

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **043302**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.05.10**

**(51)** Int. Cl. *A61K 9/16* (2006.01)  
*A61K 9/19* (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**202190616**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2019.09.25**

---

**(54) ЛИОФИЛИЗАТ ТРЕОСУЛЬФАНА**

---

**(31)** 18196967.6

**(32)** 2018.09.26

**(33)** EP

**(43)** 2021.06.25

**(86)** PCT/EP2019/075832

**(87)** WO 2020/064819 2020.04.02

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:

**МЕДАК ГЕЗЕЛЬШАФТ  
ФЮР КЛИНИШЕ  
ШПЕЦИАЛЬПРЕПАРАТЕ МБХ (DE)**

**(72)** Изобретатель:

**Биаллек Себастьян (DE)**

**(74)** Представитель:

**Харин А.В., Стойко Г.В., Буре Н.Н.,  
Галухина Д.В. (RU)**

**(56)** WO-A1-2015107534

Radoslav Chekerov ET AL.: "Treosulfan in the Treatment of Advanced Ovarian Cancer - Results of a German Multicenter Non-interventional Study", ANTICANCER RESEARCH, 1 December 2015 (2015-12-01), pages 6869-6876, XP055533170, Retrieved from the Internet: URL:<http://ar.iiarjournals.org/content/35/12/6869.full.pdf#page=1&view=FitH> [retrieved on 2018-12-12], abstract

SLATTER MARY A. ET AL.: "Treosulfan and Fludarabine Conditioning for Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Children with Primary Immunodeficiency: UK Experience", BIOLOGY OF BLOOD AND MARROW TRANSPLANTATION, KLUGE CARDEN JENNINGS PUBLISHING, CHARLOTTESVILLE, VA, US, vol. 24, no. 3, 16 November 2017 (2017-11-16), pages 529-536, XP085351987, ISSN: 1083-8791, DOI: 10.1016/J.BBMT.2017.11.009, abstract

---

**(57)** Описан лиофилизат треосульфана, который обладает благоприятными характеристиками с точки зрения короткого времени восстановления, высокой чистоты и стабильности и который особенно полезен при лечении рака и для кондиционирующей терапии перед трансплантацией костного мозга или стволовых клеток крови.

---

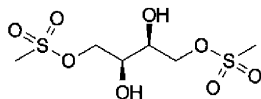
**B1**

**043302**

**043302 B1**

Изобретение относится к лиофилизату, содержащему новую кристаллическую форму В треоосульфана, причем лиофилизат имеет очень благоприятные характеристики для применения в качестве фармацевтической композиции и, в частности, может быть быстро восстановлен с образованием готовых к употреблению растворов и демонстрирует высокую стабильность и чистоту.

Треоосульфан, химическое название которого (2S,3S)-(-)-1,4-ди(метансульфо)-2,3-бутандиол или L-треитол-1,4-ди(метансульфонат), имеет следующую химическую формулу:



Химический синтез треоосульфана описан в DE 1 188 583 и DE 1 193 938 и осуществляется, например, путем взаимодействия L-1,4-дибромбутан-2,3-диола и серебряной соли метансульфоновой кислоты.

Треоосульфан представляет собой дигидроксипроизводное бусульфана и действует как противоопухолевый агент, учитывая его способность алкилировать ДНК. Он используется для лечения рака яичников сам по себе или в комбинации с другими химиотерапевтическими средствами, например мелфаланом и дакарбазином (Baunes et al., Blood 96 (11): 170a, Abstr. № 731, 2000). Для лечения рака яичников монотерапия треоосульфаном включает его введение пациенту в количестве 8 г/м<sup>2</sup> площади поверхности тела, тогда как комбинированная терапия треоосульфаном и цисплатином включает введение треоосульфана в количестве 5 г/м<sup>2</sup>.

Треоосульфан также использовался для лечения запущенных, неоперабельных немелкоклеточных карцином легких (Pawel et al., Onkologie 21: 316-319; 1998).

Кроме того, в EP 1227808 A1 раскрыто применение треоосульфана при подготовительной (кондиционирующей) терапии перед трансплантацией костного мозга или стволовых клеток крови пациенту. При такой кондиционирующей терапии введение треоосульфана можно эффективно комбинировать с введением дополнительных агентов, например циклофосфида, карбоплатина, тиотепа, мелфалана, флударабина, иммуносупрессорных антител или облучения организма. По сравнению с использованием бусульфана можно преимущественно или полностью избежать серьезных побочных эффектов. Можно даже использовать высокие дозы треоосульфана, не вызывая серьезной токсичности для печени, легких, почек или ЦНС. Фаза кондиционирования включает период от 2 до 7 дней с общей дозой треоосульфана не менее 20 г/м<sup>2</sup> площади поверхности тела перед аллогенной трансплантацией костного мозга или гемопоэтических стволовых клеток. Треосульфан коммерчески доступен в виде капсул для перорального применения и стерильного порошка, состоящего из треоосульфана, для приготовления раствора для инфузий. Раствор вводят внутривенно в течение примерно 15-30 мин. Треосульфан в этих продуктах представляет собой кристаллическую форму, демонстрирующую картину рентгеновской порошковой дифракции (XRPD) с характеристическими пиками при 7,69, 15,43, 18,74, 19,14, 19,77, 20,15, 20,28, 21,24, 21,74, 22,07, 22,96, 23,24, 24,36, 25,29, 28,05, 28,28, 28,97, 30,10 и 40,55 ± 0,2 градусов 2θ. Эта кристаллическая форма обозначена как форма А, и ее диаграмма XRPD показана на фиг. 2.

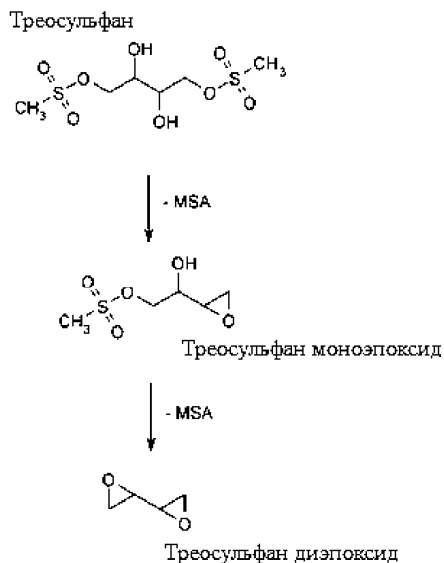
Для приготовления раствора для инфузий коммерческий стерильный порошок растворяют, например, в воде до концентрации 50 мг/мл, и полученный раствор разбавляют, например, изотоническим раствором NaCl. Однако воду, используемую в качестве растворителя, необходимо нагреть до 30°C на стадии восстановления. Кроме того, необходимо полностью удалить порошок со стенок флакона. Этот шаг важен, чтобы избежать прилипания частиц порошка к стенке. Такие липкие частицы формы А треоосульфана трудно растворить, и они замедляют полное растворение. Весь процесс приготовления раствора для инфузий из стерильного порошка, включая приготовление флакона, необходимый подогрев воды и полное растворение порошка, занимает около 10 мин. Кроме того, использование теплого растворителя увеличивает риск нежелательной деградации.

WO 2015/107534 относится к двум предположительно новым и различным полиморфным формам треоосульфана, обозначенным как форма I и форма II. В этом документе отсутствует какое-либо указание на то, как можно получить форму II, и, следовательно, отсутствует возможность раскрытия формы II. Способ получения формы I описан только в очень общем виде и, как утверждается, просто включает перекристаллизацию из органических растворителей или их смесей с указанием некоторых предпочтительных органических растворителей. Никакого описания конкретного способа получения формы I в данном документе не раскрыто. Картина рентгеновской порошковой дифракции, приведенная для формы I, сильно напоминает картину кристаллической формы А, коммерчески доступного продукта, которая представлена на фиг. 2 ниже, что позволяет предположить, что эти формы фактически идентичны. Наконец, в WO 2015/107534 также описаны лиофилизированные составы, которые, как утверждается, обычно включают треоосульфан в форме I.

Однако известные лиофилизаты страдают несколькими недостатками. В частности, известные лиофилизаты требуют длительного времени для их восстановления, а содержание в них метансульфоновой кислоты и воды, в частности, после хранения, является нежелательно высоким, и, следовательно, их чистота и стабильность неудовлетворительны. Более того, оптимизированный процесс лиофилизации, который, по-видимому, использовался, приводит к получению образцов с сильно различающимися свойствами.

ми и, следовательно, не имеющими желаемой воспроизводимости, что очень проблематично, учитывая, что эти лиофилизаты предназначены для применения в качестве фармацевтических композиций.

Метансульфоновая кислота (MSA) представляет собой продукт разложения тресульфана, как показано на следующей схеме реакции.



Следовательно, его присутствие указывает на разложение тресульфана. Благодаря высокой кислотности она ускоряет гидролиз сложноэфирных групп тресульфана и, таким образом, усиливает процесс разложения. По этой причине количество метансульфоновой кислоты должно быть как можно меньшим.

Таким образом, целью настоящего изобретения является устранение недостатков известных продуктов, содержащих тресульфан.

Эта цель достигается с помощью лиофилизата тресульфана по пп.1-10 формулы.

Изобретение также относится к способу получения лиофилизата тресульфана по пп.11-21 и лиофилизата тресульфана для применения в медицине по пп.22-24.

Лиофилизат согласно изобретению отличается тем, что он включает кристаллическую форму В тресульфана, демонстрирующую картину рентгеновской порошковой дифракции, имеющую характеристические пики при  $20,87$  и  $23,47 \pm 0,20$  градусов  $2\Theta$ .

Предпочтительно, чтобы кристаллическая форма В показывала картину рентгеновской порошковой дифракции с пиками при  $20,87$ ,  $23,47$ ,  $26,20$ ,  $29,65$ ,  $30,81$ ,  $34,54$ ,  $35,30$ ,  $36,87$  и  $46,24 \pm 0,20$  градусов  $2\Theta$ .

Более предпочтительно, чтобы кристаллическая форма В показывала картину рентгеновской порошковой дифракции, по существу такую, как показано на фиг. 1.

Еще более предпочтительно, чтобы кристаллическая форма В показывала картину рентгеновской порошковой дифракции, не имеющую пиков по крайней мере в одной и предпочтительно во всех следующих областях от а до f, выраженных в градусах  $2\Theta$ :

Область	Градусы $2\Theta$
a	19,00 - 19,50
b	20,00 - 20,65
c	21,50 - 23,21
d	23,75 - 24,95
e	27,40 - 28,35
f	30,00 - 30,60

Кристаллическая форма В предпочтительно также характеризуется пространственной группой и параметрами a, b, c,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  элементарной ячейки, а также объемом элементарной ячейки, полученным с помощью анализа рентгеновской дифракции монокристаллов (SCXRD), структурные данные для которого приведены в следующей таблице вместе с дополнительной информацией, особенно о качестве подгонки по сравнению с данными коммерческой формы А.

	Форма А	Форма В (согласно изобретению)
Пространственная группа	орторомбическая, P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	моноклиническая, P2 <sub>1</sub>
a	5,5306(5) Å	5,5692(9) Å
b	8,9220(8) Å	8,9469(15) Å
c	22,8442(18) Å	11,322(2) Å
α	90°	90°
β	90°	95,497(16)°
γ	90°	90°
V	1127,22(17) Å <sup>3</sup>	561,54(17) Å <sup>3</sup>
Z/Z'	4/1	2/1
Конечные R-индексы (данные наблюдений, I > 2σ(I))	R1 = 0,0256, wR2 = 0,0462	R1 = 0,0798, wR2 = 0,1956
R-индексы (все данные)	R1 = 0,0280, wR2 = 0,0471	R1 = 0,0912, wR2 = 0,2065
Точность аппроксимации	0,966	1,163
T	173(2) K	173(2) K

a, b и c - длины краев элементарной ячейки;

α, β и γ - углы между краями элементарной ячейки;

V - объем элементарной ячейки;

Z/Z' - количество молекул в элементарной ячейке;

R1 и wR2 - значения достоверности;

T - температура, при которой был проведен анализ.

Как видно из этих данных, форма В имеет две молекулы на элементарную ячейку (пространственная группа P2<sub>1</sub>) и объем 561,5 Å<sup>3</sup>, тогда как форма А имеет четыре молекулы на элементарную ячейку (пространственная группа P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>) и объем 1127,22 Å<sup>3</sup>.

Лиофилизат согласно изобретению содержит, в частности, по меньшей мере 96 мас.%, предпочтительно по меньшей мере 97 мас.%, более предпочтительно по меньшей мере 98 мас.% и еще более предпочтительно по меньшей мере 99 мас.% кристаллической формы В относительно объединенного количества кристаллической формы В и кристаллической формы А.

Таким образом, лиофилизат согласно изобретению содержит только очень небольшие количества обычной кристаллической формы А и очень большие количества кристаллической формы В. Высокая полиморфная чистота особенно выгодна для применения лиофилизата согласно изобретению в качестве фармацевтической композиции.

В следующем предпочтительном варианте лиофилизат согласно изобретению содержит по меньшей мере 75 мас.%, в частности по меньшей мере 80 мас.%, предпочтительно по меньшей мере 85 мас.%, более предпочтительно по меньшей мере 90 мас.% и еще более предпочтительно по меньшей мере 95 мас.% кристаллической формы В по отношению к количеству лиофилизата.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления лиофилизат согласно изобретению содержит менее 20 мас.%, в частности менее 15 мас.%, предпочтительно менее 10 мас.% и более предпочтительно менее 5 мас.% аморфной фазы по отношению к количеству лиофилизата.

Небольшое количество аморфной фазы позволяет избежать нескольких существенных недостатков, связанных с этой фазой. Прежде всего, аморфная фаза имеет тенденцию к неконтролируемой кристаллизации. Кроме того, она быстрее разлагается, имеет более высокое содержание остаточной влаги после сушки, демонстрирует худшую текучесть и смачиваемость и легче становится электростатически заряженной. Все эти свойства нежелательны для лиофилизата, используемого в фармацевтических целях.

Лиофилизат согласно изобретению неожиданно демонстрирует комбинацию полезных свойств, которые, как предполагается, вызваны большим количеством кристаллической формы В треоосульфана. В частности, требуется очень короткое время для его полного растворения в средах, обычно используемых для восстановления, с получением готовых к употреблению растворов для инъекций или инфузий. В качестве таких сред обычно используют изотонический физиологический раствор и вода для инъекций. Для восстановления также возможны другие фармацевтически приемлемые растворы, например, лактатные растворы Рингера или фосфатные буферы. Очень короткий период времени для восстановления очень благоприятен, поскольку он позволяет персоналу клиники готовить свежие готовые к употребле-

нию раствора непосредственно перед предполагаемым введением пациентам, без необходимости выдерживать длительное время ожидания для полного растворения. Аналогичным образом, при таком коротком времени восстановления снижается риск нежелательных реакций разложения треоосульфана.

Кроме того, лиофилизат согласно изобретению также обладает высокой чистотой и стабильностью, о чем свидетельствует очень высокое содержание в нем активного ингредиента треоосульфана и очень небольшое содержание продукта разложения метансульфоновой кислоты.

В предпочтительном варианте осуществления лиофилизат согласно изобретению содержит по меньшей мере 95 мас.%, в частности по меньшей мере 95 мас.%, предпочтительно по меньшей мере 98 мас.% и более предпочтительно по меньшей мере 99 мас.% треоосульфана.

Кроме того, лиофилизат согласно изобретению имеет лишь небольшое содержание метансульфоновой кислоты и включает, в частности, менее 0,2 мас.%, предпочтительно менее 0,1 мас.% и более предпочтительно менее 0,05 мас.% метансульфоновой кислоты. Особенно небольшое количество метансульфоновой кислоты является одним из разумных объяснений высокой стабильности лиофилизата по изобретению при хранении, поскольку эта кислота ускоряет гидролиз сложноэфирных групп треоосульфана и, следовательно, способствует его разложению.

Даже после хранения лиофилизата в течение трех месяцев при 40°C и относительной влажности 75% он содержит, в частности, менее 0,2 мас.%, предпочтительно менее 0,1 мас.% и более предпочтительно менее 0,05 мас.% метансульфоновой кислоты. Это показатель превосходной стабильности лиофилизата согласно изобретению при хранении, что делает его очень подходящим для применения в качестве фармацевтической композиции или ее компонента.

Дополнительным преимуществом лиофилизата согласно изобретению является то, что он может быть восстановлен с использованием растворителя, имеющего температуру около 20°C, что позволяет отказаться от использования предварительно нагретых растворителей. Кроме того, не требуется громоздкий препарат для удаления липких кластеров коммерческой формы А со стенок флакона перед восстановлением.

Кроме того, лиофилизат согласно изобретению имеет лишь небольшое содержание воды и включает воду в количестве, в частности, менее 1 мас.%, предпочтительно менее 0,5 мас.% и более предпочтительно менее 0,1 мас.%, как определено титрованием по Карлу Фишеру.

Изобретение также относится к способу получения лиофилизата. Способ согласно изобретению включает сублимационную сушку водного раствора, содержащего треоосульфана.

Водный раствор, подвергнутый сублимационной сушке, в дальнейшем также обозначен как "пре-лиофилизированный раствор".

Предпочтительно, чтобы водный раствор содержал в качестве растворителя воду или смесь воды с по меньшей мере одним органическим растворителем. Органический растворитель представляет собой, в частности, уксусную кислоту.

Количество воды в растворителе составляет, в частности, от 80 до 100 мас.% и предпочтительно от 90 до 100 мас.%. Количество уксусной кислоты в растворителе составляет, в частности, от 1 до 20 мас.% и предпочтительно от 2 до 10 мас.%.

Даже при использовании пре-лиофилизированного раствора, который содержит уксусную кислоту, полученный лиофилизат согласно изобретению неожиданно содержит только очень небольшое количество уксусной кислоты и, в частности, менее 1,0 мас.%, предпочтительно менее 0,5 мас.% и более предпочтительно менее 0,2 мас.% уксусной кислоты.

Водный пре-лиофилизированный раствор обычно содержит треоосульфана в концентрации от 50 до 150 мг/г, в частности от 50 до 100 мг/г и более предпочтительно от 50 до 80 мг/г.

Пре-лиофилизированный раствор может также включать добавки, такие как солибулизаторы, например полисорбат, циклодекстрины, додецилсульфат натрия, полоксамер и тому подобное; хелатирующие агенты, например, натрия EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота), ДТРА (диэтиленetriаминпентауксусная кислота), кальтеридол и т.п.; антиоксиданты, например бутилированный гидрокситолуол, бутилированный гидроксианизол, метионин, глутатион, метабисульфит натрия, альфа-токоферол, тиогликолят натрия, цистеин, аскорбиновая кислота и т.п.; агенты, регулирующие pH, и буферные агенты, например гидроксид натрия, соляная кислота, лимонная кислота, ацетат натрия, аргинин, аспарагиновая кислота, бикарбонат натрия, цитрат натрия, цитрат динатрия, цитрат тринатрия, малеиновая кислота, серная кислота, гидрофосфат и т.п.; наполнители, например аминокислоты, такие как аланин, аргинин и т.п.; производные сахара, например сахароза, декстроза, маннит, трегалоза, манноза и т.п.; или полимеры, например полиэтиленгликоль, желатин, декстран и т.п.; стабилизаторы и агенты, регулирующие тоничность, например хлорид натрия, хлорид магния, сульфат натрия и т.п.

Перед тем, как подвергнуть водный раствор процессу сублимационной сушки, его обычно фильтруют с использованием обычных фильтров, например фильтра 0,22 мкм, для получения стерильного раствора.

Сублимационная сушка пре-лиофилизированного раствора обычно осуществляется с использованием машин для сублимационной сушки, обычно используемых в фармацевтических целях. Как правило,

раствор заливают в подходящие контейнеры, такие как флаконы, и контейнеры помещают в обычную сублимационную сушилку с охлаждаемыми и нагреваемыми поверхностями, на которых раствор может подвергаться воздействию различных температур процесса сублимационной сушки. Для высушивания раствор обычно замораживают и подвергают пониженному атмосферному давлению. В результате в значительной степени происходит сублимация растворителя из замороженного раствора, который осаждается, например, на более холодных участках сублимационной сушилки, предусмотренной для этого. Затем обычно следует вторичная сушка при более высоких температурах. После завершения сублимационной сушки полученному лиофилизату обычно дают нагреться до комнатной температуры, а контейнеры, содержащие лиофилизат, герметично закрывают в стерильных условиях.

В предпочтительном варианте способ согласно изобретению включает:

- (a) обеспечение водного раствора, имеющего первую температуру,
- (b) замораживание водного раствора, при этом водный раствор охлаждают от первой температуры до температуры замораживания при скорости охлаждения не более 3 К/мин, и
- (c) высушивание замороженного раствора, полученного на стадии (b), с получением лиофилизата.

Способ согласно изобретению неожиданно и очень выгодно позволяет использовать такую довольно низкую скорость охлаждения, поскольку более высокие скорости охлаждения, используемые в обычных процессах, требуют применения очень сложного оборудования. Следовательно, способ согласно изобретению очень экономичен.

Более того, предпочтительно, чтобы скорость охлаждения на стадии (b) составляла не более 2 К/мин, предпочтительно не более 1,5 К/мин и более предпочтительно не более 1,3 К/мин. В альтернативном варианте скорость охлаждения на стадии (b) составляет, в частности, от 0,05 до 1,5 и предпочтительно от 0,1 до 1,3 К/мин.

Первая температура в способе по изобретению составляет, в частности, от 15 до 95°C, предпочтительно от 20 до 50°C и более предпочтительно от 25 до 35°C.

Температура замораживания согласно способу составляет, в частности, -40°C или меньше, предпочтительно от -60 до -40°C и более предпочтительно от -50 до -40°C.

Замороженный раствор выдерживают при температуре замораживания, в частности по меньшей мере 1 час, предпочтительно от 1 до 10 ч и более предпочтительно от 2 до 8 ч.

В другом предпочтительном варианте осуществления способа высушивание на стадии (c) включает первичное высушивание, которое проводят, подвергая замороженный раствор воздействию температуры -25°C или выше, предпочтительно температуры от -15 до 0°C, и подвергая замороженный раствор воздействию давления от 0,03 до 1,0 мбар, предпочтительно от 0,1 до 0,6 мбар и более предпочтительно от 0,3 до 0,5 мбар.

В альтернативном дополнительном предпочтительном варианте осуществления способа высушивание на стадии (c) включает первичное высушивание, которое проводят, подвергая замороженный раствор воздействию температуры 0°C или выше, предпочтительно температуры от 0 до 60°C, более предпочтительно температуры от 20 до 60°C, еще более предпочтительно температуры от 30 до 50°C, и подвергая замороженный раствор воздействию давления от 0,03 до 1,0 мбар, предпочтительно от 0,1 до 0,6 мбар и более, предпочтительно от 0,3 до 0,5 мбар.

Первичное высушивание предпочтительно проводят в течение по меньшей мере 5 ч, в частности, по меньшей мере 10 ч.

Также предпочтительно, чтобы после первичного высушивания проводили вторичное высушивание, подвергая продукт первичного высушивания воздействию температуры по меньшей мере 30°C, предпочтительно 30-50°C, и подвергая продукт первичного высушивания воздействию давления от 0,03 до 1,0 мбар, предпочтительно от 0,1 до 0,6 мбар и более предпочтительно от 0,3 до 0,5 мбар.

Вторичное высушивание предпочтительно проводить в течение по меньшей мере 2 ч, в частности по меньшей мере 4 ч.

Способ согласно изобретению позволяет получать лиофилизаты с превосходными свойствами с высокой воспроизводимостью, что является существенным преимуществом по сравнению с традиционными способами, которые дают продукты, существенно отличающиеся по своим свойствам.

Лиофилизат согласно изобретению также оказался особенно полезным в медицине. Следовательно, изобретение также относится к лиофилизату согласно изобретению для применения в качестве лекарственного средства. В дополнительном воплощении изобретение также относится к лиофилизату согласно изобретению для применения в лечении рака и, в частности, рака яичников. В еще одном варианте осуществления изобретение также относится к лиофилизату согласно изобретению для применения в кондиционирующей терапии перед трансплантацией костного мозга или стволовых клеток крови.

В дополнительном аспекте изобретение также относится к применению лиофилизата согласно изобретению для лечения рака или для кондиционирующей терапии перед трансплантацией костного мозга или стволовых клеток крови.

В дополнительном аспекте изобретение также относится к способу лечения пациентов, страдающих от рака, или к способу кондиционирования пациентов перед трансплантацией костного мозга или ство-

ловых клеток крови, которые включают введение пациентам раствора, приготовленного из лиофилизата согласно изобретению.

Изобретение более подробно поясняется ниже со ссылкой на неограничивающие примеры, которые также включают методы, которые, в частности, подходят для определения вышеупомянутых свойств лиофилизата согласно изобретению и кристаллической формы В и А треоосульфана.

### Примеры

Методы и аппаратура.

Следующие методы использовались для получения картин рентгеновской порошковой дифракции (XRPD), для исследований с помощью рентгеновской дифракции монокристаллов (SCXRD), для определения количества кристаллической формы В и кристаллической формы А и количества аморфной фазы и для определения количества треоосульфана, уксусной кислоты, метансульфоновой кислоты и воды.

Более того, общая процедура приготовления стеклянных флаконов и определения характеристик восстановления, а также устройства, используемого для сублимационной сушки, также указаны ниже.

Общая процедура - приготовление стеклянных флаконов.

Стеклянные флаконы для лиофилизации перед использованием ополаскивали очищенной водой и депирогенизировали в течение 2 ч при 300°C. Пробки для лиофилизации автоклавируют (121°C, 20 мин, 2 бар) и сушили в течение 7 ч при 110°C.

Сублимационная сушилка.

Сублимационную сушку проводили в сублимационной сушилке GT 2 (производитель: Hof Sonderanlagenbau (Lohra, Германия)) с площадью полки 0,4 м<sup>2</sup> и емкостью ледового конденсатора 8 кг, включая средства измерения перепада давления.

Рентгеновская порошковая дифракция (XRPD).

Соответствующий образец вводили в стандартный стеклянный капилляр ( $\varnothing = 0,7$  мм) после тщательного ручного измельчения пестиком в ступке. Картины рентгеновской порошковой дифракции регистрировали при комнатной температуре с использованием дифрактометра Bruker D8 Advance (Cu-K $\alpha$ 1 = 1,54059 Å, монохроматор первичного луча Johansson, позиционно-чувствительный детектор) в режиме пропускания с вращением образца. Данные были собраны в диапазоне от 3 до 50 градусов 2 $\theta$ . Напряжение и ток трубки были установлены на 40 кВ и 40 мА соответственно.

Рентгеновская дифракция монокристаллов (SCXRD).

Данные рентгеновской дифракции монокристаллов регистрировали с использованием дифрактометра "Rigaku Xcalibur, Sapphire2, large Be window", оборудованного генератором рентгеновских лучей, содержащим молибденовый анод (Mo-K $\alpha$  = 0,71073 Å).

Определение количества форм В и А с помощью XRPD и анализа Ритвельда Для определения количества кристаллической формы В и А треоосульфана соответствующий образец вводили в стандартный стеклянный капилляр ( $\varnothing = 0,7$  мм) после тщательного ручного измельчения пестиком в ступке. Картины рентгеновской порошковой дифракции регистрировали при комнатной температуре с использованием дифрактометра Bruker D8 Advance (Cu-K $\alpha$ 1 = 1,54059 Å, монохроматор первичного луча Johansson, позиционно-чувствительный детектор) в режиме пропускания с вращением образца. Данные были собраны в диапазоне от 4 до 50 градусов 2 $\theta$  в течение 4 ч. Напряжение и ток трубки были установлены на 40 кВ и 40 мА соответственно. Полученные данные были подвергнуты количественному анализу по Ритвельду с помощью программы TOPAS.

Определение количества аморфной фазы с помощью XRPD и анализа по Ритвельду с внутренним стандартом.

Для определения количества аморфной фазы соответствующий образец смешивали с 25 мас.% CaF<sub>2</sub> (Aldrich Chemistry, Lot #МКВР1959V, фторид кальция безводный, 99,99%) в качестве внутреннего стандарта. После тщательного ручного измельчения пестиком в ступке смесь вводили в стандартный стеклянный капилляр ( $\varnothing = 1,0$  мм). Картины рентгеновской порошковой дифракции регистрировали при комнатной температуре с использованием дифрактометра Bruker D8 Advance (Cu-K $\alpha$ 1 = 1,54059 Å, монохроматор первичного луча Johansson, позиционно-чувствительный детектор) в режиме пропускания с вращением образца. Данные были собраны в диапазоне от 4 до 50 градусов 2 $\theta$  в течение 12 ч. Напряжение и ток трубки были установлены на 30 кВ и 30 мА соответственно. Полученные данные были подвергнуты количественному анализу по Ритвельду с помощью программы TOPAS.

Кристаллическая форма А и кристаллическая форма В были единственными кристаллическими фазами, которые можно было идентифицировать.

Определение количества треоосульфана методом RP-HPLC.

Количество треоосульфана в соответствующем образце определяли с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (RP-HPLC), как указано ниже:

Оборудование для ВЭЖХ	Agilent Technologies
Колонка	Luna C18(2), 5 мкм, 250 × 4,6 мм (phenomenex)
Подвижная фаза А	720 мл разбавителя + 30 мл метанола Изократический, 25 мин.
Расход	0,8 мл/мин
Температура колонки	40°C
Вводимый объем	20 мкл
Разбавитель	697 мг K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /1000 мл, pH 4.5 (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )
Детекция	Рефрактометрический детектор
Контрольный раствор	50 мг/мл тресульфана в разбавителе
Раствор образца	50 мг/мл тресульфана в растворителе для восстановления

Определение количества метансульфоновой кислоты с помощью HILIC.

Количество метансульфоновой кислоты (MSA) определяли с помощью жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий (HILIC), как указано ниже:

Оборудование для ВЭЖХ	
Колонка	Nucleodur HILIC (250 x 4,6 мм, 3 мкм)
Элюент	10 ммоль формиата аммония в H <sub>2</sub> O/ацетонитриле (7:93) (об./об.)
Расход	1,4 мл/мин
Температура колонки	45 °C
Вводимый объем	20 мкл
Детектор	35 °C
Продолжительность рабочего цикла	В 1,5 раза больше времени удерживания метансульфоновой кислоты
Детекция	Рефрактометрический детектор
Контрольный раствор 1	Растворили метансульфоновую кислоту в воде для ВЭЖХ до конечной концентрации 2,0 мг/мл.
Контрольный раствор 2	Разбавили контрольный раствор 1 элюентом до 0,1 мг/мл. Контрольный раствор 2 используется для количественного определения метансульфоновой кислоты в исследуемом растворе.
Испытуемый раствор	Растворяли образец для анализа в воде для ВЭЖХ до конечной концентрации 20 мг/мл.

Определение остаточного содержания уксусной кислоты с помощью парофазной газовой хроматографии (HS-GC).

Количество остаточной уксусной кислоты определяли с помощью HS-GC после этерификации до этилацетата.

Для подготовки образца лиофилизат из одного флакона восстанавливали водой, используя 20 мл воды на 1 г лиофилизата. 500 мкл восстановленного образца смешивали со 100 мкл насыщенного раствора NaHSO<sub>4</sub> и 50 мкл этанола в пробирке для GC. Пробирка для GC была плотно обжата. Все образцы были приготовлены в двух экземплярах.

Для приготовления стандартов готовили исходный раствор уксусной кислоты 1 мг/мл и разбавляли до 5 индивидуальных стандартов, содержащих от 25 до 0,5 мкг/мл в воде. Каждый исходный раствор (500 мкл) смешивали со 100 мкл насыщенного раствора NaHSO<sub>4</sub> и 50 мкл этанола в пробирке для GC.



Стандарты:	с (НОAc) мг/мл	Исходный раствор мкл	Вода мкл	NaHSO <sub>4</sub> мкл	Этанол мкл
0,05%	0,025	125	375	100	50
0,02%	0,01	50	450	100	50
0,01 %	0,005	25	475	100	50
0,005%	0,0025	12,5	488	100	50
0,001 %	0,0005	2,5	498	100	50

Стандарты подготовлены в двух экземплярах.

Метод GC для количественного определения остаточных растворителей был использован для определения количества уксусной кислоты в форме ее сложного этилового эфира (см. Ph.Eur. 2.4.24 Identification and control of residual solvents: System A). Хроматографические условия, используемые для количественного определения количества этилацетата, соответствуют методу USP 467 для определения остаточных растворителей.

Использовался следующий газовый хроматограф:

Изготовитель	Hewlett Packard
Тип	6890
Парофазный пробоотборник	7694, Agilent Technologies
Детектор	Пламенно-ионизационный детектор (ПИД)
Источник N <sub>2</sub>	Генератор азота G1000E, Parker
Источник H <sub>2</sub>	Генератор водорода PGH2100

Газовый хроматограф и дозатор равновесного пара работали при следующих условиях:

6890N		7694 Парофазный пробоотборник	
Программа термостата GC:		Размер петли:	1 мл
Начальная температура	35 °C	Термостат	85 °C
Начальное время	20 мин	Линия передачи	120°C
Расход	25 °C/мин	Петля	100°C
Конечная температура	250 °C	Время уравнивания	30 мин
Окончательное время	15 минут	Давление во флаконе	14 psi
Устройство для ввода пробы	Разделение, 160 °C	Нагнетание давления	0,15 мин
	Без разделения	Заполнение петли	0,5 мин
Детектор	ПИД 270 °C	Ввод	0,5 мин
	Вспомогательный азот		
Газ-носитель	Азот		
Поток	3,7 мл/мин		

Восстановительное поведение.

Характер растворения лиофилизатов определяли путем добавления воды для инъекций или 0,45 мас.% водного раствора NaCl при комнатной температуре с получением конечной концентрации примерно 50 мг/мл. Процесс восстановления контролировали в отношении времени растворения и поведения.

Определение количества воды методом "титрования по Карлу Фишеру".

Около 100 мг соответствующего образца отвешивали в стеклянный флакон, который закрывали крышкой с обжимом. Образец переносили в печь кулометра Карла Фишера, тип 756, печь для обработки образцов 774 фирмы Metrohm (Фильдерштадт, Германия), которую нагревали до 90°C. Через перегородку колпачка вводили инъекционную иглу, и образовавшийся водяной пар направляли непосредственно в титровальную камеру кулометра Карла Фишера через сухой азот. Измерение повторяли один раз. Пустые стеклянные флаконы использовали для поправки на контрольный опыт.

Пример 1 - получение лиофилизата кристаллической формы В.

Раствор, представленный в таблице ниже, был приготовлен путем взвешивания 8,0 г треоосульфана в одноразовом полипропиленовом (ПП) стакане. Добавляли необходимое количество растворителя, и треоосульфана растворяли при осторожном перемешивании до получения прозрачного раствора. Полное растворение проверяли визуальным контролем. Затем раствор фильтровали через фильтр 0,2 мкм. Раствором заполняли очищенные и депирогенизированные стеклянные флаконы номинальным объемом 20 мл.

Состав пре-лиофилизированного раствора, целевая доза 500 мг треоосульфана на флакон.

Концентрация треоосульфана	Растворитель	Количество на флакон
50 мг/г	90 мас.% воды для инъекций и	10,0 г
	10 мас.% уксусной кислоты	

Заполненные флаконы частично закрывали пробками, и образцы загружали в сублимационную сушилку и лиофилизировали в соответствии со следующим циклом лиофилизации.

Цикл лиофилизации.

Стадия	Температура полки	Температура ледового конденсатора	Давление	Временной интервал	
#	Описание	[°C]	[°C]	[мбар]	[ч:мин]
1	Загрузка	25	-	1000	00:01
2	Изменение температуры замораживания (1,17 К/мин)	-45	-	1000	01:00
3	Замораживание	-45	-	1000	05:00
4	Регулировка вакуума	-45	-70	0,05	00:30
5	Изменение температуры при первичном высушивании (0,28 К/мин)	-20	-70	0,05	01:30
6	Первичное высушивание	-20	-70	0,05	109:00
7	Изменение температуры при вторичном высушивании (0,25 К/мин)	40	-70	0,05	04:00
8	Вторичное высушивание	40	-70	0,05	20:00

Все полученные лиофилизаты были идентифицированы анализом XRPD как кристаллическая форма В треоосульфана.

Брикеты лиофилизатов были хорошо сформированными и однородными без видимых дефектов. Готовые брикеты лиофилизата растворяли в 10 мл воды для инъекций при комнатной температуре менее чем за 30 с при осторожном встряхивании. Предварительный нагрев растворителя не требовался. Удаление липких частиц, приставших к стенкам флаконов, также не требовалось. Остаточное количество воды в лиофилизатах было ниже предела количественного определения 0,005 мас.%.

Свойства лиофилизатов.

Количество воды	Время восстановления
Значения ниже предела количественного определения	меньше 30 с

Примеры 2 и 3 - получение лиофилизата формы В.

Растворы, представленные в таблице ниже, были приготовлены растворением треоосульфана в соответствующем растворителе (30 мин, 25°C, ультразвуковая ванна). Полученные растворы фильтровали, и отфильтрованные растворы помещали в очищенные и депирогенизированные стеклянные флаконы (10 флаконов на композицию), которые закрывали пробкой в положении для лиофилизации и герметично

закрывали в пакетах для лиофилизации.

Состав пре-лиофилизированного раствора, целевая доза т्रेसульфана 500 мг на флакон.

Пример	Концентрация т्रेसульфана	Растворитель	Количество на флакон
2	70 мг/г	98 мас.% воды для инъекций и 2 мас.% уксусной кислоты	7,14 г
3	70 мг/г	94 мас.% воды для инъекций и 6 мас.% уксусной кислоты	7,14 г

Образцы загружали в лиофилизатор и лиофилизировали в соответствии со следующим циклом лиофилизации.

Цикл лиофилизации.

Стадия		Температура полки	Температура ледового конденсатора	Давление	Временной интервал
#	Описание	[°C]	[°C]	[мбар]	[ч:мин]
1	Загрузка	25	-	1000	00:01
2	Изменение температуры замораживания (0,01 К/мин)	-45	-	1000	12:00
3	Замораживание	-45	-	1000	02:00
4	Изменение температуры отжига (0,67 К/мин)	-25	-	1000	00:30
5	Отжиг	-25	-	1000	05:00
6	Изменение температуры замораживания (0,67 К/мин)	-45	-	1000	00:30
7	Замораживание	-45	-	1000	00:30
8	Регулировка вакуума	-45	-70 °C	0,05	00:30
9	Изменение температуры при первичном высушивании (0,28 К/мин)	-20	-70 °C	0,05	01:30
10	Первичное высушивание	-20	-70 °C	0,05	14:00
11	Изменение температуры при вторичном высушивании (0,25 К/мин)	40	-70 °C	0,05	04:00
12	Вторичное высушивание	40	-70 °C	0,05	20:00

Все протестированные лиофилизаты были идентифицированы с помощью анализа XRPD как кристаллическая форма В т्रेसульфана.

Для тестирования восстановления флаконы вентилировали и открывали, и добавляли 10 мл 0,45% водного раствора NaCl (при комнатной температуре), используя 10 мл мерную пипетку. Брикетты лиофилизата из обоих примеров 2 и 3 восстанавливали только в течение 1 мин. Предварительный нагрев растворителя не требовался. Удаление липких частиц, приставших к стенкам флаконов, также не требовалось.

Для всех лиофилизатов было определено только очень небольшое количество остаточной воды. Бо-

лее того, все образцы не содержали примесей и показали одинаковое высокое содержание треоосульфана. Содержание уксусной кислоты было ниже предела обнаружения анализом HS-GC 0,003 мас. %.

Свойства лиофилизатов.

Пример	Количество треоосульфана [ мас. %]	Количество воды [ мас. %]	Количество уксусной кислоты [ мас. %]	Время восстановления
2	100	меньше 0,1	Ниже предела обнаружения	1 мин
3	100	меньше 0,1	Ниже предела обнаружения	1 мин

Пример 4 - получение лиофилизата кристаллической формы В.

Раствор, представленный в таблице ниже, был приготовлен путем взвешивания 10 г треоосульфана в 150 мл полипропиленовом (ПП) стакане. Добавляли растворитель, и треоосульфан растворяли при перемешивании при температуре окружающей среды 22°C. Полученным раствором наполняли очищенные и депирогенизированные стеклянные флаконы номинальным объемом 20 мл.

Состав пре-лиофилизированного раствора, целевая доза около 1000 мг треоосульфана на флакон.

Концентрация треоосульфана	Растворитель	Количество на флакон
75 мг/г	90 мас. % воды для инъекций и 10 мас. % уксусной кислоты	13,3 г

Флаконы закрывали пробками в положении для лиофилизации и запаивали в пакеты для лиофилизации. Образцы загружали в лиофилизатор и лиофилизировали в соответствии со следующим циклом лиофилизации.

Цикл лиофилизации.

Стадия	Температура полки	Температура ледового конденсатора	Давление	Временной интервал	
#	Описание	[°C]	[°C]	[мбар]	[ч:мин]
1	Загрузка	45	-	атм.	00:20
2	Изменение температуры замораживания (0,23 К/мин)	15	-	атм.	02:10
3	Изотермическая инкубация	15	-	атм.	06:00
4	Изменение температуры замораживания (0,3 К/мин)	-45	-	1000	03:20
5	Замораживание	-45	-	1000	05:00
6	Изменение температуры отжига (1,33 К/мин)	-5	-	1000	00:30

7	Отжиг	-5	-	1000	05:00
8	Изменение температуры замораживания (0,4 К/мин)	-45	-	1000	01:40
9	Замораживание	-45	-	1000	00:30
10	Регулировка вакуума	-45	-70	0,05	00:30
11	Изменение температуры при первичном высушивании (0,44 К/мин)	-5	-70	0,05	01:30
12	Первичное высушивание	-5	-70	0,05	70:00
13	Изменение температуры при вторичном высушивании (0,19 К/мин)	40	-70	0,05	04:00
14	Вторичное высушивание	40	-70	0,05	20:00

"атм." означает атмосферное давление.

Все протестированные лиофилизаты были идентифицированы с помощью анализа XRPD как кристаллическая форма В треосульфана.

Полученные брикеты лиофилизата были приемлемыми. Для тестирования восстановления флаконы вентилировали и открывали, и добавляли 20 мл 0,45% водного раствора NaCl (около 22°C). Лيوфилизатные брикеты восстанавливаются в течение 1,5 мин. Предварительный нагрев растворителя не требовался. Удаление липких частиц, приставших к стенкам флаконов, также не требовалось.

Все образцы не содержали примесей и имели очень высокое содержание треосульфана. Содержание уксусной кислоты было очень низким.

Свойства лиофилизатов.

Количество треосульфана [ мас.% ]	Количество уксусной кислоты [ мас.% ]	Время восстановления
100	0,07	1,5 мин.

Пример 5 - получение лиофилизата кристаллической формы В.

Пре-лиофилизированный раствор получали смешиванием 52,5 г треосульфана и 603,75 г воды при перемешивании и температуре 30°C. Перемешивание продолжали 30 мин до полного растворения треосульфана. После фильтрации с использованием мембранного фильтра 0,2 мкм отфильтрованный раствор разливали в очищенные и депирогенизированные стеклянные флаконы.

Состав пре-лиофилизированного раствора, целевая доза 5000 мг треосульфана на флакон.

Концентрация треосульфана	Растворитель	Количество на флакон
80 мг/г	Вода для инъекций	62,5 г

Флаконы закрывали пробками в положении для лиофилизации и запаивали в пакеты для лиофилизации. Образцы загружали в лиофилизатор и лиофилизировали в соответствии со следующим циклом лиофилизации.

## Цикл лиофилизации.

Стадия		Температура полки	Температура ледового конденсатора	Давление	Временной интервал
#	Описание	[°C]	[°C]	[мбар]	[ч:мин]
1	Загрузка	30	-	атм.	00:01
2	Изменение температуры замораживания (1,0 К/мин)	-45	-	атм.	01:15
3	Замораживание	-45	-	атм.	03:00
4	Изменение температуры отжига (1,14 К/мин)	-5	-	атм.	00:35
5	Отжиг	-5	-	атм.	02:00
6	Изменение температуры замораживания (1,17 К/мин)	-45	-	атм.	00:35
7	Замораживание	-45	-	атм.	01:00
8	Регулировка вакуума	-45	-70	0,38	00:30
9	Изменение температуры при первичном высушивании (1,0 К/мин)	40	-70	0,38	01:25
10	Первичное/вторичное высушивание	40	-70	0,38	77:00

"атм." означает атмосферное давление.

Все полученные лиофилизаты были идентифицированы с помощью анализа XRPD как кристаллическая форма В треоосульфана.

Полученные брикеты лиофилизата были однородными без дефектов. Для тестирования восстановления флаконы вентилировали, открывали и добавляли 100 мл 0,45% водного раствора NaCl (при комнатной температуре), чтобы получить конечную концентрацию треоосульфана 50 мг/мл. Брикеты лиофилизата восстанавливались всего за 30 с. Предварительный нагрев растворителя не требовался. Удаление липких частиц, приставших к стенкам флаконов, также не требовалось.

Все лиофилизаты показали очень высокое количество треоосульфана и очень низкое количество остаточной воды.

## Свойства лиофилизатов.

Количество треоосульфана	Количество Вода	Время восстановления
[ мас. % ]	[ мас. % ]	
99,97	0,04	30 сек

Образец лиофилизата хранили при 80°C в течение 96 ч. Хранившийся образец все еще показал очень высокое содержание треоосульфана больше 99,4 мас.%. Содержание метансульфоновой кислоты было ниже 0,05% в начале испытания и 0,05% после хранения, что доказывает, что лиофилизат очень стабилен.

## Свойства лиофилизата после хранения при 80°C в течение 96 ч.

Время	Количество треоосульфана [ мас. % ]	Количество метансульфоновой кислоты [ мас. % ]
0 ч	100,3	< 0,05
96 ч	> 99,4	0,05

Пример 6 - получение лиофилизата кристаллической формы В.

Раствор композиции, представленной в таблице ниже, готовили путем взвешивания воды в стек-

ляном стакане и доведения ее температуры до 30°C с использованием водяной бани. Добавляли соответствующее количество треоосульфана и смесь перемешивали до полного растворения. Полученный раствор фильтровали, и отфильтрованный раствор немедленно заливали в очищенные и депирогенизированные стеклянные флаконы, которые прокаливали при 20°C.

Состав пре-лиофилизированного раствора, целевая доза около 1000 мг треоосульфана на флакон.

Концентрация треоосульфана	Растворитель	Количество на флакон
56 мг/г	Вода	17,95 г

Флаконы закрывали пробкой в положении для лиофилизации и запаивали в пакеты для лиофилизации. Образцы загружали в лиофилизатор и лиофилизировали в соответствии со следующим циклом лиофилизации.

Цикл лиофилизации.

Стадия	Температура полки	Температура ледового конденсатора	Давление	Временной интервал	
#	Описание	[°C]	[°C]	[мбар]	[ч:мин]
1	Загрузка	20	-	атм.	00:01
2	Изменение температуры охлаждения (0,3 К/мин)	15	-	атм.	00:17
3	Изотермическая инкубация	15	-	атм.	06:00
4	Изменение температуры замораживания (0,3 К/мин)	-45	-	1000	03:20
5	Замораживание	-45	-	1000	05:00
6	Изменение температуры отжига (0,1 °C/мин)	-15	-	1000	00:30
7	Отжиг	-15	-	1000	05:00
8	Изменение температуры замораживания (0,3 К/мин)	-45	-	1000	01:40
9	Замораживание	-45	-	1000	00:30
10	Регулировка вакуума	-45	-70	0,05	00:30
11	Изменение температуры при первичном высушивании	-5	-70	0,05	01:30
12	Первичное высушивание	-5	-70	0,05	70:00
13	Изменение температуры при вторичном высушивании	40	-70	0,05	04:00
14	Вторичное высушивание	40	-70	0,05	20:00

Полученные лиофилизаты были идентифицированы как форма В треоосульфана с помощью XRPD-анализа.

Все лиофилизаты показали очень высокое количество треоосульфана и очень низкое количество остаточной воды. Кроме того, количество метансульфоновой кислоты также было очень низким.

Свойства лиофилизатов.

Количество треосульфана [ мас. % ]	Количество воды [ мас. % ]	Количество метансульфоновой кислоты [ мас. % ]
99,95	0,09	< 0,05

Образцы лиофилизатов хранили при 60°C в течение 30 дней, 70°C в течение 18 дней и 80°C в течение 5 дней. Независимо от условий хранения, по окончании испытаний все образцы полностью растворились в течение 1,5 мин в 20 мл 0,45% водного раствора NaCl. Предварительный нагрев растворителя не требовался. Удаление липких частиц, приставших к стенкам флаконов, также не требовалось.

Более того, все образцы по-прежнему показали очень высокое содержание треосульфана. Свойства лиофилизатов после хранения при температуре от 60 до 80°C.

t [сутки]	T [°C]	Количество треосульфана [ мас. % ]	Время восстановления
0	-	99,95	
30	60	99,82	1,5 мин.
18	70	99,94	1,5 мин.
5	80	99,94	1,5 мин.

Образцы лиофилизатов также хранили при 40°C и относительной влажности (rH) 75% в течение 3 месяцев. Все хранившиеся образцы по-прежнему показали очень высокое содержание треосульфана и очень низкое количество метансульфоновой кислоты, что свидетельствует об их превосходной стабильности.

Свойства лиофилизатов после хранения при 40°C/75% rH.

Время (месяцы)	T/rH [°C/%]	Количество треосульфана [ мас. % ]	Количество метансульфоновой кислоты [ мас. % ]
3	40/75	> 99,95	< 0,05%

Пример 6 - получение лиофилизата кристаллической формы В.

Пре-лиофилизированный раствор композиции, представленной в таблице ниже, готовили путем взвешивания воды в стеклянном стакане и доведения ее температуры до 30°C с использованием водяной бани. Добавляли соответствующее количество треосульфана и смесь перемешивали при 30°C в течение 30 мин. Полученный раствор фильтровали, и отфильтрованный раствор немедленно заливали в очищенные и депирогенизированные стеклянные флаконы, которые прокаливали при 30°C.

Состав пре-лиофилизированного раствора, целевая доза около 5000 мг треосульфана на флакон.

Концентрация треосульфана	Растворитель	Количество на флакон
80 мг/г	Вода для инъекций	62,5 г

Флаконы закрывали пробкой в положении для лиофилизации и запаивали в пакеты для лиофилизации. Образцы загружали в лиофилизатор и лиофилизировали в соответствии со следующим циклом лиофилизации.



## Цикл лиофилизации.

	Стадия	Температура полки	Температура ледового конденсатора	Давление	Время стадии
#	Описание	[°C]	[°C]	[мбар]	[ч:мин]
1	Загрузка	30	-	1000	00:01
2	Изменение температуры замораживания (1,17 К/мин)	-45	-	1000	01:04
3	Замораживание	-45	-	1000	06:00
4	Изменение температуры отжига (1 К/мин)	-10	-	1000	00:35
5	Отжиг	-10	-	1000	06:00
6	Изменение температуры замораживания (1 К/мин)	-45	-	1000	00:35
7	Замораживание	-45	-	1000	03:00
8	Регулировка вакуума	-45	≤ -70	0,33	00:30
9	Изменение температуры при первичном высушивании (0,94 К/мин)	35	≤ -70	0,33	01:25
10	Первичное высушивание	35	≤ -70	0,33	62:00

Полученные брикеты лиофилизата были однородными без дефектов. Для тестирования восстановления флаконы вентилировали, открывали и добавляли 100 мл 0,45% водного раствора NaCl (при комнатной температуре), чтобы получить конечную концентрацию треоосульфана 50 мг/мл. Брикет лиофилизата восстанавливался всего за 30 с. Предварительный нагрев растворителя не требовался. Удаление липких частиц, приставших к стенкам флаконов, также не требовалось.

Все лиофилизаты показали очень низкое количество остаточной воды и очень низкое количество метансульфонової кислоты. Последний был даже ниже предела обнаружения (LOD) 0,01 мас. %.

## Свойства лиофилизатов.

Количество треоосульфана [ мас. % ]	Количество воды [ мас. % ]	Количество метансульфонової кислоты [ мас. % ]	Время восстановления
101,79	0,01	<LOD (нижний предел обнаружения)	30 сек

Полученные лиофилизаты также подвергали анализу XRPD с использованием уточнения по Ритвельду для определения их кристалличности, а также количества в них формы А, формы В и аморфной фазы. Кристаллические формы А и В были единственными кристаллическими фазами, которые можно было обнаружить. Результаты представлены в следующей таблице.

## Результаты XRPD-анализов.

Количество кристаллического треоосульфана [ мас. % ]	Количество формы А и В [ мас. % ]		Количество аморфной фазы [ мас. % ]
	Форма А	Форма В	
96,3	0,5	99,5	3,7

Диаграмма XRPD лиофилизатов показана на фиг. 3.

Пример 8 - получение кристаллической формы В.

99,8 мг треоосульфана отвешивали во флакон (объем 4,0 мл), который был снабжен уплотнением из

PTFE (политетрафторэтилена) и мешалкой. Затем добавляли 1,5 мл смеси 80 мас.% воды и 20 мас.% изо-пропанола, предварительно нагретой до 65°C. Полученный раствор полностью набирали шприцем (объемом 5 мл) и фильтровали с использованием фильтра 0,2 мкм во второй сосуд (объем 4,0 мл). Шприц, второй флакон и фильтр перед использованием были прокалены при 65°C. Растворителям давали возможность испариться из открытого флакона при комнатной температуре досуха, что привело к образованию кристаллов.

Диаграмма XRPD полученных кристаллов формы В согласно изобретению показана на фиг. 1.

Кроме того, подходящий монокристалл формы В был выбран под микроскопом и проанализирован с помощью рентгеновской дифракции монокристаллов (SCXRD). Полученные данные представлены выше в разделе, предшествующем примерам.

Пример 9 - получение кристаллической формы А (ссылка).

Примерно 5 г треоосульфана растворяли примерно в 80 г 2-пропанола при перемешивании при 65°C. Затем полученный раствор фильтровали с использованием 0,2 мкм фильтра и охлаждали до 15°C, что приводило к осаждению кристаллов. Кристаллы собирали и сушили при температуре около 40°C.

Диаграмма XRPD высушенных кристаллов показана на фиг. 2 и подтверждает, что это кристаллическая форма А треоосульфана. Кристаллическая форма А имеет диаграмму XRPD с характеристическими пиками при 7,69, 15,43, 18,74, 19,14, 19,77, 20,15, 20,28, 21,24, 21,74, 22,07, 22,96, 23,24, 24,36, 25,29, 28,05, 28,28, 28,97, 30,10 и  $40,55 \pm 0,20$  градусов  $2\Theta$ .

Кроме того, подходящий монокристалл формы А был выбран под микроскопом и проанализирован с помощью рентгеновской дифракции монокристаллов (SCXRD). Полученные данные представлены выше в разделе, предшествующем примерам.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Лиофилизат треоосульфана, где лиофилизат содержит кристаллическую форму В треоосульфана, имеющую картину рентгеновской порошковой дифракции, которая имеет характеристические пики при 20,87 и  $23,47 \pm 0,20$  градусов  $2\Theta$ .

2. Лиофилизат по п.1, где кристаллическая форма В имеет картину рентгеновской порошковой дифракции, которая имеет характеристические пики при 20,87, 23,47, 26,20, 29,65, 30,81, 34,54, 35,30, 36,87 и  $46,24 \pm 0,2$  градусов  $2\Theta$ .

3. Лиофилизат по п.1 или 2, где кристаллическая форма В имеет картину рентгеновской порошковой дифракции по существу такую, как показано на фиг. 1.

4. Лиофилизат по любому из пп.1-3, где кристаллическая форма В имеет картину рентгеновской порошковой дифракции, не имеющую пиков по меньшей мере в одной и предпочтительно во всех следующих областях от а до f, выраженных в градусах  $2\Theta$ :

Область	Градусы $2\Theta$
a	19,00 - 19,50
b	20,00 - 20,65
c	21,50 - 23,21
d	23,75 - 24,95
e	27,40 - 28,35
f	30,00 - 30,60

5. Лиофилизат по любому из пп.1-4, который содержит по меньшей мере 96 мас.%, в частности по меньшей мере 97 мас.%, предпочтительно по меньшей мере 98 мас.% и более предпочтительно по меньшей мере 99 мас.% кристаллической формы В относительно объединенного количества кристаллической формы В и кристаллической формы А.

6. Лиофилизат по любому из пп.1-4, который содержит по меньшей мере 75 мас.%, в частности по меньшей мере 80 мас.%, предпочтительно по меньшей мере 85 мас.%, более предпочтительно по меньшей мере 90 мас.% и еще более предпочтительно по меньшей мере 95 мас.% кристаллической формы В относительно количества лиофилизата.

7. Лиофилизат по любому из пп.1-6, который содержит менее 20 мас.%, в частности менее 15 мас.%, предпочтительно менее 10 мас.% и более предпочтительно менее 5 мас.% аморфной фазы относительно количества лиофилизата.

8. Лиофилизат по любому из пп.1-7, который содержит по меньшей мере 95 мас.%, в частности по меньшей мере 96 мас.%, предпочтительно по меньшей мере 98 мас.% и более предпочтительно по меньшей мере 99 мас.% треоосульфана.

9. Лиофилизат по любому из пп.1-8, который содержит менее 0,2 мас.%, предпочтительно менее 0,1 мас.% и более предпочтительно менее 0,05 мас.% метансульфоновой кислоты.

10. Лиофилизат по любому из пп.1-9, который содержит менее 1 мас.%, предпочтительно менее 0,5 мас.% и более предпочтительно менее 0,1 мас.% воды.

11. Способ получения лиофилизата по любому из пп.1-10, который включает сублимационную

сушку водного раствора, содержащего треоосульфат.

12. Способ по п.11, в котором водный раствор содержит воду и необязательно один или более органических растворителей.

13. Способ по п.12, в котором органический растворитель представляет собой уксусную кислоту.

14. Способ по любому из пп.11-13, который включает:

(а) обеспечение водного раствора, имеющего первую температуру,

(б) замораживание водного раствора, при этом водный раствор охлаждают от первой температуры до температуры замораживания при скорости охлаждения не более 3 К/мин, и

(с) высушивание замороженного раствора, полученного на стадии (б), с получением лиофилизата.

15. Способ по п.14, в котором скорость охлаждения на стадии (б) составляет не более 2 К/мин, предпочтительно не более 1,5 К/мин и более предпочтительно не более 1,3 К/мин, или скорость охлаждения на стадии (б) составляет от 0,05 до 1,5 и предпочтительно от 0,1 до 1,3 К/мин.

16. Способ по любому из пп.11-15, в котором первая температура составляет от 15 до 95°C, предпочтительно от 20 до 50°C и более предпочтительно от 25 до 35°C.

17. Способ по любому из пп.11-16, в котором температура замораживания составляет -40°C или менее, предпочтительно от -60 до -40°C и более предпочтительно от -50 до -40°C.

18. Способ по любому из пп.11-17, в котором замороженный раствор выдерживают при температуре замораживания в течение по меньшей мере 1 ч, предпочтительно от 1 до 10 ч и более предпочтительно от 2 до 8 ч.

19. Способ по любому из пп.14-18, в котором высушивание на стадии (с) включает первичное высушивание, которое проводят, подвергая замороженный раствор воздействию температуры -25°C или выше, предпочтительно температуры от -15 до 0°C, и подвергая замороженный раствор воздействию давления от 0,03 до 1,0 мбар, предпочтительно от 0,1 до 0,6 мбар и более предпочтительно от 0,3 до 0,5 мбар, или высушивание на стадии (с) включает первичное высушивание, которое проводят, подвергая замороженный раствор воздействию температуры 0°C или выше, предпочтительно температуры от 0 до 60°C, более предпочтительно температуры от 20 до 60°C, еще более предпочтительно температуры от 30 до 50°C, и подвергая замороженный раствор воздействию давления от 0,03 до 1,0 мбар, предпочтительно от 0,1 до 0,6 мбар и более предпочтительно от 0,3 до 0,5 мбар.

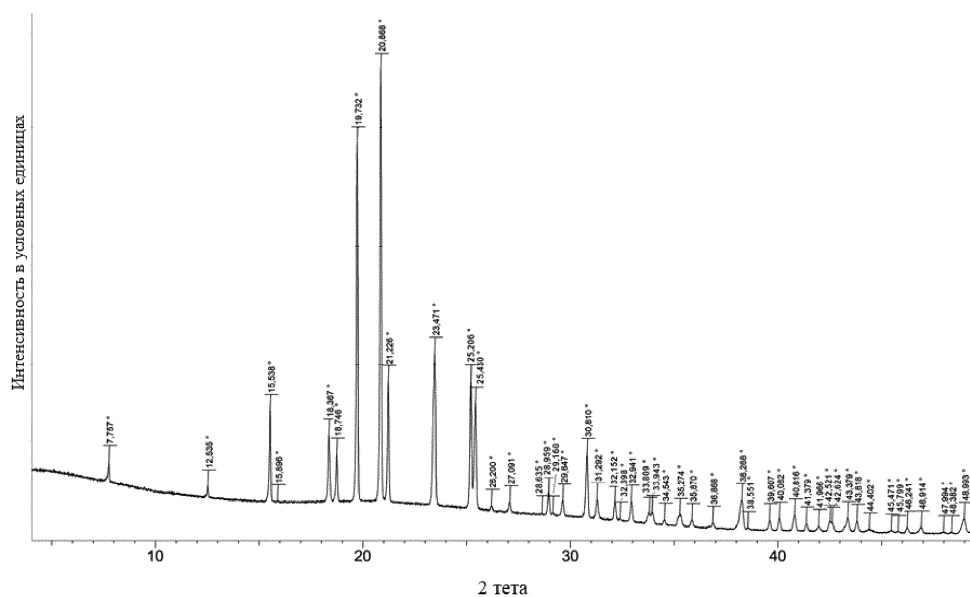
20. Способ по п.19, в котором первичное высушивание проводят в течение по меньшей мере 5 ч и предпочтительно по меньшей мере 10 ч.

21. Способ по п.19 или 20, в котором после первичного высушивания проводят вторичное высушивание, подвергая продукт первичного высушивания воздействию температуры по меньшей мере 30°C, предпочтительно 30-50°C, и подвергая продукт первичного высушивания воздействию давления от 0,03 до 1,0 мбар, предпочтительно от 0,1 до 0,6 мбар и более предпочтительно от 0,3 до 0,5 мбар.

22. Лиофилизат по любому из пп.1-10, используемый в качестве лекарственного средства.

23. Лиофилизат по любому из пп.1-10, используемый в лечении рака, и в частности рака яичников.

24. Лиофилизат по любому из пп.1-10, используемый в кондиционирующей терапии перед трансплантацией костного мозга или стволовых клеток крови.



Фиг. 1

