

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 044843

(13) B1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2023.10.05

(21) Номер заявки  
202192903

(22) Дата подачи заявки  
2020.04.23

(51) Int. Cl. C07D 413/10 (2006.01)  
A61K 31/191 (2006.01)  
A61K 31/5377 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
C07C 57/15 (2006.01)

## (54) КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ ФОРМА ИНГИБИТОРА PLK4

(31) 62/837,858

(32) 2019.04.24

(33) US

(43) 2022.02.09

(86) PCT/CA2020/050535

(87) WO 2020/215155 2020.10.29

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
ЮНИВЕРСИТИ ХЕЛС НЕТУОРК  
(CA)

(72) Изобретатель:  
Ли Сзе-Ван, Брей Марк Роберт (CA)

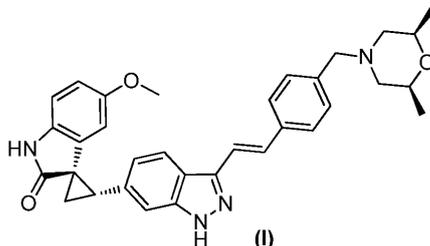
(74) Представитель:  
Костюшенкова М.Ю., Угрюмов В.М.,  
Христофоров А.А., Пармонова К.В.,  
Джермакян Р.В., Гизатуллина Е.М.,  
Гизатуллин Ш.Ф., Строкова О.В. (RU)

(56) EP-A1-3057965

SAMPSON, P.B. et al., "The  
Discovery of Polo-Like Kinase 4 Inhibitors:  
Identification of (1R,2S)-2-(3-((E)-4-(((cis)-2,6-  
Dimethylmorpholino)methyl)styryl)-1H-indazol-6-  
yl)-5'-methoxyspiro[cyclopropane-1,3'-indolin]-2'-  
one (CFI-400945) as a Potent, Orally Active  
Antitumor Agent". Journal of Medicinal Chemistry, 27  
May 2014 (27-05-2014), Vol. 58, pp. 147-169, whole  
document, particularly, Table 2, page 153 and Example  
48, page 165

WO-A1-2010115279

(57) Раскрыта кристаллическая форма S4 fumarата соединения (I), представленного следующей структурной формулой:



Молярное соотношение между соединением (I) и фумаровой кислотой составляет 1,0:1:0. Кристаллическая форма S4, характеризующаяся порошковой рентгеновской дифрактограммой, включает в себя пики при 6,6°, 9,8°, 16,3°, 21,1°, 28,7° и 30,2° ± 0,2 в 2θ.

B1

044843

044843

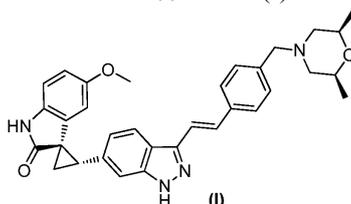
B1

### Ссылка на родственные заявки

По изобретению испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на патент США № 62/837858, поданной 24 апреля 2019 г. Все содержание вышеупомянутой заявки включено в настоящий документ посредством ссылки.

### Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Семейство polo-подобных киназ (PLK) серин/треониновых киназ включает в себя по меньшей мере четыре известных представителя: PLK1, PLK2 (также известный как Snk), PLK3 (также известный как Fnk или Prk) и PLK4 (также известный как Sak). Средства, ингибирующие PLK4, могут лечить рак. Ряд сильнодействующих ингибиторов PLK4 раскрыт в патентах США № 8263596; 8481525 и 8481533 (все идеи которых включены в настоящий документ посредством ссылки). Структура одного ингибитора, раскрытого в этих патентах, показана ниже как соединение (I):



Существует потребность в солевых формах этого соединения, которые являются кристаллическими и в остальном обладают физическими свойствами, пригодными для промышленного производства. Также существует потребность в фармацевтических составах, в которых это потенциальное лекарственное средство является стабильным и эффективно доставляется пациенту.

В этом контексте патент США № 9884855 раскрывает несколько кристаллических форм 1:1 фумарата соединения (I), включая в себя форму D, в качестве потенциальных кандидатов в противораковые лекарственные средства. Полное описание патента США № 9884855 включено в настоящий документ посредством ссылки. "1:1" относится к молярному соотношению между фумаровой кислотой и соединением (I).

### Краткое раскрытие настоящего изобретения

Форма D была выбрана для промышленного масштабирования, поскольку, как раскрыто в патенте США № 9884855, она может быть получена в кристаллическом состоянии, имеет низкую гигроскопичность и является эффективным противораковым средством с хорошей растворимостью и благоприятными фармакокинетическими свойствами. Однако позже было обнаружено, что получение формы D в крупномасштабном производственном процессе привело к смеси различных кристаллических форм (смотрите пример 3).

В настоящее время открыта новая кристаллическая форма, именуемая "S4", которая обладает полезными свойствами формы D (например, характеризуется низкой гигроскопичностью и хорошей растворимостью, а также обладает превосходными фармакокинетическими свойствами (смотрите примеры 6 и 7). Что еще более важно, она преодолевает проблемы, связанные с формой D. В частности, форма S4 может быть получена с хорошим выходом и высокой чистотой, и она поддается промышленному масштабированию (смотрите примеры 4 и 5).

Следовательно, в настоящем изобретении представлен фумарат соединения (I), в которой молярное соотношение между соединением (I) и фумаровой кислотой составляет 1:1, и фумарат включает в себя (представляет собой) кристаллическую форму S4, охарактеризованную порошковой рентгеновской дифрактограммой (XRPD), которая содержит пики при 6,6°, 9,8°, 16,3°, 21,1°, 28,7° и 30,2° ± 0,2 в 2θ.

В настоящем изобретении также представлена фармацевтическая композиция, содержащая кристаллическую форму S4 соли фумаровой кислоты 1:1 соединения (I) и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

В настоящем изобретении также представлен способ получения кристаллической формы S4 соли фумаровой кислоты соединения (I) (1:1). Способ предусматривает растворение фумаровой кислоты и соединения (I) в растворителе проб, содержащем 2-бутанон, воду и этанол, с образованием раствора для кристаллизации, а затем осаждение кристаллической формы S4 из раствора для кристаллизации, причем молярное соотношение между соединением (I) и фумаровой кислоты в растворителе проб составляет от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:1,3; и молярное соотношение между соединением (I) и фумаровой кислоты в фумарате соединения (I) составляет 1:1. Согласно одному аспекту растворение фумаровой кислоты и соединения (I) происходит при повышенной температуре, а осаждение кристаллической формы S4 из раствора для кристаллизации происходит путем охлаждения и/или добавления метилциклогексана с охлаждением.

Также представлен способ лечения рака. Способ предусматривает введение субъекту, страдающему раком, эффективного количества формы S4 соли фумаровой кислоты соединения (I) (1:1).

Также представлено использование кристаллической формы S4 соли фумаровой кислоты соединения (I) для производства лекарственного средства для лечения рака.

Также представлена кристаллическая форма S4 соли фумаровой кислоты соединения (I) для приме-

нения при лечении рака.

#### **Краткое описание графических материалов**

На фиг. 1 представлена порошковая рентгеновская дифрактограмма (XRPD) кристаллической формы S4 соли фумаровой кислоты соединения (I) (1:1) из 100 г продукта.

На фиг. 2 порошковая рентгеновская дифрактограмма (XRPD) для кристаллической формы S4 соли фумаровой кислоты соединения (I) (1:1) из крупномасштабного производства в примере 5.

На фиг. 3 показано нормированное по дозе воздействие после дозированного введения формы D и формы S4.

#### **Подробное раскрытие настоящего изобретения**

В настоящем изобретении представлена новая кристаллическая форма S4 фумарата соединения (I) (1:1) и соответствующие фармацевтические композиции. В настоящем изобретении также представлен новый способ получения кристаллической формы S4 воспроизводимым и масштабируемым образом с превосходным выходом и чистотой. Кроме того, в настоящем изобретении представлен способ лечения рака.

Кристаллические формы фумарата соединения (I) (1:1).

Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере определенный процент по массе фумарата соединения (I) (1:1) находится в форме монокристалла. Конкретные массовые проценты включают в себя 70, 72, 75, 77, 80, 82, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,9% или диапазон массовых процентов 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-100%, 70-80%, 80-90%, 90-100%. Например, согласно одному варианту осуществления по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 90 или 99%) по массе фумарата соединения (I) (1:1) находится в форме монокристалла. Следует понимать, что все значения и диапазоны между этими значениями и диапазонами охватываются настоящим изобретением.

Используемый в настоящем документе термин "кристаллический" относится к твердому телу, имеющему кристаллическую структуру, в которой отдельные молекулы характеризуются высокоомогенной регулярной фиксированной химической конфигурацией. Кристаллический фумарат соединения (I) (1:1) может представлять собой кристаллы монокристаллической формы фумарата соединения (I) (1:1) или смесь кристаллов различных монокристаллических форм. Монокристаллическая форма означает фумарат соединения (I) (1:1) в виде монокристалла или множества кристаллов, в которых каждый кристалл характеризуется одинаковой кристаллической формой.

Когда определенный процент по массе фумарата соединения (I) (1:1) находится в монокристаллической форме, остаток фумарата представляет собой некоторую комбинацию аморфного фумарата и/или одной или нескольких других кристаллических форм фумарата соединения (I) (1:1), исключая монокристаллическую форму. Когда кристаллический фумарат соединения (I) (1:1) определяется как определенный процент одной конкретной кристаллической формы фумарата соединения (I) (1:1), остаток состоит из аморфной формы и/или кристаллических форм, отличной от одной или нескольких указанных форм. Примеры монокристаллической формы включают в себя форму S4 фумарата соединения (I) (1:1), характеризующуюся одним или несколькими свойствами, как обсуждается в настоящем документе.

Согласно другому варианту осуществления менее чем 30, 25, 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5% по массе фумарата соединения (I) (1:1) представляет собой кристаллическую форму D. Количество формы S4 относительно формы D в образце может быть оценено путем приготовления серии смесей формы S4 и формы D с известными массовыми соотношениями и получения спектра XRPD для каждого. Относительные количества формы S4 к форме D в образце оценивают путем выбора одного или нескольких характеристических пиков формы S4 и формы D и соотношения их относительных интенсивностей в XRPD образца с их относительными интенсивностями в XRPD смеси. Характеристические пики XRPD для кристаллической формы D представлены в табл. 4 патента США № 9884855.

Фумарат соединения (I) (1:1) характеризуется чистотой, составляющей по меньшей мере 60, 70, 80, 90, 99 или 99,9% по массе относительно других стереоизомеров, т.е. массы всех стереоизомеров.

Получение кристаллической формы S4 фумарата соединения (I) (1:1).

Твердую форму фумарата соединения (I) (1:1) можно получить, например, медленным испарением, медленным охлаждением и осаждением антирастворителем. В настоящем изобретении представлена новая процедура кристаллизации для получения кристаллической формы S4 воспроизводимым и масштабируемым образом с улучшенным выходом и чистотой.

Используемый в настоящем документе термин "антирастворитель" относится к растворителю, в котором фумарат соединения (I) (1:1) характеризуется низкой растворимостью, вызывая осаждение фумарата из раствора в форме мелких порошков или кристаллов.

Альтернативно, фумарат соединения (I) (1:1) может быть перекристаллизован из подходящего растворителя с добавлением затравочных кристаллов или без них.

Согласно одному варианту осуществления кристаллическая форма S4 фумарата соединения (I) (1:1) может быть получена растворением фумаровой кислоты и соединения (I) в растворителе для проб, содержащем 2-бутанол, воду и этанол, с образованием раствора для кристаллизации, а затем осаждения кристаллической формы S4 из раствора для кристаллизации, причем молярное соотношение между со-

единением (I) и фумаровой кислотой в растворителе проб составляет от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:1,3; а молярное соотношение между соединением (I) и фумаровой кислотой в фумарате соединения (I) составляет 1:1. Согласно одному аспекту этого варианта осуществления растворение фумаровой кислоты и соединения (I) происходит при повышенной температуре, а осаждение кристаллической формы S4 из раствора для кристаллизации происходит путем охлаждения и/или добавления метилциклогексана с охлаждением.

Согласно другому варианту осуществления кристаллическую форму S4 фумарата соединения (I) (1:1) получают путем: (i) растворения соединения (I) в смеси 2-бутанона и воды при повышенной температуре с образованием раствора соединения (I); (ii) растворения фумаровой кислоты в этаноле при повышенной температуре с образованием раствора фумаровой кислоты; (iii) добавления раствора фумаровой кислоты к раствору соединения (I) при повышенной температуре с образованием раствора для кристаллизации; (iv) необязательно добавления затравочных кристаллов при повышенной температуре к раствору для кристаллизации и (v) снижения температуры раствора для кристаллизации для осаждения кристаллической формы S4. Согласно одному аспекту этого варианта осуществления объемное отношение между 2-бутанонам и водой составляет от 80:20 до 98:2 (например, от 90:10 до 98:2), а объемные отношения 2-бутанона/воды к этанолу и метилциклогексану составляют от 6-7 до 4-5 до 11-22; повышенная температура составляет от 45 до 55°C, а пониженная температура составляет от 20 до 30°C. Согласно другому аспекту этого варианта осуществления способ дополнительно предусматривает добавление метилциклогексана при пониженной температуре к раствору для кристаллизации для осаждения кристаллической формы S4.

Согласно одному конкретному аспекту пониженная температура составляет от 20 до 30°C. Согласно другому конкретному аспекту температура раствора для кристаллизации дополнительно снижается для осаждения кристаллической формы S4. Согласно более конкретному аспекту дальнейшее снижение температуры составляет от 0 до 10°C.

Характеристика монокристаллической формы S4 фумарата соединения (I) (1:1).

Согласно одному варианту осуществления форма S4 демонстрирует уникальную диаграмму XRPD с острыми пиками, соответствующими угловым положениям пиков в 2 $\theta$ , и плоской базовой линией, что указывает на высококристаллический материал (смотрите фиг. 1). Дифрактограмма XRPD получена от источника излучения из меди (CuK $\alpha$ ;  $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$ ), работающего при 40 В/30 мА. Согласно одному конкретному варианту осуществления форма S4 представляет собой монокристаллическую форму фумарата соединения (I) (1:1), характеризующуюся порошковой рентгеновской дифрактограммой, которая включает в себя пики при 6,6, 9,8, 16,3, 21,1, 28,7 и 30,2°. Согласно другому конкретному варианту осуществления форма S4 характеризуется порошковой рентгеновской дифрактограммой, которая включает в себя пики при 6,6, 9,8, 16,3, 21,1, 28,7, 29,4 и 30,2°. Согласно другому конкретному варианту осуществления форма S4 характеризуется порошковой рентгеновской дифрактограммой, которая включает в себя пики при 6,6, 9,8, 13,0, 16,3, 19,5, 21,1, 22,5, 28,7, 29,4 и 30,2°. Согласно еще одному конкретному варианту осуществления форма S4 характеризуется порошковой рентгеновской дифрактограммой, которая включает в себя пики при 6,6, 9,8, 13,0, 16,3, 19,5, 21,1, 22,5, 22,9, 23,9, 28,7, 29,4 и 30,2°. Согласно еще одному конкретному варианту осуществления форма S4 характеризуется порошковой рентгеновской дифрактограммой, которая включает в себя пики при 6,6, 9,8, 11,6, 13,0, 16,3, 17,1, 19,5, 21,1, 21,5, 22,0, 22,5, 22,9, 23,9, 24,3, 28,7, 29,4 и 30,2°.

Согласно еще одному конкретному варианту осуществления форма S4 характеризуется порошковой рентгеновской дифрактограммой, по существу аналогичной фиг. 1.

Используемый в настоящем документе термин порошковая рентгеновская дифрактограмма "по существу аналогична таковой на [конкретной] фигуре", когда по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% сигналов на двух дифрактограммах являются одинаковыми  $\pm 0,2$  дюйма 2 $\theta$ . При определении "подобия" специалисту в настоящей области техники будет понятно, что могут быть различия в интенсивностях и/или положениях сигналов на дифрактограммах XRPD даже для одной и той же кристаллической формы. Таким образом, специалистам в настоящей области техники будет понятно, что максимальные значения сигнала на дифрактограммах XRPD (в градусах два-тета ( $^{\circ}2\theta$ ), упомянутых в настоящем документе) обычно означают, что указанное значение составляет  $\pm 0,2$  градуса  $2\theta$  от сообщаемого значения, принятая в настоящей области дисперсия, как описано ниже.

В области кристаллографии хорошо известно, что для любой данной формы кристалла угловое положение пика может незначительно изменяться из-за таких факторов, как изменение температуры, смещение образца и наличие или отсутствие внутреннего стандарта. В настоящем изобретении изменчивость углового положения пика составляет  $\pm 0,2$  по  $2\theta$ . Кроме того, относительные интенсивности пиков для данной кристаллической формы могут изменяться из-за различий в размерах кристаллитов и неслучайной ориентации кристаллитов при подготовке образцов для анализа XRPD. В настоящей области техники хорошо известно, что эта изменчивость будет учитывать вышеуказанные факторы, не препятствуя однозначной идентификации кристаллической формы.

Способы лечения.

PLK4, как представитель семейства polo серин/треониновых протеинкиназ, как известно, участвует в клеточной митотической прогрессии. Таким образом, низкомолекулярный ингибитор этого фермента может представлять собой потенциальное противораковое средство.

В настоящем изобретении представлен способ лечения субъекта с заболеванием, которое можно облегчить путем ингибирования PLK4, например, лечение рака или ингибирование роста опухоли, путем введения субъекту эффективного количества формы S4. Как таковая форма S4 ингибирует рост опухоли, индуцируя апоптоз опухолевых клеток или ингибируя пролиферацию опухолевых клеток.

Конкретные формы рака, которые можно лечить описанным способом, включают в себя рак легких, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак головного мозга, нейробластома, рак простаты, меланому, мультиформную глиобластома, рак яичников, лимфому, лейкоз, меланому, саркому, паранеоплазию, остеосаркому, герминому, глиому и мезотелиому. Согласно одному конкретному варианту осуществления рак представляет собой рак легких, рак молочной железы, рак толстой кишки, нейробластома, рак простаты, меланому, мультиформную глиобластома, рак яичников, лимфому, лейкоз, остеосаркому, герминому, глиому, фибросаркому, саркому желудочно-кишечного тракта, фиброзную гистиоцитому, круглоклеточную саркому, синовиальную саркому, рак шейки матки, рак аногенитальной области, рак головы и шеи и рак ротоглотки. Согласно одному конкретному варианту осуществления рак представляет собой рак легких, рак толстой кишки, рак головного мозга, нейробластома, рак простаты, меланому, мультиформную глиобластома или рак яичников. Согласно другому конкретному варианту осуществления рак представляет собой рак легких, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак головного мозга, нейробластома, рак простаты, меланому, мультиформную глиобластома или рак яичников. Согласно другому конкретному варианту осуществления рак представляет собой рак легких, рак молочной железы и рак толстой кишки. Согласно еще одному конкретному варианту осуществления рак представляет собой рак молочной железы. Согласно еще одному конкретному варианту осуществления рак представляет собой рак молочной железы базального подтипа или люминальный рак молочной железы подтипа В. Согласно одному варианту осуществления рак молочной железы базального подтипа представляет собой негативный по ER (рецептор эстрогена), HER2 и PR (рецептор прогестерона) рак молочной железы. Согласно еще одному конкретному варианту осуществления рак представляет собой трижды негативный рак молочной железы. Термин "трижды негативный рак молочной железы" относится к раку молочной железы, при котором тесты на гормоны эстроген, прогестерон и HER2 отрицательны в соответствии с Руководством по клинической практике ASCO/CAP. Согласно некоторым вариантам осуществления трижды негативный рак молочной железы является неоперабельным или метастатическим. Согласно конкретному варианту осуществления описанный выше способ используется для лечения субъекта с раком поджелудочной железы, причем рак поджелудочной железы представляет собой аденокарциному. Согласно другому конкретному варианту осуществления рак поджелудочной железы является гипоксическим. Согласно еще одному конкретному варианту осуществления рак поджелудочной железы не является гипоксическим.

Рак мягких тканей также можно лечить описанным способом. "Рак мягких тканей" представляет собой признанный в настоящей области техники термин, который охватывает опухоли, происходящие из любых мягких тканей тела. Такая мягкая ткань соединяет, поддерживает или окружает различные структуры и органы тела, включая в себя, без ограничения, гладкие мышцы, скелетные мышцы, сухожилия, фиброзные ткани, жировую ткань, кровеносные и лимфатические сосуды, периваскулярную ткань, нервы, мезенхимальные клетки и синовиальные ткани. Таким образом, формы рака мягких тканей могут включать в себя рак жировой ткани, мышечной ткани, нервной ткани, ткани суставов, кровеносных сосудов, лимфатических сосудов и фиброзных тканей. Рак мягких тканей может быть доброкачественным или злокачественным. Обычно злокачественные опухоли мягких тканей называют саркомами или саркомами мягких тканей. Существует множество типов опухолей мягких тканей, включая в себя липому, липобластома, гиберному, липосаркому, лейомиому, лейомиосаркому, рабдомиому, рабдомиосаркому, нейрофибромом, шванному (неврилемому), неврому, злокачественную шванному, нейрофибросаркому, нейрогенную саркому, узловой тендосиновит, синовиальную саркому, гемангиому, гломусную опухоль, гемангиоперицитому, гемангиоэндотелиому, ангиосаркому, саркому Капоши, лимфангиому, фибромом, эластофибромом, поверхностный фиброматоз, фиброзную гистиоцитому, фибросаркому, фиброматоз, возвышающуюся дерматофибросаркому (DFSP), злокачественную фиброзную гистиоцитому (MFH), миксомом, гранулярно-клеточную опухоль, злокачественную мезенхимому, альвеолярную саркому мягких тканей, эпителиоидную саркому, светлоклеточную саркому и десмопластическую мелкоклеточную опухоль. Согласно конкретному варианту осуществления рак мягких тканей представляет собой саркому, выбранную из группы, состоящей из фибросаркомы, желудочно-кишечной саркомы, лейомиосаркомы, дедифференцированной липосаркомы, плеоморфной липосаркомы, злокачественной фиброзной гистиоцитомы, круглоклеточной саркомы и синовиальной саркомы. Термин "эффективное количество" означает количество при введении субъекту, которое приводит к положительным или желаемым результатам, включая в себя клинические результаты, например, ингибирует, подавляет или уменьшает рак (например, как определяется клиническими симптомами или количеством раковых клеток) у субъекта по сравнению с кон-

тролем.

В данном контексте "лечение субъекта с раком" включает в себя достижение, частично или по существу, одного или нескольких из следующих действий: остановка роста рака, уменьшение степени рака (например, уменьшение размера опухоли), ингибирование скорости роста рака, ослабление или улучшение клинического симптома или индикатора, связанного с раком (например, ткани или компоненты воротки), или увеличение продолжительности жизни субъекта; и снижение вероятности рецидива рака.

Используемый в настоящем документе термин "снижение вероятности рецидива рака" означает ингибирование или задержку возврата рака в первичный очаг или рядом с ним и/или во вторичный очаг после периода ремиссии. Это также означает, что рак с меньшей вероятностью вернется при лечении, описанном в настоящем документе, чем при его отсутствии.

Используемый в настоящем документе термин "ремиссия" относится к состоянию рака, при котором клинические симптомы или индикаторы, связанные с раком, исчезли или не могут быть обнаружены, как правило, после успешного лечения субъекта противораковой терапией.

Как правило, эффективное количество соединения по настоящему изобретению варьируется в зависимости от различных факторов, таких как данное лекарственное средство или соединение, фармацевтический состав, способ введения, тип заболевания или нарушения, личность подвергаемого лечению субъекта или хозяина и т.п., но тем не менее может быть определено обычным специалистом в настоящей области техники. Эффективное количество соединения по настоящему изобретению может быть легко определено средним специалистом обычными способами, известными в настоящей области техники.

Согласно одному варианту осуществления эффективное количество фумарата соединения (I) (1:1) находится в диапазоне от приблизительно 0,01 до приблизительно 1000 мг/кг массы тела, альтернативно от приблизительно 0,05 до приблизительно 500 мг/кг массы тела, альтернативно от приблизительно 0,1 до приблизительно 100 мг/кг массы тела, альтернативно от приблизительно 0,1 до приблизительно 15 мг/кг массы тела, альтернативно от приблизительно 1 до приблизительно 5 мг/кг массы тела, а согласно другому варианту осуществления от приблизительно 2 до приблизительно 3 мг/кг массы тела. Квалифицированному специалисту будет понятно, что определенные факторы могут влиять на дозировку, требуемую для эффективного лечения страдающего раком субъекта, и эти факторы включают в себя, без ограничения, тяжесть заболевания или нарушения, предыдущее лечение, общее состояние здоровья и/или возраст субъекта и другие имеющиеся заболевания.

Более того, схема "лечения" субъекта эффективным количеством фумарата соединения (I) по настоящему изобретению может состоять из однократного введения или, альтернативно, включать в себя серию применений. Например, фумарат соединения (I) (1:1) можно вводить по меньшей мере один раз в неделю. Однако согласно другому варианту осуществления соединение можно вводить субъекту приблизительно от одного раза в неделю до одного раза в день для данного лечения. Продолжительность периода лечения зависит от множества факторов, таких как тяжесть заболевания, возраст пациента, концентрация и активность соединений по настоящему изобретению или их комбинации. Также будет понятно, что эффективная доза соединения, используемого для лечения или профилактики, может увеличиваться или уменьшаться в течение определенной схемы лечения или профилактики. Изменения в дозировке могут стать очевидными с помощью стандартных диагностических анализов, известных в настоящей области техники. В некоторых случаях может потребоваться постоянное введение.

"Субъект" представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека, но также может представлять собой животное, нуждающееся в ветеринарном лечении, например, домашние животные (например, собаки, кошки и т.п.), сельскохозяйственные животные (например, коровы, овцы, свиньи, лошади и т.п.) и лабораторные животные (например, крысы, мыши, морские свинки и т.п.).

Соединения по настоящему изобретению можно вводить пациенту в различных формах в зависимости от выбранного пути введения, как будет понятно специалистам в настоящей области техники. Соединения по настоящему изобретению можно вводить, например, пероральным, парентеральным, трансбуккальным, сублингвальным, назальным, ректальным, посредством пластыря, насосным или трансдермальным введением, и фармацевтические композиции, составленные соответственно. Парентеральное введение включает в себя внутривенный, внутрибрюшинный, подкожный, внутримышечный, трансэпителиальный, назальный, внутрилегочный, интратекальный, ректальный и местный способы введения. Парентеральное введение может осуществляться путем непрерывной инфузии в течение выбранного периода времени.

Фармацевтические композиции и способы введения.

Раскрытая в настоящем документе кристаллическая форма S4 фумарата соединения (I) (1:1) может быть подходящим образом включена в фармацевтические композиции для введения субъекту. Согласно одному варианту осуществления в настоящем изобретении предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая форму S4, как описано выше, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель, причем по меньшей мере 80% (предпочтительно 90%, более предпочтительно 99%) по массе соли представляет собой кристаллическую форму S4.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению необязательно включают в себя один

или несколько фармацевтически приемлемых носителей и/или разбавителей для них, таких как лактоза, крахмал, целлюлоза и декстроза. Другие вспомогательные вещества, такие как ароматизаторы; подсластители и консерванты, такие как метил, этил, пропил и бутилпарабены, также могут быть включены. Более полные списки подходящих вспомогательных веществ можно найти в Справочнике по фармацевтическим вспомогательным веществам (5-е изд., Pharmaceutical Press (2005)). Специалист в настоящей области техники должен знать, как приготовить составы, подходящие для различных типов путей введения. Обычные процедуры и ингредиенты для выбора и приготовления подходящих составов описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences (2003 - 20-е издание) и в Фармакопее США: Национальный формуляр (USP 24 NF19), опубликованной в 1999 году. Носители, разбавители и/или вспомогательные вещества являются "приемлемыми" в том смысле, что они совместимы с другими ингредиентами фармацевтической композиции и не вредны для их реципиента.

Как правило, для перорального терапевтического введения соединение по настоящему изобретению может быть включено с вспомогательным веществом и использоваться в форме таблеток для приема внутрь, буккальных таблеток, пастилок, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, облаток и т.п.

Как правило, для парентерального введения растворы соединения по настоящему изобретению обычно могут быть приготовлены в воде, подходящей для смешивания с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Также можно приготовить дисперсии в глицерине, жидких полиэтиленгликолях, ДМСО и их смесях со спиртом или без него и в маслах. В обычных условиях хранения и использования эти препараты содержат консервант, предотвращающий рост микроорганизмов.

Как правило, для инъекций подходят стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки описанного в настоящем документе соединения для немедленного приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций.

Для назального введения соединения по настоящему изобретению могут быть приготовлены в виде аэрозолей, капель, гелей и порошков. Аэрозольные составы, как правило, содержат раствор или мелкую суспензию активного вещества в физиологически приемлемом водном или неводном растворителе и обычно представлены в одно- или многодозовых количествах в стерильной форме в герметичном контейнере, который может иметь форму картриджа или блока для повторного наполнения для использования с распылительным устройством. В качестве альтернативы герметичный контейнер может представлять собой единое дозирующее устройство, такое как назальный ингалятор для однократной дозы или дозатор для аэрозолей, снабженный дозирующим клапаном, который предназначен для утилизации после использования. Если лекарственная форма включает в себя распылитель аэрозоля, она будет содержать пропеллент, который может представлять собой сжатый газ, такой как сжатый воздух, или органический пропеллент, такой как фторхлоруглерод. Аэрозольные лекарственные формы также могут иметь форму помпы-распылителя.

Для трансбуккального или сублингвального введения соединения по настоящему изобретению могут быть составлены с носителем, таким как сахар, гуммиарабик, трагакант или желатин и глицерин, в виде таблеток, леденцов или пастилок.

Для ректального введения описанные в настоящем документе соединения могут быть приготовлены в форме суппозитория, содержащих обычную основу суппозитория, такую как масло какао.

Изобретение проиллюстрировано следующими примерами, которые никоим образом не предназначены для ограничения.

### Экспериментальная часть

#### Сокращения

Сокращение	Растворитель	Сокращение	Растворитель
MeOH	Метанол	ACN	Ацетонитрил
EtOH	Спирт этиловый	MEK	Бутанон
n-PrOH	1-пропанол	MCH	Метилциклогексан
IPA	Изопропиловый спирт	MTBE	Метил трет-бутиловый эфир
MIBK	4-метил-2-пентанон	DMSO	Диметилсульфоксид
EA	Этилацетат	THF	Тetraгидрофуран
FA	Фумаровая кислота	2Me-THF	2-метилтетрагидрофуран
IPAc	Изопропилацетат		

Единицы	
Полное название	Сокращенное название
Цельсия	С
Градусы	°
Эквиваленты	экв.
Грамм	г
Час	ч
Кельвин	К
Литры	л
Миллиграммы	мг
Миллилитры	мл
Минуты	мин
Миллиампер	мА
Киловольт	кВ
Контроль в процессе	IPC
Относительная влажность	RH
Изменение массы во времени	gpm
Комнатная температура	RT
Секунда	с
Объем	об.
Соотношение объемов	v/v
Ватт	Вт
Масса	wt.
Процент массы	wt. %

Условия анализа.

Порошковая рентгеновская дифрактометрия (XRPD).

Образцы анализировали на порошковом рентгеновском дифрактометре Panalytical CubiX-Pro или дифрактометре Bruker D8 Advance XRP.

Аналитические условия: образцы помещали на кремниевый ультрамикродержатель с нулевым возвратом. Образцы облучали медными К-альфа-рентгеновскими лучами с помощью рентгеновской трубки, работающей при 40 кВ/30 мА. Образцы сканировали в непрерывном режиме в диапазоне от 3 до 45°.

Параметры прибора Bruker D8 Advance XRP: Использовали мощную медную мишень, работающую при 40 кВ/40 мА. Детектор Лунхеуе использовали с раскрытием PSD 2,1°. Образцы сканировали в диапазоне 4-40° (2σ), где встречаются характерные пики для большинства органических кристаллических соединений.

Динамическая сорбция паров (DVS).

Измерения гигроскопичности выполняли путем переноса приблизительно 10 мг образца в прибор DVS и последующей регистрации изменения массы относительно влажности воздуха при 25°C с использованием следующих параметров:

Общий поток газа (sccm)		-	200	
Камера (°C)		-	25	
Растворитель		-	Вода	
Способ	Разогревание	-	Нет	
	Сушка	-	Нет	
	Стадия способа	Режим	-	DMDT
		Цикл: RH	-	0%-90%-0% или 50%-90%-50%
		Шаг стадии: 10%	-	
		Критерий Dm/dt: <0,002%	-	частота регистрации: 1 мин
мин. продолжительность: 10 мин	-			
макс. продолжительность: 360 мин	-			

Чистота по данным ВЭЖХ.

Чистоту образца определяли с помощью ВЭЖХ. Рабочие параметры ВЭЖХ перечислены ниже:

Сведения о колонке	Agilent Eclipse plus C18 (150*4,6 мм, 3,5 мкм) PDS-HPLC-104		
Температура колонки	40°C		
Подвижная фаза А	0,05% TFA в воде		
Подвижная фаза В	0,05% TFA в метаноле		
Скорость потока	1 мл/мин		
Профиль градиента	Время (мин)	% подвижной фазы А	% подвижной фазы В
	0,00	70	30
	8,00	30	70
	9,00	10	90
	10,00	10	90
	11,00`	70	30
15,00	70	30	
Длина волны детектора	270 нм (для концентрации), 330 нм (для анализа и чистоты)		
Объем впрыска	2 мкл		
Растворитель для промывки игл	Метанол		
Разбавление	Вода: метанол (50/50, в объемном отношении)		

Пример 1. Мелкомасштабная кристаллизация в ацетоне дает форму D, но не воспроизводится в больших масштабах.

Проводили несколько небольших экспериментов по кристаллизации из ацетона, в которых соединение (I) и фумаровую кислоту в количестве 2 г растворяли в ацетоне при температуре 50-60°C. В экспериментах 1 и 2 соединение (I) и раствор кислоты смешивали с последующим выпариванием для концентрирования растворителя и охлаждением до температуры 0°C в течение 2-5 ч. Форму D успешно получали при кристаллизации без затравки и при кристаллизации с затравкой. В обоих экспериментах получали форму D, которая была стабильной в растворе по меньшей мере 17 ч после кристаллизации с затравкой и без нее. В эксперименте 3 концентрацию растворителя не включали в процедуру, и твердый осадок из раствора не выпадал. Из экспериментов был сделан вывод, что концентрация растворителя необходима для получения формы D (табл. 1).

Затем процедуру кристаллизации в ацетоне увеличили до 3,5 г, а общее время концентрирования увеличили приблизительно до 10 ч. В этом эксперименте форма D превращалась в форму S4 после концентрирования в течение 3 ч.

Была предпринята попытка сконцентрировать раствор фумаровой кислоты до образования соли. После растворения фумаровой кислоты в ацетоне раствор кислоты концентрировали до 8 объемов, в результате чего получали суспензию фумаровой кислоты. Затем соединение (I) растворяли в ацетоне (32 объема) и добавляли к суспензии кислоты при температуре 55°C с 1% затравки и выдерживали в течение одного часа при температуре 55°C. Раствор охлаждали до температуры 5°C и выдерживали 16-17 ч. Форму D успешно создали (табл. 2). Однако было обнаружено, что суспензия формы D может выдерживаться при температуре 50°C менее 2,5 ч перед преобразованием в форму S4.

Из-за быстрого превращения в форму S4 при температуре 50-55°C в ацетоне было решено определить эффект сокращения времени выдержки при температуре 50-55°C. Таким образом, время выдержки при температуре 50-55°C было сокращено до 10 мин для партий массой 1 грамм и 5 грамм, после чего температуру понижали до 0°C в течение 1,5 ч и выдерживали при этой температуре в течение 16-17 часов. Хотя получали форму D хорошего качества, выход был снижен до 63 и 65%, соответственно (таблица 3). Повторяли эксперимент, в котором температура была снижена до 25°C на 24 ч перед охлаждением до 5°C. В этом эксперименте по-прежнему получали форму D хорошего качества, однако потеря выхода все еще составляла приблизительно 12%. Также было обнаружено, что дальнейшее охлаждение до температуры 5°C не помогло еще больше снизить потери (табл. 4).

В попытке дополнительно увеличить выход кристаллизации на стадии охлаждения добавляли холодный антирастворитель. Метил-трет-бутиловый эфир (МТБЕ) был выбран в качестве антирастворителя, и проводили два эксперимента с количествами соединения (I) 1 грамм и 5 грамм. Раствор соединения (I) в ацетоне (34 объема) объединяли с суспензией фумаровой кислоты в ацетоне (8 объемов) при температуре 50°C и 1% затравке и выдерживали в течение 0,5 ч. После этого добавляли МТБЕ и охлаждали до температуры 0°C в течение 1,5 ч. Кристаллизация с 1 граммом образца дала форму D, но партия массой 5 грамм дала смесь D и S4. Ни один из экспериментов не дал удовлетворительного выхода (64 и 60%, соответственно) (табл. 5).

Затем повторяли процедуру кристаллизации, понижая температуру до 25 и 35°C, при которой смешивали соединение (I) и фумаровую кислоту. Получали смеси форм D и S4 (табл. 6).

Таблица 1

Сводная информация о предварительных экспериментах по кристаллизации в ацетоне

ID	Процедура	IPC			Влажный осадок	Сухой осадок
		XRPD				
		После концентрирования	Суспензия 17ч	Суспензия 60ч	XRPD	XRPD
Эксперимент 1	Затравка кристаллизации 2%, концентрирования	Форма D	Форма D	Форма D	Форма D	Форма D
	ние, охлаждение до 0°C, скорость перемешивания 180 об/мин					
Эксперимент 2	Без затравки кристаллизации, концентрирование, охлаждение до 0°C, скорость перемешивания 180 об/мин	Форма D	Форма D	Нет данных	Форма D	Форма D
Эксперимент 3	Затравка кристаллизации 2%, без концентрирования, охлаждение до 0°C, скорость перемешивания 180 об/мин	Нет твердого	Нет твердого	Нет твердого	Нет твердого	Нет твердого

Таблица 2

Увеличенный масштаб кристаллизации при испарении в ацетоне

Процедура	IPC (XRPD)			Влажный осадок	Сухой осадок
	IPC1	IPC2	IPC3		
Свободное основание растворяли в 32 объемах; кислоту растворяли, затем концентрировали до 8 объемов; свободное основание добавляли к кислоте при температуре 55°C, добавляя 1% затравки кристаллизации;	Выдерживание в течение 1 ч при температуре 55°C: Форма D	Охлаждение до температуры 5°C Форма D	Выдерживание в течение 16-17 ч при температуре 5°C: Форма D	Форма D	Форма D

Таблица 3

Уменьшение времени выдержки после добавления затравки

Размер масштаба	Процедура	IPC (XRPD)		Сухой осадок				Потеря ML	Фактический выход
		Охлаждение до 0°C	16-17 ч при 0°C	XRPD	Чистота	Анализ	Остаточный растворитель		
Масштаб 1 г	Выдержка при 50°C в течение 10 минут	D	D	D	99,7%	98,0%	Ацетон: 0,269% MTBE: 0,010%	~25%	~63%
Масштаб 5 г	Выдержка при 50°C в течение 10 минут	D	D	D	99,3%	99,2%	Ацетон: 0,37% MTBE: 0,04%	~33%	~65%

Таблица 4

Оптимизация выхода кристаллизации при выдержке при температуре 25°C

Размер масштаба	Процедура	IPC (XRPD)		Сухой осадок				Потеря ML	Фактический выход
		IPC1	IPC2	XRPD	Чистота	Анализ	Остаточный растворитель		
Масштаб 4 г	Выдержка при 25°C в течение 24ч	Выдержка при 25°C в течение 24 ч: Форма D	Выдержка при 5°C в течение 16 ч: Форма D	Форма D	99,7%	97,5%	Ацетон 0,29% MTBE 0,02%	25°C: ~12% 5°C: ~12%	~82%

## Добавление холодного МТВЕ при охлаждении

Размер масштаба	Процедура	Сухой осадок				Потеря ML	Фактический выход
		XRPD	Чистота	Анализ	Остаточный растворитель		
Масштаб 1 г	Раствор свободного основания (34 объема); суспензия фумаровой кислоты (8 об.); добавление 1% затравки кристаллизации; выдержка при 50°C в течение 0,5 ч; добавление 30 об. МТВЕ; охлаждение до 0°C в течение 1,5 часов	Форма D	99,7%	98,1%	Ацетон 0,217% МТВЕ 0,026%	~27%	~64%
Масштаб 5 г	Раствор свободного основания (34 объема); суспензия фумаровой кислоты (8 об.); добавление 1% затравки кристаллизации; выдержка при 50°C в течение 0,5 ч; добавление 30 об. МТВЕ; охлаждение до 0°C в течение 1,5 часов	Форма D + форма S4	99,3%	98,4%	Ацетон 0,37% МТВЕ, 0,06%	~40%	~60%

Таблица 6

## Образование солей в ацетоне при температуре 25 и 35°C

Свободное основание	Фумаровая кислота	Температура	Сухое твердое вещество
			XRPD
5 об.	5 об.	25°C	Форма S4
5 об.	20 об.	25°C	Форма S4
34 об.	5 об.	25°C	Форма D+ форма S4
15 об.	5 об.	35°C	Форма D+ форма S4

Пример 2. Качество кристаллизации зависит от исходного материала.

Из результатов приведенного выше примера 1 оказалось, что образование соли в ацетоне при температуре 50°C было наиболее многообещающей процедурой для доставки формы D с разумным выходом. В предложенной методике раствор соединения (I) в ацетоне первоначально загружали в ацетоновую суспензию фумаровой кислоты при температуре 50°C, в результате чего получали перенасыщенный раствор ацетона. Затем в этот перенасыщенный раствор вносили затравку. Систему выдерживали после внесения затравки кристаллизации (до охлаждения) не более 2 ч; затем систему охлаждали до температуры 25°C с последующей выдержкой при температуре 25°C в течение ночи. После фильтрации осадок промывали метил-трет-бутиловым эфиром и сушили при температуре 50°C в вакууме. Эта процедура может дать желаемую форму D с выходом >60%. Для проверки предложенной процедуры проводили несколько экспериментов на массе 4 грамма (чистота 99,1%) и 9 граммов (чистота 99,8%). Эксперимент с партией 4 грамма дал желаемую форму D, но эксперимент с партией 9 грамм дал форму S4. Поскольку масштабы двух экспериментов были схожими, предполагалось, что результаты могут зависеть от качества исходного материала (табл. 7).

Чтобы изучить влияние качества исходного материала, проводили несколько экспериментов (табл. 8) с использованием исходных материалов различной чистоты. В эксперименте 4 для эксперимента использовали менее чистое соединение (I). Однако в ходе исследования не было обнаружено явной кристаллизации. В эксперименте 5 партию соединения (I) высокой чистоты смешивали с несколькими партиями менее чистого материала и использовали в качестве исходного материала. После внесения затравки кристаллизации не наблюдалось. Время выдержки увеличили до 3 ч при температуре 50°C, но образовалась смесь формы D и S4. В эксперименте 6 в качестве исходного материала использовали смесь типичного чистого соединения (I) и маточного раствора из получения соединения (I) (маточный раствор из стадии синтеза соединения (I)). Форма D была создана и могла сохраняться в течение относительно более длительного времени.

Чтобы изучить влияние остаточного растворителя в соединении (I), проводили несколько экспериментов с "добавками" (табл. 9). "Добавленные" растворители представляли собой растворители, которые использовали на стадиях синтеза. Кроме того, в некоторых партиях соединение (I) было аморфным. Чтобы изучить, может ли полиморфизм соединения (I) влиять на полиморфизм соли, проводили эксперимент, начиная с аморфного соединения (I). В эксперименте 7 в систему добавляли 3% MeOH, и форма D превращалась в форму S4 во время выдержки при температуре 50°C. В эксперименте 8 к системе добавляли 1% метилацетат, и форма D превращалась в форму S4 во время выдержки при температуре 50°C. В эксперименте 9 в качестве исходного материала использовали аморфное соединение (I), и форма D превращалась в форму S4 во время выдержки при температуре 50°C.

Подводя итог, разработали процедуру испарительной кристаллизации для получения формы D. Однако затем было обнаружено, что успех процедуры сильно зависит от чистоты и формы исходного материала. Таким образом, исходные материалы с незначительно отличающимися незначительными примесями или уровнями чистоты давали разные полиморфы. Было обнаружено, что успех кристаллизации также зависит от незначительных изменений условий кристаллизации и масштаба кристаллизации. Однако критические факторы, которые контролировали образование формы D или стабильной формы S4, не были определены.

Таблица 7

Повторяемость предложенной процедуры в ацетоне.

Размер масштаба	Исходный материал	Процедура	IPC (XRPD)			Потеря ML	Фактический выход
			IPC1	IPC2	IPC3		
Масштаб 4 г	Чистота: 99,1%	Предложенная процедура	Выдержка при 25°C в течение 2 ч: форма D	Выдержка при 25°C в течение 18 ч: форма D	Выдержка при 25°C в течение 24 ч: форма D	~12%	~82%
Масштаб 9 г	Чистота: 99,8%	Предложенная процедура	Выдержка при 50°C в течение 0,5 ч: форма D+ форма S4	Выдержка при 25°C в течение 16 ч: в основном S4	Нет данных	~10%	~87%

ML: маточный раствор

Таблица 8

Влияние исходного материала

Размер масштаба	Исходный материал	Процедура	IPC (XRPD)			Потеря ML	Фактический выход
			IPC1	IPC2	IPC3		
Масштаб 8 г Эксперимент 4	Чистота: 98,5%	Предложенная процедура	Нет очевидной кристаллизации				
Масштаб 3 г Эксперимент 5	Чистота: 98,02% (смешанная партия)	Выдержка при 50°C в течение 3ч	Выдержка при 50°C в течение 1,5 ч: форма D+ форма S4			Нет данных	74%
Масштаб 3 г Эксперимент 6	Чистота: 98,28% (добавление MeOH ML)	Предложенная процедура	После добавления соединения (I): форма D	Охлаждение до 25°C: форма D	Выдержка при 25°C в течение 16 ч: в основном форма D	Нет данных	75%

Таблица 9

Различные партии исходного материала

Размер масштаба/ ID эксперимента	Исходный материал	Процедура	IPC (XRPD)			Потеря ML	Фактический выход
			После добавления соединения (I)	Выдержка при 50°C в течение 0,5 ч	Выдержка при 25°C в течение 18 ч		
Масштаб 2,2 г Эксперимент 7	Чистота: 99,91%	Добавление 2,2 г MeOH	Форма D	Форма D + форма S4	Форма S4	13%	87%
Масштаб 2,2 г Эксперимент 8	Чистота: 99,91%	Добавление 1 г метилацетата	Форма D	Форма D + форма S4	Форма S4	6%	90%
Масштаб 3 г Эксперимент 9	Аморфный	Предложенная процедура	Форма D	Форма D + форма S4	Форма S4	13%	84%

Пример 3. Крупномасштабный производственный процесс, предназначенный для чистой формы D,

привел к получению смеси форм D и S4 в соотношении 1:1.

1,05 кг соединения (I) растворяли в 5-10 кг ацетона при температуре 55-60°C при перемешивании в течение 30 минут с получением раствора соединения (I). Раствор 0,32 кг фумаровой кислоты, растворенный в 35 кг ацетона, медленно добавляли к раствору соединения (I) при температуре 60°C. Полученную смесь концентрировали перед добавлением 3,5 г затравочных кристаллов, содержащих форму D. Смесь перемешивали при температуре 60°C в течение 1-2 ч. Затем смесь концентрировали и охлаждали до температуры 50°C в течение 2 ч. Затем к смеси медленно добавляли 4 кг МТВЕ при температуре 50°C и полученную смесь перемешивали еще 1-2 ч при той же температуре. Смесь медленно охлаждали до температуры 25°C в течение 20-25 часов. Полиморфное превращение было обнаружено в конце процесса охлаждения, в результате чего получали смесь полиморфных форм D и S4 в соотношении 1:1. Затем собирали фумарат, дважды промывали 3-4 кг МТВЕ, фильтровали и сушили при температуре 65-70°C в течение 8-24 ч. В качестве конечного продукта получали 1,02 кг смеси полиморфных форм D и S4 (1:1).

Пример 4. Получение в малых масштабах кристаллической формы S4 фумарата соединения (I) (1:1).

Новую процедуру мелкомасштабной кристаллизации в системе растворителей МЕК/вода/EtOH/МСН разработали следующим образом: 0,282 г фумаровой кислоты растворяли в 5 мл этанола при температуре 50°C, чтобы получить раствор кислоты. 1,0 г соединения (I) растворяли в 7 мл 2-бутанола/воды (объемное соотношение 95/5) при температуре 50°C, чтобы приготовить раствор соединения (I). К раствору соединения (I) добавляли 20% раствора кислоты, к смешанному раствору добавляли 20 мг затравочных кристаллов, а затем по каплям добавляли остальную часть кислоты. Температуру поддерживали на уровне 50°C в течение 3 ч, затем охлаждали до 25°C в течение 2,5 ч и поддерживали при 25°C в течение дополнительных 17 ч. Затем за 2 ч добавляли 22 объемных эквивалента метилциклогексана. Температуру понижали до 5°C за 30 мин и поддерживали на уровне 5°C в течение дополнительных 3 ч. Образец фильтровали и сушили при температуре 50°C в вакууме с получением конечного продукта, который был подтвержден XRPD как монокристаллическая форма S4. Дифрактограмма XRPD для этого конечного продукта была по существу такой же, как показанная на фиг. 1 и приведена в таблице 10 для конечного продукта, полученного с использованием 100 г соединения (I) на основе той же процедуры. Из-за своей уникальной картины XRPD с острыми пиками и плоской базовой линией, форма S4 считалась монокристаллической формой с кристаллической чистотой по меньшей мере 90%.

Чтобы улучшить выход продукта, необходимо правильно добавить метилциклогексан в качестве антирастворителя. В частности, когда объемные отношения 2-бутанон/вода (95/5) к этанолу и метилциклогексану составляют от 6-7 до 4-5 до 11-22, можно стабильно получить форму S4 с выходом более чем 90% (табл. 11). Кроме того, молярное соотношение между фумаровой кислотой и соединением (I) можно точно настроить для повышения выхода, в первую очередь за счет снижения растворимости продукта. Когда молярное соотношение фумаровой кислоты к соединению (I) изменилось с 1,1 до 1,5, потеря выхода формы S4 снизилась с 7 до 3% (табл. 12). Позже было обнаружено, что молярное соотношение 1,3 работает одинаково хорошо, как и 1,5, и, таким образом, применялось к процедуре кристаллизации.

Был сделан вывод, что процедура кристаллизации является достаточно надежной по результатам испытаний в различных напряженных условиях, включая в себя: раствор фумаровой кислоты или раствор соединения (I), каждый приготовленный и выдержанный при температуре 50°C в течение длительного периода времени (до 24 ч), быстрое добавление (не более чем полчаса) фумаровой кислоты или метилциклогексилового антирастворителя, быстрое охлаждение (табл. 13). Даже в этих напряженных условиях постоянно получали форму S4 с очень высокой чистотой; и выходы, хотя и немного снизились, все же были намного лучше, чем выходы, полученные для формы D с помощью процедур, раскрытых в настоящем изобретении (смотрите примеры 1-2) и в патенте США № 9884855 (смотрите пример 6).

Таблица 10

## XRPD формы S4

Угол 2θ (°)	Относительная интенсивность (%)
6,6	19,0
9,8	52,1
11,6	11,9
13,0	43,5
16,3	100,0
17,1	12,6
19,5	30,4
21,1	84,9
21,5	14,4
22,0	11,0
22,5	40,2
22,9	18,9
23,9	18,9
24,3	10,2
28,7	16,5
29,4	22,9
30,2	17,8

Таблица 11

## Предварительная кристаллизация в смеси МЕК/вода/ЕtОН (МСН)

Размер масштаба	Система растворителей	XRPD		Сухой осадок			Потеря	
		Сразу после осаждения твердого вещества	Перед выделением	Анализ	Чистота	КФ		Остаточный растворитель
Масштаб 3 г	МЕК/вода (95об./5об.): 10 об. EtOH: 4-5 об.	S4	S4	99,87%	99,88%	0,18%	МЕК: 0,03% EtOH:ND	33%
Масштаб 3 г	МЕК/вода (95об./5об.): 6-7 об. EtOH: 4-5 об. МСН: 11 об.	S4	S4	98,56%	99,87%	0,33%	МЕК: 0,055% EtOH: 0,035% МСН: 0,009%	8%
Масштаб 2 г	МЕК/вода (95об./5об.): 6-7 об. EtOH: 4-5 об. МСН: 22 об.	S4	S4	98,43%	99,86%	0,15%	0,07%EtOH 0,04%МЕК 0,01%МСН	3%

Таблица 12

## Влияние количества добавленной кислоты

Размер масштаба	Молярное отношение Фумаровая кислота/соединение (I)	Влажный осадок	Сухой осадок				Потеря ML	
			Анализ	Чистота	КФ	Остаточный растворитель		
Масштаб 1 г	1,1	Форма S4	99,01%	99,87%	0,14%	EtOH: 0,06% МЕК: 0,05% МСН: 0,00%	17,82 %	~7 %
Масштаб 1 г	1,5	Форма S4	98,48%	99,85%	0,14%	EtOH: 0,05% МЕК: 0,04% МСН: 0,00%	17,85 %	~3 %

Таблица 13

## Испытания в напряженных условиях

Размер масштаба	Процедура	IPC (XRPD) После добавления FA	Влажный осадок	Сухой осадок				Потеря ML	Выход по твердому веществу
				Анализ	Чистота	KF	RS		
Масштаб 1 г	Перемешивание раствора FA EtOH при 50°C в течение 24 часов	Форма S4	Форма S4	97,28 %	99,8%	0,06 %	0,08% EtOH 0,05% MEK 0,01% MCH	~5%	86%
Масштаб 1 г	Быстрое добавление FA; быстрое охлаждение до 25°C; выдержка при 5°C в течение 72 часов	Нет данных	Форма S4	Нет данных	99,8%	0,09 %	0,12% EtOH 0,08% MEK 0,00% MCH	~4%	Нет данных
Масштаб 1 г	Быстрое добавление MCH; быстрое охлаждение до 5°C	Форма S4	Форма S4	97,59 %	99,9%	0,05 %	0,07% EtOH 0,06% MEK 0,00% MCH	~4%	~82%
Масштаб 1 г	Раствор соединения (I) (чистота: 99,6%) перемешивание при 50°C в течение 20 часов (чистота: 99,0%)	Форма S4	Форма S4	98,74 %	99,8%	0,07 %	0,06% EtOH 0,04% MEK 0,01% MCH	~4%	~80%

Пример 5. Крупномасштабный производственный процесс для формы S4.

Для крупномасштабного производства формы S4 17,0 кг соединения (I) растворяли в 90 кг 2-бутанола/воды (объемное соотношение 95/5) при температуре 45-55°C при перемешивании в течение 1-4 ч с образованием раствора соединения (I). 4,3 кг фумаровой кислоты растворяли в 74 кг EtOH при температуре 45-55°C при перемешивании в течение 1-4 часов с образованием раствора кислоты. Часть раствора кислоты загружали в раствор соединения (I) при температуре 45-55°C и перемешивали при температуре 45-55°C в течение 0,5-4 ч. К смешанному раствору добавляли затравочные кристаллы, содержащие форму S4. Смесь с затравочными кристаллами перемешивали при температуре 45-55°C в течение 2-6 ч, а затем добавляли оставшийся раствор кислоты. Полученную смесь перемешивали при температуре 45-55°C в течение 3-12 ч, а затем охлаждали до температуры 20-30°C в течение 5-12 ч. Затем медленно добавляли 284 кг метилциклогексана в течение 6-8 ч. После добавления смесь перемешивали при температуре 20-30°C в течение 3-12 ч, затем охлаждали до температуры 0-10°C в течение 3-12 ч и выдерживали при температуре 0-10°C при перемешивании еще 6-8 ч. Затем собирали желаемую соль, дважды промывали 16 кг MCH, фильтровали и сушили при температуре 50°C в течение 8-24 ч с получением 17,96 кг конечного продукта, который был подтвержден XRPD в виде монокристаллической формы S4 (смотрите фиг. 2). Из-за своей уникальной картины XRPD с острыми пиками и плоской базовой линией форма S4 считалась монокристаллической формой с кристаллической чистотой по меньшей мере 90%.

Пример 6. Испытания на гигроскопичность и растворимость.

На основании описанных ранее измерений DVS форма S4 проявляла низкую гигроскопичность в диапазоне относительной влажности от 0 до 80% с приростом массы только 0,41% при относительной влажности 80%, что немного ниже, чем у формы D с приростом массы 0,56% при относительной влажности 80%.

Было проведено множество испытаний для оценки растворимости формы S4 по сравнению с формой D. Собственные скорости растворения при pH 2 показали аналогичные результаты для формы S4 (429,3 мкг/см<sup>2</sup>-мин) и формы D (440,4 мкг/см<sup>2</sup>-мин). Также измеряли равновесную растворимость в различных биологических средах при температуре окружающей среды. Форма S4 показала высокую равновесную растворимость (2,52 мг/мл) в состоянии натощак, имитирующем желудочную жидкость (FaSSGF), и низкую равновесную растворимость (0,05 мг/мл) в состоянии натощак, имитирующем ки-

шечную жидкость (FaSSIF), аналогично наблюдаемым для формы D (2,08 и 0,08 мг/мл, соответственно).

Согласно руководству FDA испытание растворения лекарственного вещества в пероральных лекарственных формах *in vitro* может быть должным образом спланировано для установления корреляции *In Vivo-In Vitro* (IVIVC), то есть корреляции между свойствами лекарственной формы *in-vitro* и ответа *in-vivo*. Согласно этому руководству, две партии фумарата, содержащие кристаллические формы D и S4, использовали для приготовления таблеток, чтобы оценить любое влияние на характеристики лекарственного продукта. Каждую из двух партий фумарата и вспомогательных веществ перед взвешиванием отдельно просеивали. Затем желаемую массу каждого компонента переносили в шейкер-миксер и перемешивали. Затем для двух партий выполняли таблетирование с использованием однопуансонного таблеточного пресса.

Затем эффективность этих таблеток оценивали с использованием надлежащим образом утвержденного способа испытаний на растворение. Результаты показали, что обе партии таблеток характеризуются очень похожими профилями растворения: конечная средняя концентрация через 60 минут для всех партий достигала 94% (смотрите таблицу 14). Эти данные показывают, что лекарственные продукты, изготовленные из кристаллической формы S4, демонстрируют такие же характеристики, как и форма D, в отношении испытания растворения *in vitro*, что позволяет сделать вывод о биоэквивалентности в соответствии с рекомендациями FDA.

Таблица 14

Испытание растворения *in-vitro* форм S4 и D в их соответствующих пероральных лекарственных формах

Полиморфная форма		Форма D			Форма S4			
Описание испытания	Спецификация							
Растворение	Сообщенные средние результаты	Время	Мин.	Макс.	Среднее	Мин.	Макс.	Среднее
		15	61%	64%	63%	74%	77%	76%
		30	81%	86%	83%	89%	91%	90%
		60	92%	98%	94%	93%	95%	94%

Пример 7. Фармакокинетический анализ.

Во время клинической разработки соединения (I) две партии фумарата, каждая из которых содержала полиморфную форму D или форму S4, использовали для приготовления таблеток в соответствии с правилами действующей надлежащей производственной практики (cGMP). Они упоминаются как форма D и форма S4 таблеток в разделе ниже.

Способы.

Прием лекарственных средств, сбор крови и подготовка плазмы.

Пациенты получали дозу в клинических испытаниях, одобренных Министерством здравоохранения Канады и Советом по этике исследований больницы, вводящей лекарственное средство. Восемь пациентов принимали таблетки в форме S4, шесть - в дозе 48 мг и двое - в дозе 160 мг. 64 пациента принимали таблетки в форме D в дозах от 3 до 160 мг.

Кровь собирали для анализа перед дозированным приемом и через 2, 4 и 6 ч после дозированного приема. Вкратце, используя стандартные процедуры флеботомии, приблизительно 6 мл крови собирали в пробирку для забора крови K<sub>3</sub>EDTA, а затем переворачивали 8-10 раз для перемешивания. Затем образец центрифугировали при 1000 g в течение 10-15 мин при температуре приблизительно 5°C. Фракцию плазмы крови удаляли с помощью одноразовой пипетки, переносили в новую пробирку, замораживали при температуре -70°C и затем отправляли на сухой лед для анализа.

Анализ плазмы человека.

Содержание соединения (I) измеряли в плазме с использованием способа, утвержденного в соответствии со всеми применимыми правилами USFDA, OECD и MHLW и Руководством USFDA для промышленности: валидация биоаналитического способа, май 2001 г. Вкратце, образцы плазмы человека, содержащие соединение (I) с соединением (I) <sup>13</sup>C<sub>6</sub> в качестве внутреннего стандарта и K<sub>3</sub>EDTA в качестве антикоагулянта получали экстракцией жидкость/жидкость. После выпаривания экстракционного растворителя экстракты образцов восстанавливали и анализировали обращенно-фазовой ВЭЖХ с использованием Waters Atlantis dC18. Подвижную фазу распыляли с использованием нагретого азота в источнике/интерфейсе Z-спрея, настроенном на положительную ионизацию электрораспылением. Ионизированные соединения обнаруживали с помощью MS/MS. Экспериментальные образцы сравнивали с образцами стандартной кривой, полученными с использованием эталонного стандартного материала, для определения концентраций соединения. Фармакокинетические параметры определяли с помощью приложения Excel в разделе "Функции ПК".

Полученные результаты.

Для сравнения доз при различных уровнях доз экспозицию (значение AUC<sub>0-6</sub> ч) в нг\*ч/мл делили на введенную дозу (мг). Результаты представлены на фиг. 3. Средняя нормированная по дозе экспозиция

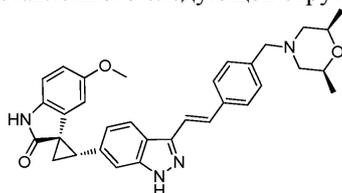
после дозирования таблеток формы D составляла  $3,11 \pm 2,19$  нг\*ч/мл/мг. Средняя нормированная по дозе экспозиция после дозирования форма S4 составила  $5,99 \pm 2,48$  нг\*ч/мл/мг. Значение p для значимости, рассчитанное с использованием двустороннего t-критерия, составило 0,0009.

Заключение.

Дозированный прием таблеток, содержащих форму S4, приводит к более высоким уровням воздействия на пациентов, чем дозированный прием таблеток, содержащих форму D. В представленных данных среднее кратное увеличение воздействия после дозированного приема таблеток формы S4 по сравнению с таблетками формы D составляет  $5,99/3,11 = 1,9$ -кратное.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фумарат соединения (I), представленного следующей структурной формулой:



Соединение (I)

где молярное соотношение между соединением (I) и фумаровой кислотой составляет 1:1, а фумарат включает в себя кристаллическую форму S4, характеризующуюся порошковой рентгеновской дифрактограммой, которая включает в себя пики при  $6,6^\circ$ ,  $9,8^\circ$ ,  $16,3^\circ$ ,  $21,1^\circ$ ,  $28,7^\circ$  и  $30,2^\circ \pm 0,2$  в  $2\theta$ .

2. Фумарат по п.1, причем фумарат включает в себя кристаллическую форму S4, характеризующуюся порошковой рентгеновской дифрактограммой, которая включает в себя пики при  $6,6^\circ$ ,  $9,8^\circ$ ,  $16,3^\circ$ ,  $21,1^\circ$ ,  $28,7^\circ$ ,  $29,4^\circ$  и  $30,2^\circ \pm 0,2$  в  $2\theta$ .

3. Фумарат по п.1, причем фумарат включает в себя кристаллическую форму S4, характеризующуюся порошковой рентгеновской дифрактограммой, которая включает в себя пики при  $6,6^\circ$ ,  $9,8^\circ$ ,  $13,0^\circ$ ,  $16,3^\circ$ ,  $19,5^\circ$ ,  $21,1^\circ$ ,  $22,5^\circ$ ,  $28,7^\circ$ ,  $29,4^\circ$  и  $30,2^\circ \pm 0,2$  в  $2\theta$ .

4. Фумарат по п.1, причем фумарат включает в себя кристаллическую форму S4, характеризующуюся порошковой рентгеновской дифрактограммой, которая включает в себя пики при  $6,6^\circ$ ,  $9,8^\circ$ ,  $13,0^\circ$ ,  $16,3^\circ$ ,  $19,5^\circ$ ,  $21,1^\circ$ ,  $22,5^\circ$ ,  $22,9^\circ$ ,  $23,9^\circ$ ,  $28,7^\circ$ ,  $29,4^\circ$  и  $30,2^\circ \pm 0,2$  в  $2\theta$ .

5. Фумарат по п.1, причем фумарат включает в себя кристаллическую форму S4, характеризующуюся порошковой рентгеновской дифрактограммой, которая включает в себя пики при  $6,6^\circ$ ,  $9,8^\circ$ ,  $11,6^\circ$ ,  $13,0^\circ$ ,  $16,3^\circ$ ,  $17,1^\circ$ ,  $19,5^\circ$ ,  $21,1^\circ$ ,  $21,5^\circ$ ,  $22,0^\circ$ ,  $22,5^\circ$ ,  $22,9^\circ$ ,  $23,9^\circ$ ,  $24,3^\circ$ ,  $28,7^\circ$ ,  $29,4^\circ$  и  $30,2^\circ \pm 0,2$  в  $2\theta$ .

6. Фумарат по п.1, причем фумарат включает в себя кристаллическую форму S4, характеризующуюся порошковой рентгеновской дифрактограммой, по существу аналогичной изображенной на фиг. 1.

7. Фумарат по любому из пп.1-6, причем по меньшей мере 90% по массе соли находится в монокристаллической форме, форме S4.

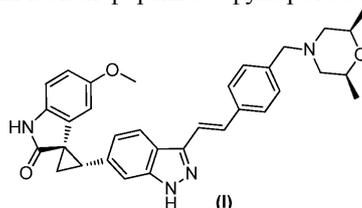
8. Фумарат по любому из пп.1-6, причем по меньшей мере 99% по массе соли находится в монокристаллической форме, форме S4.

9. Фумарат по любому из пп.1-8, причем фумарат содержит менее чем 30% по массе кристаллической формы D.

10. Фумарат по любому из пп.1-8, причем фумарат содержит менее чем 10% по массе кристаллической формы D.

11. Фармацевтическая композиция, содержащая фумарат по любому из пп.1-10 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

12. Способ получения кристаллической формы S4 фумарата соединения (I) по п.1:



предусматривающий растворение фумаровой кислоты и соединения (I) в растворителе проб, содержащем 2-бутанон, воду и этанол, с образованием раствора для кристаллизации, а затем осаждение кристаллической формы S4 из раствора для кристаллизации, причем:

молярное соотношение между соединением (I) и фумаровой кислотой в растворителе проб составляет от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:1,3; и молярное соотношение между соединением (I) и фумаровой кислотой в фумарате составляет 1:1.

13. Способ по п.12, предусматривающий растворение фумаровой кислоты и соединения (I) в рас-

творителе проб при повышенной температуре и осаждение кристаллической формы S4 из раствора для кристаллизации путем охлаждения и/или добавления метилциклогексана при охлаждении.

14. Способ по п.12 или 13, предусматривающий следующие стадии:

- (i) растворение соединения (I) в смеси 2-бутанона и воды при повышенной температуре с образованием раствора соединения (I);
- (ii) растворение фумаровой кислоты в этаноле при повышенной температуре с образованием раствора фумаровой кислоты;
- (iii) добавление раствора фумаровой кислоты к раствору соединения (I) при повышенной температуре с образованием раствора для кристаллизации;
- (iv) необязательно добавление затравочных кристаллов при повышенной температуре к раствору для кристаллизации; а также
- (v) снижение температуры раствора для кристаллизации для осаждения кристаллической формы S4.

15. Способ по п.14, при котором объемное отношение между 2-бутанонам и водой составляет от 80:20 до 98:2, а объемное отношение 2-бутанона/воды к этанолу и метилциклогексану составляет от 6-7 до 4-5 к 11-22; повышенная температура составляет от 45 до 55°C; а пониженная температура составляет от 20 до 30°C.

16. Способ по п.14, при котором объемное отношение между 2-бутанонам и водой составляет от 90:10 до 98:2, а объемное отношение 2-бутанона/воды к этанолу и метилциклогексану составляет от 6-7 до 4-5 к 11-22; повышенная температура составляет от 45 до 55°C; а пониженная температура составляет от 20 до 30°C.

17. Способ по п.14, дополнительно предусматривающий добавление метилциклогексана при пониженной температуре к раствору для кристаллизации для осаждения кристаллической формы S4.

18. Способ по п.17, при котором температуру раствора для кристаллизации дополнительно снижают для осаждения кристаллической формы S4.

19. Способ по п.17, при котором пониженная температура составляет от 20 до 30°C.

20. Способ по п.18, при котором дополнительно пониженная температура составляет от 0 до 10°C.

21. Применение фумарата по любому из пп.1-10 или его фармацевтической композиции для лечения субъекта с раком.

22. Применение по п.21, при котором рак выбран из группы, состоящей из рака легких, рака молочной железы, рака толстой кишки, нейробластомы, рака простаты, меланомы, мультиформной глиобластомы, рака яичников, лимфомы, лейкоза, остеосаркомы, герминомы, глиомы, фибросаркомы, желудочно-кишечной саркомы, фиброзной гистиоцитомы, круглоклеточной саркомы, синовиальной саркомы, рака шейки матки, аногенитального рака, рака головы и шеи и рака ротоглотки.

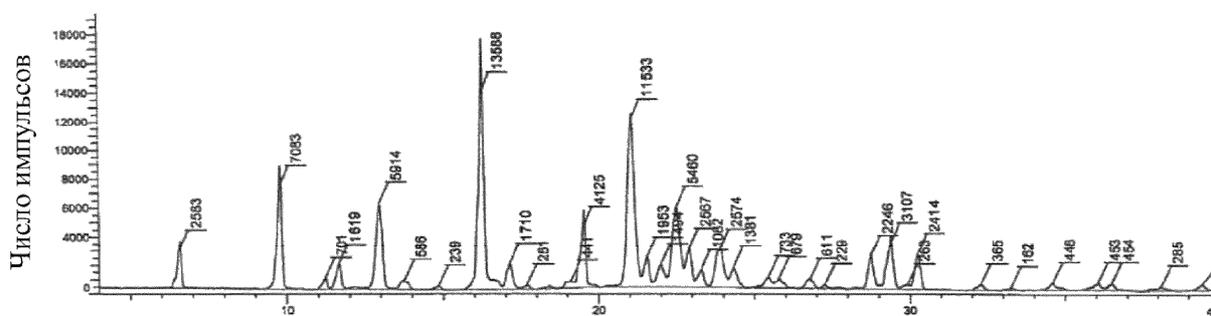
23. Применение по п.21, при котором рак выбран из группы, состоящей из рака легких, рака молочной железы и рака толстой кишки.

24. Применение по п.21, при котором рак представляет собой рак молочной железы.

25. Применение по п.21, при котором рак представляет собой трижды негативный рак молочной железы.

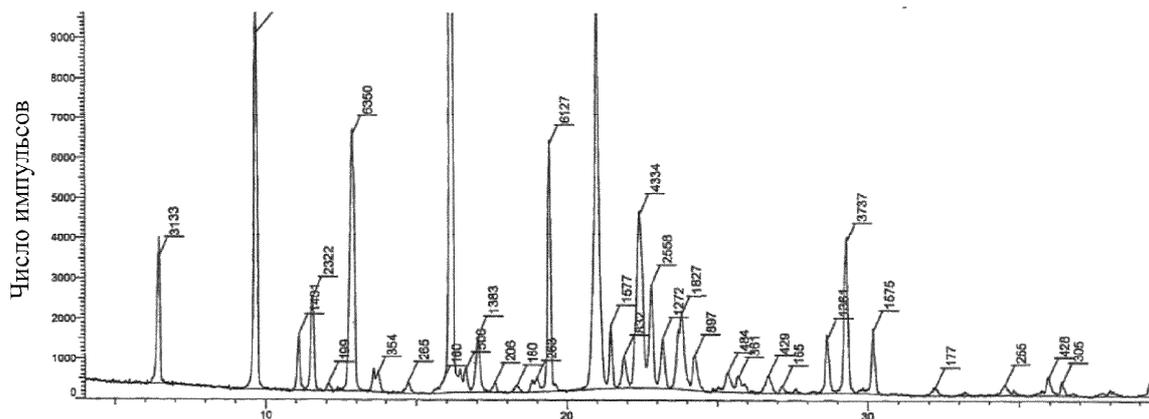
26. Применение по п.25, при котором трижды негативный рак молочной железы является неоперабельным или метастатическим.

27. Применение фумарата по любому из пп.1-10 или его фармацевтической композиции для лечения субъекта с раком поджелудочной железы.



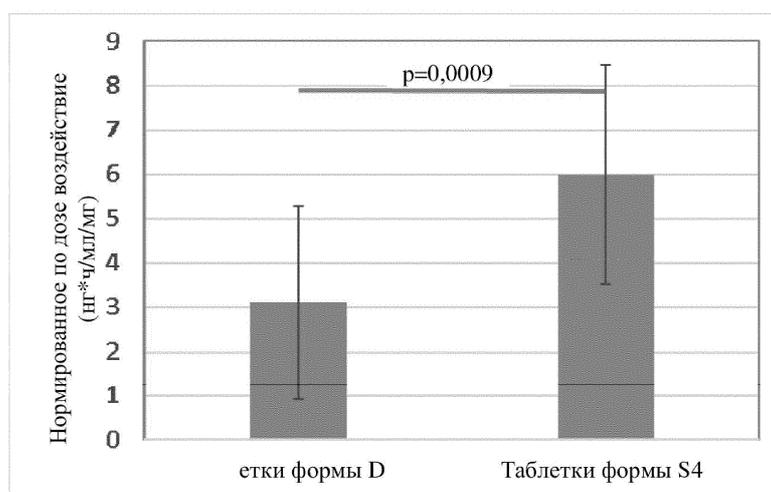
2-тета (сгруппированные два тета-тета) WL=1,54060

Фиг. 1



2-тета (сгруппированные два тета-тета) WL=1,54060

Фиг. 2



Фиг. 3

