадок водой (19,4 кг) с получением 7,6 кг мокрого 6-метил-  
5 2Н,3Н,5Н-[1,2,4]триазино[5,6-*b*]индол-3-тиона.

Стадия 2. Влажный фильтровальный осадок с предыдущей стадии, соответствующий приблизительно 4,6 кг сухого 6-метил-2Н,3Н,5Н-[1,2,4]триазино[5,6-*b*]индол-3-тиона, суспендировали в 57,1 кг моногидрата гидразина и перемешивали смесь при 89 °С в течение 18 часов. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и выделяли  
10 продукт центрифугированием, промывали водой (15,9 кг) и этанолом (18,4 кг), и сушили при 1450 об/мин. Влажный фильтровальный осадок (7,8 кг, соответствующий 3,8 кг сухой массы) 3-гидразинил-6-метил-5Н-[1,2,4]триазино[5,6-*b*]индола, переносили обратно в очищенный реактор и сушили в вакууме.

Стадия 3. К высушенному 3-гидразинил-6-метил-5Н-[1,2,4]триазино[5,6-*b*]индолу со  
15 стадии 2 добавляли воду (76,85 кг), уксусную кислоту (100%, 6,70 кг, 111,6 моль) и 2-ацетилпиридин (10,75 кг, 88,7 моль). Смесь перемешивали в течение 3 часов при 48,5 °С, охлаждали до комнатной температуры и медленно добавляли NaOH (27%, 6,3 кг, 110 моль) до достижения рН, равного 7,0, поддерживая температуру между 20 и 25 °С. Смесь перемешивали в течение еще 1 ¼ часа при этой температуре и выделяли продукт  
20 центрифугированием. После промывки смесью воды (7,3 кг) и этанола (5,8 кг) осадок сушили при 1450 об/мин, затем сушили в вакуумном сушильном шкафу при 47 °С в течение 66 ч с получением 5,82 кг указанного в заголовке соединения в виде бежевого/зеленоватого твердого вещества.

На стадии 4 на фиг. 1 показан синтез соединения А1, этанольного сокристалла соединения  
25 *А* (систематическое название по ИЮПАК: 2-[(1*E*)-1-(2-{6-метил-5Н-[1,2,4]триазино[5,6-*b*]индол-3-ил}гидразин-1-илиден)этил]пиридина дигидрохлорид)

К 2-[(1*E*,*Z*)-1-(2-{6-метил-5Н-[1,2,4]триазино[5,6-*b*]индол-3-ил}гидразин-1-илиден)этил]пиридина (5,80 кг) добавляли HCl в этаноле (12,4 кг, 1,05 экв.) и перемешивали смесь при 28-30 °С в течение получаса до получения прозрачного  
30 раствора. Раствор фильтровали и добавляли дополнительную HCl в этаноле (28,95 кг, 2,45

экв.) при 25 °С в течение 1 ч и 40 мин при перемешивании. Во время первого добавления 1,05 экв. HCl/EtOH большая часть присутствующего Z-изомера превращается в E-изомер, и образуется некоторое количество моногидрохлоридной соли. Дигидрохлоридная соль спонтанно осаждается при добавлении 2,45 экв. HCl в EtOH. Молярная концентрация HCl в EtOH, определенная путем титрования с 0,1 М NaOH и индикатором фенолфталеином, составила от 1,1 до 1,4 М HCl. Перемешивание продолжали при той же температуре в течение 15 мин и с добавлением этанола (45,8 кг). Полученную таким образом суспензию охлаждали приблизительно до температуры от 0 до -5 °С и перемешивали в течение 1 ч. Продукт, выделенный центрифугированием, промывали этанолом (0-5 °С, 45 кг), затем осушали при 1450 об/мин. Осадок высушивали в вакууме при 37 °С в течение 42 ч с получением 7,57 кг указанного в заголовке соединения (приблизительно 108%, исходя из отсутствия остаточного растворителя, или 98% исходя из моноэтилового эфира), дигидрохлорида в виде твердого вещества, имеющего цвет от желтого до оранжевого. Полученный осадок сокристалла дигидрохлорида и этанола имеет содержание этанола от приблизительно 2 масс.% до приблизительно 20 масс.%.

На стадии 5 реакции на фиг. 1 показано образование лиофилизированной композиции, содержащей соединение общей формулы 1a.

#### *Анализ содержания изомеров с помощью ВЭЖХ*

Во время разработки процесса анализ соединения А и соединения А1 вызывал аналитические проблемы, связанные, например, с нестабильностью образца, плохой растворимостью, изомеризацией, ВЭЖХ и т. д. Поэтому авторы разработали более надежный метод ВЭЖХ на основе колонки XBridge C18, 3,5 мкм, 150 x 4,6 мм. Проблема была также решена путем использования 2% муравьиной кислоты в MeOH в качестве разбавителя и перехода от стандартных флаконов для образца для ВЭЖХ без покрытия к покрытым (силанизированным) флаконам от Agilent.

Использовалась хроматографическая система Agilent 1200/1260 или ее эквивалент.

При использовании ВЭЖХ в кислой среде для анализа соединения А было обнаружено, что при бл. 7% находилось в форме Z-изомера (образец приготовлен в 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O).

Через 2 дня тот же самый образец повторно анализировали, анализ показал при бл. 2% Z-изомера и начало гидролиза в соединении А1 (обнаружено при бл. 1%). Это показало, что

кислотные условия (рН в диапазоне от 1 до 4) превращают нежелательный Z-изомер в желаемый E-изомер. После проведения последующего образования соли (стадия 4 реакции) (с использованием HCl в этаноле) содержание изомера было снижено до < 0,5%. Это означает, что можно допускать относительно большое содержание нежелательного изомера (такое как 5%) в соединении А, В или С, поскольку оно превращается в желаемый изомер при добавлении HCl в этаноле. Добавление HCl в этаноле приводит к образованию дигидрохлоридного осадка (такого, как соединения А1, В1 и С1).

#### *Чистота по ВЭЖХ*

Чистоту по ВЭЖХ рассчитывали как 100% - общее содержание примесей. Все пики ниже 0,05% и пики, присутствующие в матрице, исключаются из расчетов. Содержание каждой примеси рассчитывали как процент от общей площади пика (% площади). Общее содержание примесей равно сумме примесей  $\geq 0,05\%$ .

#### *Примеси*

Конечным результатом для каждой примеси является среднее значение четырех результатов. Общие количества примесей представлены в виде суммы примесей  $\geq 0,05\%$ .

#### *Остаточные растворители*

Анализ соединения А1 показал, что оно представляет собой композицию сокристалла дигидрохлорида и этанола (осадок). Теоретическое содержание этанола в соединении А1 составляет 10,6%, что согласуется с образованием сокристалла этанола (осадка), как описано выше.

Во время процесса разработки композиций, содержащих соединение А, было неожиданно показано, что сокристалл дигидрохлорида и этанола (например, А1) является менее гигроскопичным и значительно более стабильным в отношении гидролиза и снижения изомерной чистоты.

Был сделан вывод о том, что высокие уровни этанола могут быть допустимы в лекарственном веществе (осадке), поскольку он удаляется во время последующей лиофилизации, которая является частью процесса производства готового лекарственного продукта (лиофилизата).

Уровни метанола были относительно высокими; в основном содержание метанола в

композиции А1 составляло 1,4-1,8%. Длительные циклы сушки не привели к  
значительному снижению содержания метанола. Однако, как и в случае с этанолом,  
последующий цикл лиофилизации, используемый при производстве готового  
лекарственного продукта (например, А2), эффективно удаляет метанол до уровней ниже  
5 директивы ICH Q3В.

#### *Заключение*

Исходя из того факта, что уровни как этанола, так и метанола в готовом лекарственном  
продукте значительно ниже директивы ICH Q3С, и учитывая то, что они тщательно  
контролируются, был сделан вывод о том, что более высокие уровни могут быть  
10 допустимы в лекарственном веществе (т. е., соединении А1). Все остальные ограничения,  
указанные в описании, соответствуют стандартам Европейской фармакопеи или  
Фармакопеи США.

#### *Идентификация*

Идентификация образца основывалась на визуальном осмотре основного пика  
15 подготовленного образца и основного пика образца, подготовленного для  
идентификации. Соединение А1 представлено одним пиком на хроматограмме (см. фиг.  
2а).

#### *Пример 2. Стабильность*

Исследование стабильности осадка сокристалла дигидрохлорида и этанола и  
20 лиофилизированной дигидрохлоридной соли проводили в соответствии с директивой  
Международной конференции по гармонизации (ICH) Q1А (R2) Испытание новых  
лекарственных веществ и лекарственных препаратов на стабильность. Все аналитические  
инструменты, используемые для анализа образцов стабильности во время исследования,  
квалифицируются в соответствии с действующими cGMP (текущими правилами  
25 организации производства и контроля качества лекарственных средств).

Исследование стабильности состоит из двух частей: одного длительного (5 °С, 24, 36  
месяцев) и одного ускоренного исследования (25 °С/ОВ 60%, 6 месяцев).

Осадок сокристалла дигидрохлорида и этанола соединения А (А1) упаковывали в  
запаянные двойные полиэтиленовые пакеты, находящиеся в запаянном мешке,

ламинированном фольгой, помещенном в закрытый контейнер из HDPE (полиэтилена высокой плотности). Образцы хранили в условиях 5 °С для длительного исследования, и в условиях 25 °С/ОВ 60% для ускоренного исследования. Внешне образцы представляли собой твердое вещество цветом от желтого до оранжевого в течение всего периода испытаний. Анализ, проведенный ввиду результата порошковой рентгеновской дифрактометрии для образца 25 °С/ОВ 60%, показал неожиданный низкий уровень кристалличности. Степень кристалличности не оказывает прямого влияния на качество или стабильность лекарственного вещества, но контролируется как часть исследовательской работы. Полученные за 36 месяцев данные в отношении стабильности приведены в таблице 2а ниже.

В таблице 2b приведены данные в отношении стабильности осадка сокристалла дигидрохлорида и этанола при 25 °С и ОВ 60% в течение 6 месяцев. Внешне образцы представляли собой твердое вещество цветом от желтого до оранжевого в течение всего периода испытаний.

#### *Заключение*

Настоящая композиция, содержащая соединение А1, стабильна в течение по меньшей мере 24 месяцев (таблица 2а). В течение этого периода не наблюдалось значительного разложения соединения А1 ни при 2-8 °С, ни при 25 °С/ОВ 60% (6 месяцев).

- 5 Рекомендуется хранить и транспортировать композицию, содержащую соединение А1, при 2-8 °С. Тем не менее, 24 часа хранения при температуре до 25 °С не должны вызывать беспокойства.

*Пример 3. Производство фармацевтической композиции осадка сокристалла этанола и*  
*2-[(1)-1-(2-{6-метил-5Н-[1,2,4]триазино[5,6-в]индол-3-ил}гидразин-1-илиден)этил]-*  
 10 *пиридина дигидрохлорида.*

- Несколько осадков сокристалла этанола, главным образом с 2-[(1Е)-1-(2-{6-метил-5Н-[1,2,4] триазино[5,6-в]индол-3-ил}гидразин-1-илиден)этил]-пиридина дигидрохлоридом (А1), (соответствует 160 мг свободного основания, А), по 225,6 мг, растворяли в растворе маннита (500 мг) в воде для инъекций (Европейская фармакопея, 10 мл), раствор  
 15 стерилизовали фильтрацией через два 0,2 мкм фильтра и заполняли им соответствующее количество стерилизованных флаконов, затем лиофилизировали (с получением соли

соединения А2).

**Таблица 2а**

<b>Время (месяцы)</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>18</b>	<b>24</b>	<b>36</b>	
RRT 0,92- 0,93	≤1,0	0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	0,07	<0,05	0-07
RRT 1,13	≤1,0	<0,05	<0,05	<0,06	<0,06	<0,05	0,05	0,05	0,05	<0,05
RRT 1,23- 1,24	≤1,0	0,05	0,05	0,06	0,06	0,05	0,06	0,06	0,06	0,06
RRT 1,39	≤1,0	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	0,05	<0,05	<0,05
RRT 1,47- 1,51	≤1,0	0,17	0,10	0,10	0,36 <sup>2</sup>	0,09	<0,05	0,06	0,05	0,06
Обще е содер жание приме сей	≤ 2,0	0,26	0,15	0,16	0,42	0,14	0,10	0,29	0,16	0,18
Содер жание воды (масс. %)		2,53	2,34	2,18	2,50	2,88	2,65	2,73	3,37	2,46

<sup>2</sup> Относительная площадь для примеси при RRT (относительное время удерживания) = 1,47 - 1,51 выше, чем ожидалось. Подготовка образца и анализ ВЭЖХ были повторены другим аналитиком, который подтвердил результат. Во время проверки метода испытания для этой примеси наблюдалась переменной площадью пика.

Авторы разработали новый способ лиофилизации, поскольку обычные способы, используемые в уровне техники, требовали более 300 часов сушки. Новый способ является более агрессивным и описан в таблице 3 ниже.

Таблица 2b

Время (месяцы)		0	1	3	6
RRT 0,92-0,93	≤ 1,0	0,05	<0,05	0,05	0,07
RRT 1,12	≤ 1,0	<0,05	<0,05	<0,05	0,05
RRT 1,24	≤ 1,0	0,05	0,05	0,06	0,05
RRT 1,38	≤ 1,0	<0,05	<0,05	0,05	<0,05
RRT 1,49-1,51	≤ 1,0	0,17	0,10	0,06	0,36 <sup>2</sup>
Итого					
примесей	≤ 2,0	0,26	0,16	0,22	0,52
Содержание воды (масс.%)		2,53	2,41	2,30	2,45 <sub>10</sub>

<sup>2</sup> Относительная площадь для примеси при RRT = 1,47 - 1,51 выше, чем ожидалось.

15 Подготовка образца и анализ ВЭЖХ были повторены другим аналитиком, который подтвердил результат. Во время проверки метода испытания для этой примеси наблюдалась переменчивая площадь пика.

При использовании наибольшего отрицательного давления и относительно высокой температуры, температуры отжига, приведенных в таблице 3, продолжительность стадии лиофилизации сократили до 19 часов.

Контакта с металлическими поверхностями избегали. Этанол и небольшие присутствовавшие количества метанола были удалены в процессе лиофилизации.

Флаконы укупоривали путем обжима крышки в атмосфере азота и хранили при 5 °С; после хранения в течение 24 месяцев не наблюдалось разложения.

25 Глюкозу и маннит оценивали в качестве эксципиентов как по отдельности, так и в комбинации с NaCl. Наилучший результат в отношении растворимости, консистенции лиофилизованного осадка и подавления образования примесей был получен с использованием 5% (масс./об.) маннита в качестве добавки. Более высокая степень распада лиофилизованного осадка наблюдалась при использовании глюкозы в

качестве наполнителя. Добавление NaCl вызывало проблемы с растворимостью, поскольку повышение pH, создаваемое NaCl, уменьшало растворимость соединения А2.

Лиофилизированный порошок для разведения и инъекций (соответствующий 160 мг свободного основания соединения А) хранили при 2-8 °С вплоть до 24 месяцев. Внешне

- 5 лиофилизированный осадок имел цвет от желтого до оранжевого в течение всего периода испытаний, и раствор после разведения имел цвет от желтого до оранжевого без видимых частиц.

**Таблица 3**

Тип стадии	Температура (Т °С)	Время (ч)	Вакуум (мбар)
Загрузка на полки	5	/	/
Стадия заморозки	5	0,30	/
Изменение температуры для заморозки	-45	0,50	/
Стадия заморозки	-45	4	/
Изменение температуры для заморозки (отжига)	-25	1	/
Стадия заморозки (отжиг)	-25	2	/
Изменение температуры для заморозки (отжига)	-45	1	/
Стадия заморозки	-45	4	/
Вакуумная камера	-45	/	0,200
Первичная сушка	-45	0,10	0,200
Изменение температуры для первичной сушки	25	3	0,200
Стадия первичной сушки	25	XX*	0,200
Изменение температуры для вторичной сушки	25	10	максимально
Конец цикла			

Анализ, проведенный ввиду результата порошковой рентгеновской дифрактометрии для образца 25 °С/ОВ 60%, показал неожиданный низкий уровень кристалличности. Степень кристалличности не оказывает прямого влияния на качество или стабильность лекарственного вещества, но контролируется как часть исследовательской работы. Время разведения составляло до 3 минут. Никакого бактериального роста не было обнаружено, и стерильность продукта не была нарушена в течение 24 месяцев при комнатной температуре. Полученные данные в отношении стабильности кратко представлены в таблице 4а ниже.

Таблица 4а

<b>Время (месяцы)</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>12</b>	<b>18</b>	<b>24</b>
рН	1,6	1,6	1,6	1,5	1,6	1,6	1,7
Содержание воды (%)	0,33	0,41	0,47	0,37	0,53	0,43	0,39
Анализ (масс.%) <sup>1</sup>	97,8	98,4	95,9	97,3	93,9	94,6	94,2
Общее содержание примесей (%)	0,7	0,5	0,3	0,4	0,2	0,3	0,34
Любая индивидуальна я чистота (%)	0,4	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,10
Установленная примесь* (%)	<0,5	<0,05	<0,05	0,08	0,08	0,10	0,09
Z-изомер (%)	0,1	0,1	0,1	0,1	<0,05	<0,05	0,05
RRT 0,92-0,93							
RRT 1,13	0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	0,05	<ПКО
RRT 1,23-1,24	0,06	0,05	0,08	0,05	0,06	0,05	0,05
RRT 1,39							
RRT 1,47-1,51	0,37	0,32	0,05	<0,05	<0,05	0,05	0,10

\*Примесь, являющаяся результатом гидролиза, 3-гидразинил-6-метил-5Н-[1,2,4]триазинол[5,6-в]индол

ПКО (предел количественного определения) составляет 0,05%, пики <ПКО были зарегистрированы как <0,05%

- 5 Лиофилизированный порошок для разведения и инъекций (соответствующий 160 мг свободного основания соединения А) хранили в условиях 25 °С/ОВ 60% для ускоренного исследования (см. таблицу 4b). Внешне лиофилизированный осадок имел цвет от желтого до оранжевого в течение всего периода испытаний, и раствор после разведения имел цвет от желтого до оранжевого без видимых частиц. Анализ, проведенный ввиду
- 10 результата порошковой рентгеновской дифрактометрии для образца 25 °С/ОВ 60%, показал неожиданный низкий уровень кристалличности. Степень кристалличности не оказывает прямого влияния на качество или стабильность лекарственного вещества, но контролируется как часть исследовательской работы. Время разведения составляло до 3 минут. Никакого бактериального роста не было обнаружено, и стерильность продукта не
- 15 была нарушена в течение 24 месяцев при комнатной температуре. Неожиданно, лиофилизат продемонстрировал стабильность в течение по меньшей мере 24 месяцев при комнатной температуре. Полученные данные в отношении стабильности кратко представлены в таблице 4b ниже.

**Таблица 4b**

<b>Время (месяцы)</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>12</b>	<b>18</b>	<b>24</b>
рН	1,6	1,6	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6
Содержание воды (%)	0,33	0,39	0,55	0,45	0,59	0,49	0,45
Анализ (масс.%) <sup>1</sup>	97,8	97,2	95,4	98,3	94,6	93,9	94,5
Общее	0,7	0,3	0,7	0,4	0,2	0,20	0,36

содержание  
примесей (%)

Любая 0,4 0,1 0,2 0,1 0,1 0,1 0,10

индивидуальная  
чистота (%)

Установленная примесь\* (%) <0,5 0,1 <0,05 0,08 0,08 0,10 0,10

Z-изомер (%) 0,1 <0,05 0,1 0,1 0,10 <0,05 0,05

RRT 0,92-0,93

RRT 1,13 0,05 <0,05 <0,05 <0,05 <0,05 н.о. <ПКО

RRT 1,23-1,24 0,06 0,05 0,08 0,06 0,06 0,06 0,06

RRT 1,39

RRT 1,47-1,51 0,37 0,13 0,05 <0,05 <0,05 н.о. 0,09

\* Примесь, являющаяся результатом гидролиза, 3-гидразинил-6-метил-5Н-[1,2,4]триазинол[5,6-*b*]индол

ПКО составляет 0,05%, пики <ПКО были зарегистрированы как <0,05% Значение рН должно составлять от 0,5 до 4, в примере выше концентрация составляет приблизительно 16 мг/мл, а рН составляет от 1,3 до 2,3, и содержание воды составляет менее 1%. Z-изомер предпочтительно составляет менее 2%, однако авторы неожиданно обнаружили, что кислотные условия благоприятствуют E-изомеру.

Лиофилизат, содержащий соединение А2, неожиданно продемонстрировал меньшую растворимость в воде после лиофилизации, чем до нее. В связи с этим было проведено исследование структуры, показавшее, что соединение А2 меняет свою кристаллическую форму в ходе лиофилизации. Новая кристаллическая форма была менее растворима в воде, что объясняет разницу в растворимости между осадком сокристалла дигидрохлорида и этанола (А1) и дигидрохлоридной солью (А2). Эксперименты показали, что это истощение осадков вызывало изменение морфологической формы. Результаты

экспериментов также показали, что эксципиент (D-маннит) не оказывает никакого влияния на образование новой морфологической формы. Наилучший результат в отношении образования примесей и консистенции лиофилизированного осадка получали с помощью цикла лиофилизации, описанного в таблице 3, и содержания маннита на уровне 5%.

*Пример 4. Получение фармацевтического препарата.*

Было обнаружено, что может быть получен препарат соединения А2 в водных средах для подавления образования побочных продуктов вплоть до 24 часов при 1 мг/мл. Также ясно, что рН имеет значение для стабильности соединения А2 в водных средах, при этом наилучшая стабильность достигается при рН, составляющем приблизительно 1-4, более высокая концентрация вещества приводит к снижению рН. 1 мг/мл указанного водного раствора имеет рН, составляющий приблизительно 2-3.

Полученное соединение А2 получают в виде стерильного лиофилизированного порошка, и раствор для инъекций или инфузий получали путем растворения описанного выше лиофилизированного порошка в водном растворителе, таком как вода для инъекций. Каждый флакон содержит количество фармакологически активного соединения, соответствующее 160 мг свободного основания (А), полученного из раствора 225,6 мг лекарственного вещества (А1) и 5% маннита (масс./об.). Лиофилизат может быть разведен в 10 мл водного растворителя и затем разбавлен до 1 мг/мл водным растворителем, необязательно содержащим фармакологически приемлемый эксципиент, предпочтительно 5% маннита (масс./об.), для инфузии.

*Пример 5.*

*Синтез соединения В; 2-[(1E)-1-(2-{6-метил-5H-[1,2,4]триазино[5,6-b]индол-3-ил}гидразин-1-илиден)пропил]пиридин*

1-(пиридин-2-ил)пропан-1-он (35 мг, 0,26 ммоль) растворяли в смеси вода-уксусная кислота (20:1, 10 мл), затем добавляли 3-гидразинил-6-метил-5H-[1,2,4]триазино[5,6-b]индол (50 мг, 0,23 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 2 часов при 50 °С. После выпаривания растворителей получали темно-зеленое твердое вещество (70 мг). ЖХ показала чистый продукт с соотношением изомеров 95:5.

*Пример 6*

*Синтез соединения С; 2-(3,3-диметил-N-{6-метил-5Н-[1,2,4]триазино[5,6-*b*]индол-3-ил}бутангидразиноил)пиридин*

3,3-диметил-1-(пиридин-2-ил)бутан-1-он (46 мг, 0,26 ммоль) отмеряли в смесь вода-

- 5 1,2,4]триазино[5,6-*b*]индол (48 мг, 0,23 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при 50 °С. После выпаривания растворителей получали зеленовато-желтое твердое вещество (78 мг). ЖХ показала чистый продукт с соотношением изомеров 92:8.

*Пример 7*

Соединение В1 превращали в его дигидрохлорид (В2) по следующей методике:

- 10 2-[(1E)-1-(2-{6-метил-5Н-[1,2,4]триазино[5,6-*b*]индол-3-ил}гидразин-1-илиден)пропил]пиридин (30 мг, 0,09 ммоль) суспендировали в метаноле (0,6 мл), затем по каплям добавляли НСl в этаноле (1,04 экв., 1,25 М, 75 мкл). После растворения всего твердого вещества вновь добавляли НСl в этаноле (2,08 экв., 1,25 М, 150 мкл) и этанол (0,6
- 15 мл). Появился светло-коричневый осадок. Суспензию выдерживали при -10 °С в течение 3 часов, затем твердое вещество отфильтровывали, промывали холодным этанолом и сушили. Продукт представлял собой ярко-желтое твердое вещество (10 мг). ЖХ показала только один изомер, второстепенный изомер не обнаруживается после превращения продукта в его соль с НСl.

*Пример 8*

- 20 Соединения С1 превращали в его дигидрохлорид С2 по следующей методике: 2-[(1E)-1-(2-{6-метил-5Н-[1,2,4]триазино[5,6- *b*]индол-3-ил}гидразин-1-илиден)пропил]пиридин (30 мг, 0,09 ммоль) суспендировали в метаноле (0,6 мл), затем по каплям добавляли НСl в этаноле (1,04 экв., 1,25 М, 75 мкл). После растворения всего твердого вещества вновь добавляли НСl в этаноле (2,08 экв., 1,25 М, 150 мкл) и этанол (0,6 мл). Продукт не выпадал
- 25 в осадок немедленно, а только после выдерживания суспензии при -10 оС в течение 3 часов. Твердое вещество отфильтровывали, промывали холодным этанолом и сушили. Продукт представлял собой ярко-желтое твердое вещество (20 мг). ЖХ показала только один изомер (E), второстепенный изомер (Z) не обнаруживается после превращения продукта в его соль с НСl.

- 30 **Описание характеристик**

Монокристалльный рентгеноструктурный анализ показал, что E-изомер преобладает в твердом состоянии.

Монокристалльный рентгеноструктурный анализ проводили в SARomics Biostructures AB, Швеция. Кристаллы соединения A1 размером приблизительно 100 x 30 мкм собирали в стандартных криопетлях типа, обычно используемого для кристаллов белка, погружали в парафиновое масло и мгновенно охлаждали в жидком азоте. Данные собирали при 100 К на станции I911-3 в MAX-lab ( $\lambda = 0,9198 \text{ \AA}$ ), оснащенной детектором mar CCD 225 мм.

Размер луча составлял 50 x 50 мкм. Результаты рентгеноструктурного анализа подтверждают, что соединение A1 представляет собой E-изомер гидразона.

10 Прогнозируемая структура показана на фиг. 2b, где N обозначает атомы азота, H обозначает атомы водорода, Cl обозначает хлорид-ионы и H<sub>2</sub>O обозначает молекулы воды.

Все испытания проводились с использованием эталонного стандарта, и все анализы согласуются с предполагаемой структурой.

#### 15 *Заключение*

Содержание воды в исходном соединении A, составлявшее 4-7%, было приемлемым, несмотря на то, что соединение продукта A2 легко гидролизуеться в водных растворителях.

В маточном растворе отсутствовали следы изомера, что показывает, что применяемое условие осаждения превращает Z-изомер в целевой E-изомер. Предпочтительно, образование соли должно проводиться в течение нескольких часов, так как продукт чувствителен к действию кислоты.

20 Работа по разработке композиции была начата с испытания на стабильность в водном растворителе и оценки эксципиентов, обсуждаемых выше. Исходя из этих результатов, разработка композиции продолжилась в отношении оптимизации состава (т. е., лекарственное вещество - осадок сокристалла этанола - концентрация и тип и количество наполнителя) в отношении воздействия на образование примеси и растворимость лекарственного продукта (т. е., дигидрохлоридной соли, например соединения A2). В результате оптимизации количество свободного основания (соединение A) на флакон было увеличено со 100 до 160 мг.

#### 30 *Пример 9 Цитотоксическая активность*

Цитотоксическая активность, выраженная как коэффициент выживаемости (IC50), соединения А показана в различных линиях клеток (фиг. 3) и первичных культурах опухолей человека (таблица 5). Флуориметрический анализ цитотоксичности в микрокультурах (FMCA), (Lindhagen et al., 2008), использовали для измерения

5 цитотоксического действия соединений в различных линиях клеток и первичных культурах опухолей человека. Клетки высевали в содержащие лекарственное средство 384-луночные планшеты с использованием пипетирующего робота Precision 2000 (Bio-Tek Instruments Inc., Уинуски, Вермонт). Планшеты инкубировали в течение 72 ч и затем переносили в интегрированную систему HTS SAGIAN Core System, состоящую из робота

10 ORCA (Beckman Coulter) с инкубатором в CO<sub>2</sub> (Cytomat 2C, Kendro, Соллентуна, Швеция), модуля дозатора (Multidrop 384, Titertek, Хантсвилл, Алабама), промывочного модуля (ELx 405, Bio-Tek Instruments Inc), станции для снятия крышек, модуля для хранения планшета, считывателя штрих-кодов (Beckman Coulter), жидкостного манипулятора (Biomek 2000, Beckman Coulter) и многофункционального считывателя (FLUOstar Optima, BMG Labtech

15 GmbH, Оффенбург, Германия) для автоматизированного FMCA.

Анализировали различные линии клеток (например, клетки Т-клеточного лейкоза CCRF-CEM, множественной миеломы RPMI-8226, карциномы яичника A2780, рака головы и шеи FaDu (плоскоклеточная карцинома), колоректального рака HT29, рака молочной железы MCF7 и лейкоза HL-60), а также панели первичных культур опухолевых клеток человека

20 (таблица 5) (рака толстой кишки, желудочно-кишечного тракта, почки, аппендикса, тонкой кишки и поджелудочной железы, а также псевдомиксомы брюшной полости). Результаты показывают противораковую активность широкого спектра соединения А, как показано на графике зависимости действия от концентрации (фиг. 3).

#### *Пример 10*

25 Авторы также поставили задачу охарактеризовать активность соединений А, В и С в линиях клеток, представляющих рак разного происхождения. Конкретные использованные анализы и выводы в отношении оценки механизма были ранее подробно описаны (Zhang et al. 2014). Соединения А, В и С (см. фиг. 4) оценивали на цитотоксичность, выраженную как коэффициент выживаемости (SI), в шести линиях

30 опухолевых клеток человека, используя флуориметрический анализ цитотоксичности в микрокультурах (FMCA) на основе клеток, как было подробно описано ранее (Lindhagen et

al, 2008). Метод основан на измерении флуоресцентного флуоресцеина, образуемого при гидролизе FDA (диацетата флуоресцеина) жизнеспособными клетками с интактной плазматической мембраной. Флуоресценция пропорциональна числу интактных жизнеспособных клеток.

## 5 Материалы и методы

### *Культура клеток*

Линии клеток культивировали в соответствующей клеточной среде, рекомендованной поставщиком. Среда содержала добавки 10% инактивированной теплом фетальной бычьей сыворотки, 2 ммоль/л L-глутамина, 100 мкг/мл стрептомицина и 100 ед./мл пенициллина (все от Sigma-Aldrich). Линию клеток культивировали при 37 °C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>.

### *Измерение цитотоксической активности*

Анализ FMCA кратко: 2500 клеток на лунку высевали в 384-луночные микропланшеты и инкубировали в течение ночи перед обработкой соединениями. Соединения добавляли с помощью акустического переноса жидкости (Echo 550, LabCyte). Планшеты инкубировали при 37 °C в течение 72 ч, затем промывали и добавляли FDA в лунки с последующей инкубацией в течение 50 мин при 37 °C. Флуоресценцию, пропорциональную количеству живых клеток в каждой лунке, измеряли при 485/520 нм в приборе Fluoroskan (Labsystems, GMI, Рамси, Миннесота). Выживаемость клеток представлена в виде коэффициента выживаемости (SI), определяемого как значение флуоресценции в обработанных соединением лунках, анализируемое как процент от значения в контрольных лунках за вычетом значений для холостой пробы. Критерии качества включали соотношение сигнал/холостая проба > 10 и коэффициент вариации (CV) в контрольных лунках и лунках с холостой пробой <30%. Graph Pad Prism (Сан-Диего, Калифорния, США). Все эксперименты выполнялись дважды, и каждую концентрацию оценивали четырежды в каждом эксперименте. Соединения (А, В и С) разбавляли ДМСО (диметилсульфоксидом), 5 мМ.

**Таблица 5.** IC<sub>50</sub> в панелях различных первичных культур опухолевых клеток человека

<b>Заболевание</b>	<b>Количество проанализированных пациентов</b>	<b>IC<sub>50</sub> мкМ</b>
РМР*	50	9,4
Колоректальный**	25	11
Желудочно-кишечного тракта	9	6,9
Почки	13	164
Мезотелиома	7	12
Аппендикса	4	21
Тонкой кишки	1	5,4
Яичника	30	5,7
Поджелудочной железы	1	6,0

*\* Псевдомиксома брюшной полости, \*\* Колоректальный рак, хирургические образцы, полученные при максимальной циторедуктивной хирургии и перитонэктомий*

### **Результаты и обсуждение**

Исследованные соединения (А, В и С) показали сильную активность в отношении широкого спектра линий раковых клеток, см. таблицу 6 и фиг. 4. Были выбраны линии клеток, охватывающие широкий спектр типов рака, представляющие как гематологические, так и солидные опухоли (таблица 6).

Эти результаты ясно показывают, что соединения А, В и С эффективны против нескольких различных линий опухолевых клеток, включая карциному толстой кишки, аденокарциному шейки матки, гепатоклеточную карциному, острый лимфобластный лейкоз и острый моноцитарный лейкоз.

Представленные в настоящем документе результаты ясно показывают, что соединения А, В и С эффективны против нескольких различных линий опухолевых клеток, включая

карциному толстой кишки, аденокарциному шейки матки, гепатоклеточную карциному, острый лимфобластный лейкоз и острый моноцитарный лейкоз.

**Таблица 6.** IC<sub>50</sub> для соединений А, В и С в шести линиях опухолевых клеток человека.

Линия клеток	Происхождение	IC <sub>50</sub> Соединение А	IC <sub>50</sub> Соединение В	IC <sub>50</sub> Соединение С	5 10
HCT116	Карцинома толстой кишки	прибл. 1 мкМ	прибл. 1 мкМ	прибл. 1 мкМ	
RKO	Карцинома толстой кишки	< 250 нМ	< 250 нМ	< 250 нМ	
HeLa	Аденокарцинома шейки матки	прибл. 20 мкМ	прибл. 20 мкМ	прибл. 10 мкМ	10
HepG2	Гепатоклеточная карцинома	< 250 нМ	< 250 нМ	< 250 нМ	
CCRF-CEM	Острый лимфобластный лейкоз	< 250 нМ	< 250 нМ	< 250 нМ	
THP-1	Острый моноцитарный лейкоз	< 250 нМ	< 250 нМ	< 250 нМ	

15

Хотя конкретные варианты осуществления подробно обсуждаются в настоящем документе, такое обсуждение приводится в качестве примера исключительно в иллюстративных целях и не предназначено для ограничения объема прилагаемой формулы изобретения, которая приведена ниже. В частности, автор предполагает, что в изобретение могут быть внесены различные замены, изменения и модификации без отклонения его от сущности и объема, как определено формулой изобретения.

---

## Цитируемые источники

Eshba *et al.* *Synthesis of some substituted-1,2,4-triazino[5,6-b]indole derivatives as potential antiviral and anticancer agents.* Pharmazie Vol. 42, No. 10, 1987; 664-666.

Lindhagen E, Nygren P, Larsson R (2008) The fluorometric microculture cytotoxicity assay.

5 Nature Protocls 3: 1364-1369.

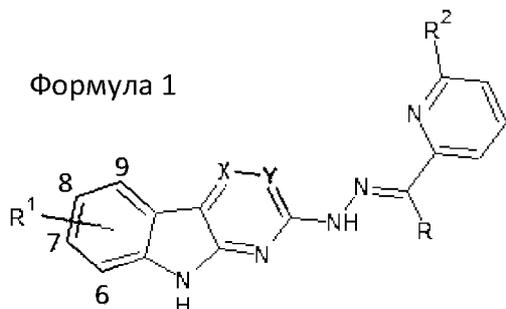
Kgokong JL, Smith PP, Matsabisa GM (2005) Bioorg Med Chem. 13(8):2935-42).

Zhang X *et al.* (2014) Induction of mitochondrial dysfunction as a strategy for targeting tumor cells in metabolically compromised microenvironments. Nature communications 5:3295.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция для применения при лечении рака, содержащая фармацевтически активное соединение общей формулы 1 или его фармацевтически приемлемую соль,

Формула 1



5

где

R представляет собой H или метил, или метилен, замещенный линейным или разветвленным C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкилом,

10 R<sup>1</sup> выбран из группы, состоящей из H, линейного или разветвленного C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкила, метокси, метокси, замещенного 1-3 атомами фтора, бромида, галогена;

R<sup>2</sup> представляет собой H или линейный или разветвленный C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил;

X представляет собой CH или N;

15 Y представляет собой CH или N, и где по меньшей мере 95 масс.% (масс./масс.) фармакологически активного соединения или его фармацевтически приемлемой соли находится в форме E-изомера.

2. Фармацевтическая композиция по п. 1, где фармакологически активное соединение представляет собой соль в кристаллической форме.

3. Фармацевтическая композиция по п. 2, где соль представляет собой дигидрохлорид.

20 4. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-3, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый эксципиент в концентрации от 0,1 до 10% (масс./об.).

5. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-4, стабильная в течение по меньшей мере 12 месяцев.

6. Способ получения фармацевтической композиции по любому из пп. 1-5, включающий следующие стадии:

i. обеспечение раствора соединения общей формулы 1 в виде свободного основания,

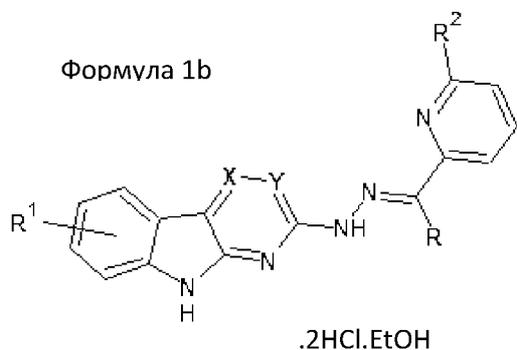
5 ii. взаимодействие раствора с соляной кислотой в этаноле в количествах, достаточных для превращения соединения общей формулы 1 в дигидрохлоридную соль, где дигидрохлоридная соль спонтанно выпадает в осадок;

iii. очистка осадка, содержащего дигидрохлоридную соль, полученную на стадии (ii), от растворителя;

10 iv. растворение дигидрохлоридной соли со стадии (iii) в водном растворителе, необязательно содержащем фармацевтически приемлемый эксципиент, и

v. лиофилизация смеси с получением лиофилизованного порошка или осадка.

7. Осадок, содержащий соединение общей формулы 1b,



где R представляет собой H или метил, или метилен, замещенный линейным или разветвленным C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкилом,

R<sup>1</sup> выбран из группы, состоящей из H, линейного или разветвленного C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкила, метокси, метокси, замещенного 1-3 атомами фтора, бромида, галогена;

20 R<sup>2</sup> представляет собой H или линейный или разветвленный C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил;

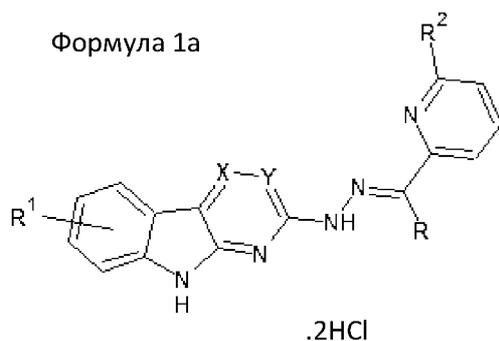
X представляет собой CH или N;

Y представляет собой CH или N, и где по меньшей мере 95 масс.% (масс./масс.) соединения 1b находится в форме E-изомера.

8. Способ получения осадка дигидрохлоридной соли по п. 7, включающий стадии i) - ii) и необязательно стадию iii) по п. 6.

9. Осадок дигидрохлоридной соли по п. 7, где содержание остаточного этанола составляет от 2 до 20 масс.% относительно массы осадка дигидрохлоридной соли.

5 10. Лиофилизат, содержащий соединение общей формулы 1a,



где R представляет собой H или метил, или метилен, замещенный линейным или разветвленным C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкилом,

10 R<sup>1</sup> выбран из группы, состоящей из H, линейного или разветвленного C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкила, метокси, метокси, замещенного 1-3 атомами фтора, бромида, галогена;

R<sup>2</sup> представляет собой H или линейный или разветвленный C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил;

X представляет собой CH или N;

Y представляет собой CH или N, и где по меньшей мере 95 масс.% (масс./масс.) соединения 1a находится в форме E-изомера.

15 11. Способ получения лиофилизата по п. 10, включающий следующие стадии:

i. растворение осадка дигидрохлоридной соли формулы 1b в водном растворителе, необязательно содержащем фармацевтически приемлемый эксципиент, и

ii. лиофилизация смеси с получением лиофилизованного порошка или осадка.

20 12. Осадок дигидрохлоридной соли по п. 7 или п. 9 и лиофилизат по п. 10 для применения в фармацевтической композиции.

13. Фармацевтический препарат, подходящий для инфузий, полученный путем разведения фармацевтической композиции или фармацевтически приемлемых солей по

любому из пп. 1-5, 7, 9 и 10 в водном растворителе с конечной концентрацией, составляющей от 0,5 до 30 мг/мл.

14. Фармацевтический препарат по п. 13, где рН составляет от 0,5 до 4.

15. Фармацевтическая композиция, фармацевтически приемлемые соли или препарат по любому из пп. 1-5, 7, 9, 10, 13 и 14 для применения при лечении рака.

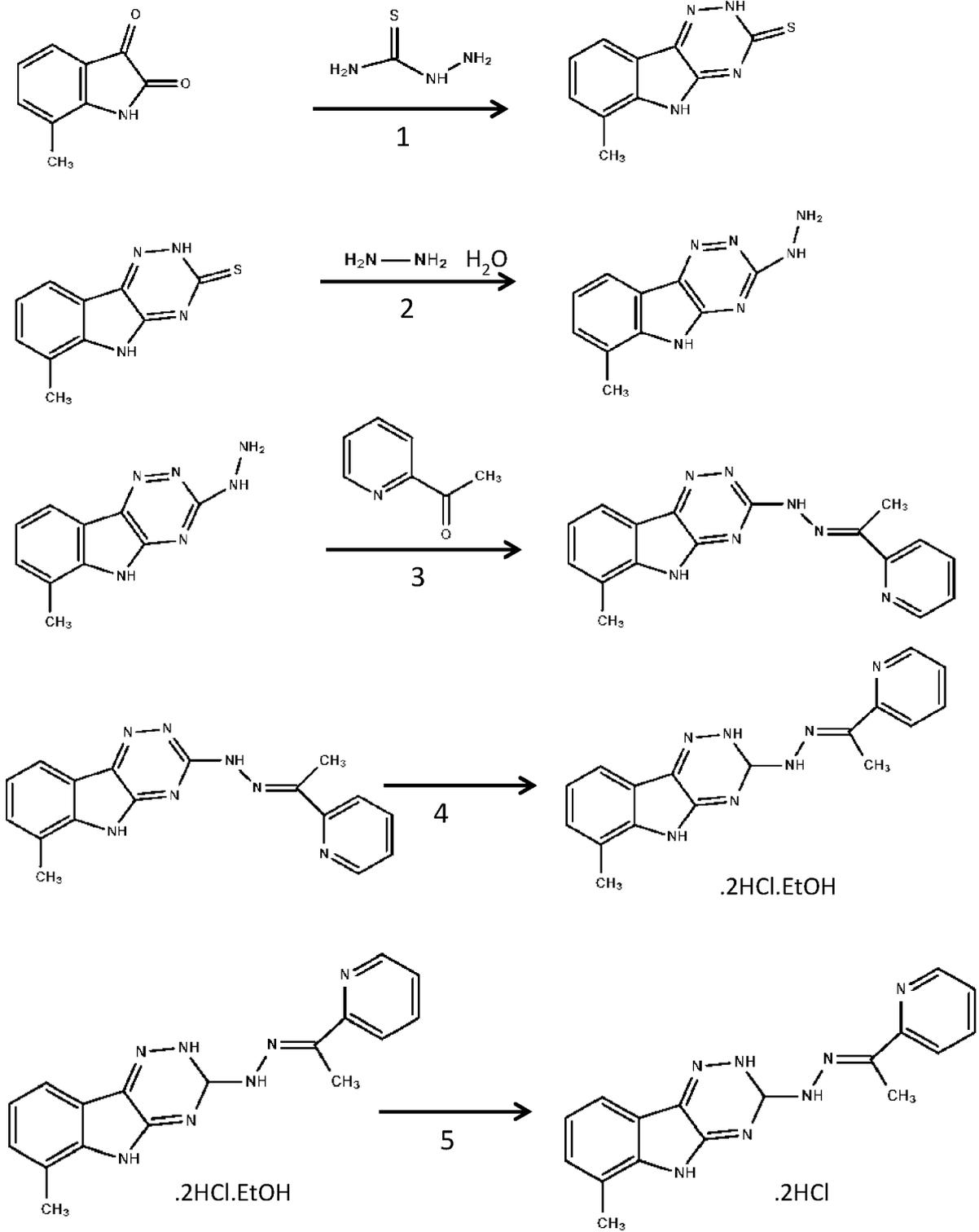
16. Фармацевтическая композиция, фармацевтически приемлемые соли или препарат по п. 15, где рак представляет собой солидную, жидкую или гематологическую опухоль.

17. Способ лечения рака у субъекта, где субъекту, нуждающемуся в таком лечении, вводят эффективное количество фармацевтического препарата или композиции, содержащей соединение, или его фармацевтически приемлемые соли, по любому из пп. 1-5, 7, 9, 10, 12, 13 и 14.

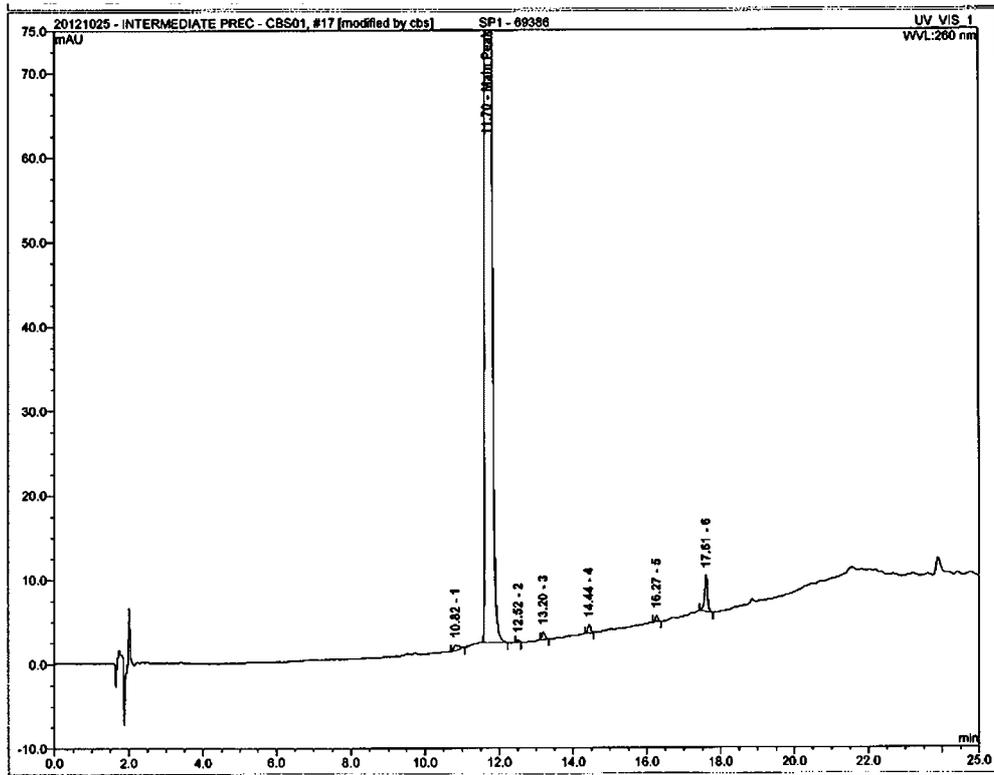
18. Способ лечения рака по п. 17 в комбинации с другим противораковым лечением.

19. Способ лечения рака по п. 17 или п. 18, где эффективная доза составляет от 0,01 до 10 мг/кг массы тела, предпочтительно от 0,1 до 5 мг/кг массы тела и более предпочтительно от 1 до 4 мг/кг массы тела.

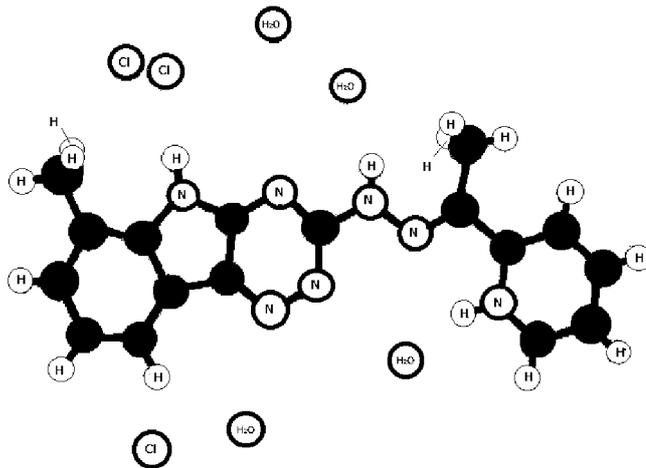
Фиг. 1



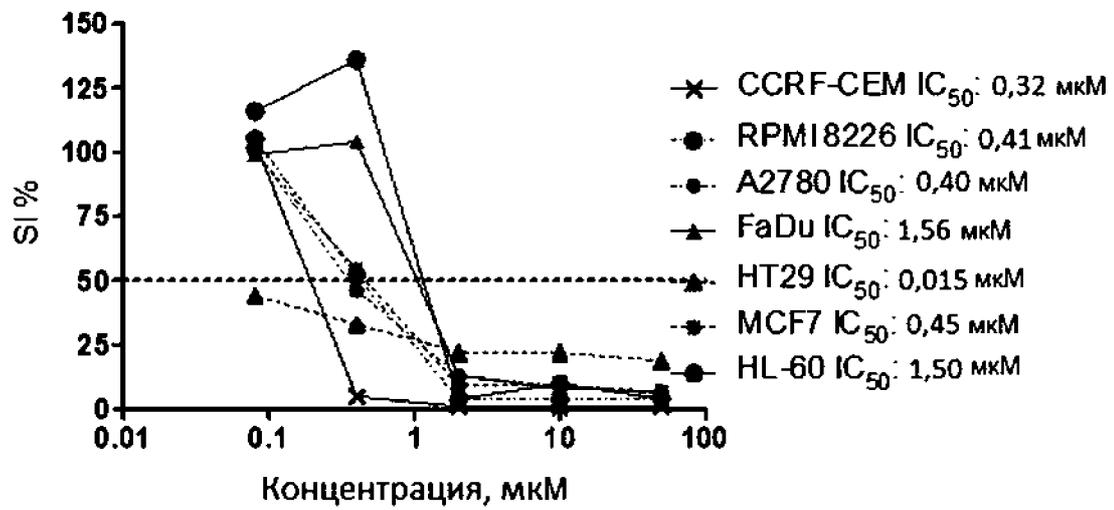
Фиг. 2А



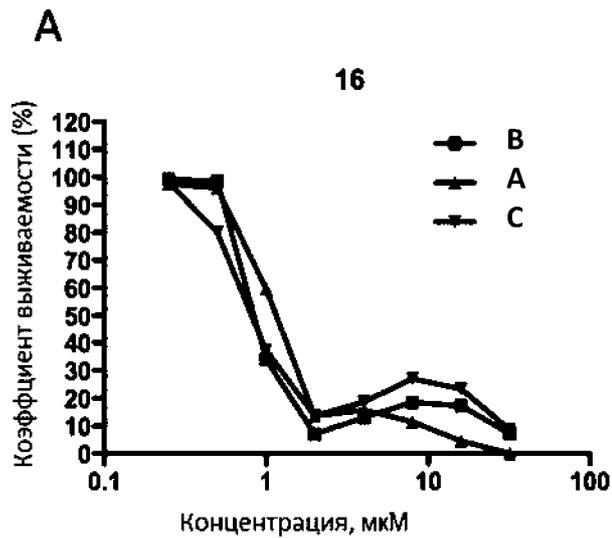
Фиг. 2В



ФИГ. 3



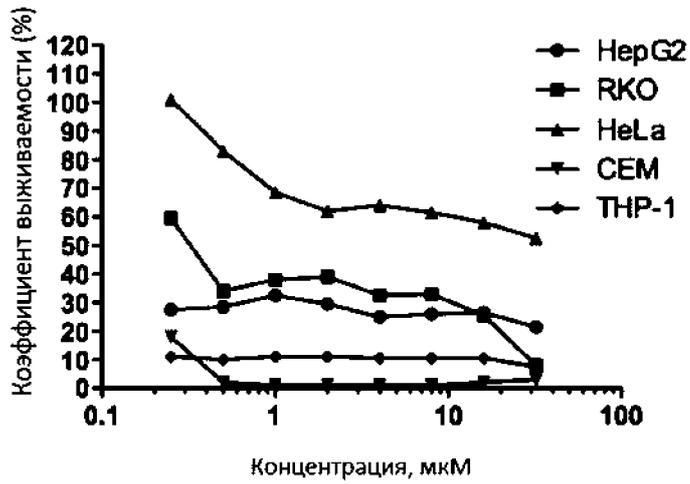
ФИГ. 4



B



C



D

