

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043433**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.05.24

(21) Номер заявки
202190615

(22) Дата подачи заявки
2019.09.25

(51) Int. Cl. *A61P 35/00* (2006.01)
C07C 309/66 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)

(54) КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ ФОРМА ТРЕОСУЛЬФАНА(31) **18196966.8**(32) **2018.09.26**(33) **EP**(43) **2021.06.24**(86) **PCT/EP2019/075828**(87) **WO 2020/064815 2020.04.02**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**МЕДАК ГЕЗЕЛЬШАФТ
ФЮР КЛИНИШЕ
ШПЕЦИАЛЬПРЕПАРАТЕ МБХ (DE)**

(72) Изобретатель:
**Биаллек Себастьян, Хаферкамп
Свен (DE), Меллор Анна (GB),
Гопалакришнан Доминик Анна,
Дворак Юрген (DE)**

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

(56) PETER W. FEIT: "1,4-Bismethanesulfonates of the Stereoisomeric Butanetetraols and Related Compounds", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 7, no. 1, 1 January 1964 (1964-01-01), pages 14-17, XP055516006, ISSN: 0022-2623, DOI: 10.1021/jm00331a004, Anticancer Screening; page 15, Second entry (L-Threitol-1,4-bismethanesulfonate), M.p.102-102 oC, Last paragraph on page 16: recrystallization of products of Table I from acetone-diethyl ether and from ethanol.

GB-A-896052

MICHAEL A. ROBBINS: "SYNTHESIS OF CHIRAL NON-RACEMIC DIOLS FROM (S,S)-1,2,3,4-DIEPOXYBUTANE: (2S,3S)-DIHYDROXY-1,4-DIPHENYLBUTANE", ORGANIC SYNTHESSES, vol. 76, 1 January 1999 (1999-01-01), page 101, XP055515930, US, ISSN: 0078-6209, DOI: 10.15227/orgsyn.076.0101, The product of the second paragraph in 1. Procedure.

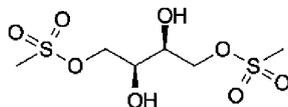
WO-A1-2015107534

(57) Описана новая кристаллическая форма В треосульфана, которая обладает благоприятными характеристиками и, в частности, полезна в качестве активного ингредиента в фармацевтических композициях для лечения рака и для кондиционирующей терапии перед трансплантацией костного мозга или стволовых клеток крови.

B1**043433****043433****B1**

Изобретение относится к новой кристаллической форме треоосульфана, обозначенной как кристаллическая форма В треоосульфана, которая имеет благоприятные характеристики для применения в качестве фармацевтически активного ингредиента и для приготовления соответствующих фармацевтических композиций.

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



Химический синтез треоосульфана описан в DE 1188583 и DE 1193938 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 (Baynes et al., Blood 96 (11): 170a, Abstr. № 731, 2000). Для лечения рака яичников монотерапия треоосульфаном включает его введение пациенту в количестве 8 г/м² площади поверхности тела, тогда как комбинированная терапия треоосульфаном и цисплатином включает введение треоосульфана в количестве 5 г/м².

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 циклофосамида, 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/м² площади поверхности тела перед аллогенной трансплантацией костного мозга или гемопоэтических стволовых клеток.

Треоосульфан коммерчески доступен в виде капсул для перорального применения и стерильного порошка, состоящего из треоосульфана, для приготовления раствора для инфузий. Раствор вводится внутривенно в течение примерно 15-30 мин. Треоосульфан в этих продуктах представляет собой кристаллическую форму, демонстрирующую картину рентгеновской порошковой дифракции (XRPD), имеющую характеристические пики 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 картина XRPD показана на фиг. 3.

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. 3 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 кристаллические формы треоосульфана имеют еще несколько недостатков.

В частности, известные формы имеют тенденцию к образованию агломератов. Это крайне нежелательно, поскольку агломераты могут привести к непредсказуемому и сильно изменчивому поведению растворения. Более того, агломераты приводят к проблемам при достижении желаемого равномерного

распределения треоосульфана в конечной фармацевтической композиции, вводимой пациенту. Это может серьезно повлиять на однородность содержимого фармацевтической композиции, что, в свою очередь, влияет на ее эффективность и безопасность для пациента. Кроме того, общая тенденция к образованию агломератов при хранении может приводить к их образованию в особенно высоких количествах, что очень нежелательно. Склонность к образованию агломератов также приводит к неоднородному распределению частиц по размеру, что влияет на переработку известных кристаллических форм в желаемые конечные фармацевтические композиции.

Лиофилизированные составы известных кристаллических форм, раскрытые в WO 2015/107534, также страдают недостатками в отношении длительного времени, необходимого для их восстановления, а также наличия больших количеств метансульфоновой кислоты и воды, в частности, при хранении, и, следовательно, их стабильности. Метансульфоновая кислота является продуктом разложения треоосульфана. Благодаря высокой кислотности она ускоряет гидролиз сложноэфирных групп треоосульфана и, таким образом, усиливает процесс разложения. По этой причине количество метансульфоновой кислоты должно быть как можно меньшим.

Следовательно, целью настоящего изобретения является предоставление формы треоосульфана, в которой устранены недостатки известных кристаллических форм треоосульфана.

Эта цель достигается кристаллической формой В треоосульфана по пп.1-4 формулы.

Изобретение также относится к треоосульфату по пп.5-10, способу по пп.11-15, фармацевтическим композициям по пп.16-17, кристаллической форме В треоосульфана для применения в медицине по пп.18-20 и к применению по пп.21, 22.

Кристаллическая форма В треоосульфана согласно изобретению демонстрирует картину рентгеновской порошковой дифракции, имеющую пики при $20,87$ и $23,47 \pm 0,20$ градусов 2Θ и, в частности, при $20,87$, $23,47$, $26,20$, $29,65$, $30,81$, $34,54$, $35,30$, $36,87$ и $46,24 \pm 0,20$ градусов 2Θ .

Кристаллическая форма В согласно изобретению, в частности, отличается тем, что демонстрирует картину рентгеновской порошковой дифракции, по существу такую, как показано на фиг. 1.

В другом предпочтительном варианте осуществления кристаллическая форма В согласно изобретению демонстрирует картину рентгеновской порошковой дифракции, не имеющую пиков по меньшей мере в одной, а предпочтительно во всех следующих областях от a до f , выраженных в градусах 2Θ

Область	Градусы 2Θ
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 согласно изобретению предпочтительно также характеризуется пространственной группой и параметрами a , b , c , α , β , γ 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, в частности для сравнения с данными коммерческой формы А

	Форма А	Форма В (согласно изобретению)
Пространственная группа	орторомбическая, $P2_12_12_1$	моноклинический, $P2_1$
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 ³	561,54(17) Å ³
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) К	173(2) К

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 P2₁) и объем 561,5 Å³, тогда как форма А имеет четыре молекулы на элементарную ячейку (пространственная группа P2₁2₁2₁) и объем 1127,22 Å³.

Изобретение также относится к треоосульфату, который включает 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 согласно изобретению, относительно объединенного количества кристаллической формы В и кристаллической формы А.

Следовательно, треоосульфат согласно изобретению содержит только очень небольшие количества обычной кристаллической формы А и очень большие количества кристаллической формы В по изобретению. Высокая полиморфная чистота особенно выгодна для применения треоосульфата по изобретению, в частности, в качестве активного ингредиента фармацевтических композиций.

Изобретение также относится к треоосульфату, 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 треоосульфата.

В предпочтительном варианте осуществления треоосульфат 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 треоосульфата.

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 фармацевтически активного ингредиента.

В другом предпочтительном варианте осуществления треоосульфат согласно изобретению содержит 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 треоосульфата по изобретению при хранении, поскольку эта кислота ускоряет гидролиз сложноэфирных групп треоосульфата и, следовательно, способствует его разложению.

Неожиданно было обнаружено, что кристаллическая форма В согласно изобретению и треоосульфат согласно изобретению демонстрируют помимо преимуществ, упомянутых выше, также другие благоприятные характеристики для применения в качестве фармацевтически активного ингредиента и для получения соответствующих фармацевтических композиций.

В частности, было обнаружено, что кристаллическая форма В имеет выгодное распределение частиц по размерам. В отличие от коммерческой формы А форма В согласно изобретению имеет гораздо меньшую тенденцию к образованию агломератов частиц. Это было показано в исследованиях с использованием оптического микроскопа, и соответствующие микрофотографии для формы В и формы А представлены на фиг. 2 и 4, соответственно. На них показано, что распределение частиц формы В по размерам значительно уже, что, в частности, приводит к высокой однородности содержания активного ингредиента треоосульфата в соответствующих фармацевтических композициях.

Более того, как видно из микрофотографий, кристаллы формы В представляют собой длинные тонкие пластинчатые кристаллиты, тогда как кристаллы формы А представляют собой длинные столбчатые кристаллы. Пластинчатые кристаллы формы В имеют гораздо более высокое отношение поверхности к

объему по сравнению с длинными столбчатыми кристаллами формы А.

Изобретение также относится к способу получения кристаллической формы В треоосульфана и треоосульфана согласно изобретению. Способ включает:

(А) рекристаллизацию треоосульфана из органического растворителя, необязательно содержащего воду; или

(В) растворение треоосульфана в органическом растворителе, необязательно содержащем воду, и обеспечение возможности испарения растворителя и необязательно воды досуха, в частности, при комнатной температуре; или

(С) растворение треоосульфана в органическом растворителе, необязательно содержащем воду, и добавление антирастворителя.

Треоосульфан, используемый в способе согласно изобретению, может иметь любую форму и, в частности, представляет собой коммерчески доступную форму А треоосульфана.

Органический растворитель в варианте (А), варианте (В) и варианте (С), в частности, выбран из группы простых эфиров, кетонов, сложных эфиров и спиртов или их смесей и предпочтительно представляет собой диоксан, метилизобутилкетон, этилацетат, тетрагидрофуран, и изопропанол или их смесь.

В варианте (А) рекристаллизацию треоосульфана обычно осуществляют путем его растворения в выбранном органическом растворителе, который может включать воду, фильтрации полученного раствора, вызывая кристаллизацию путем выдерживания раствора при пониженной температуре, например около 0°C в течение некоторого времени, и отделение образованных кристаллов фильтрацией.

В варианте (В) комнатная температура обычно составляет от 20 до 25°C. В предпочтительном варианте испарение проводят при комнатной температуре и давлении окружающей среды около 1 бар. Обычно это осуществляют путем оставления раствора в открытом контейнере, что позволяет растворителю и необязательно воде испаряться до тех пор, пока не будет получен сухой продукт.

В другом предпочтительном воплощении варианта (В) применяют смесь воды и изопропанола, и воде и изопропанолу дают испариться досуха при комнатной температуре. Смесь предпочтительно имеет температуру около 65°C. Также особенно предпочтительно, чтобы смесь содержала около 80 мас.% воды и около 20 мас.% изопропанола.

Обычно это предпочтительное воплощение варианта (В) включает размещение треоосульфана в первом контейнере, таком как флакон, добавление смеси воды и изопропанола и перенос полученного раствора через фильтр в другой контейнер, такой как флакон, который оставляют открытым при комнатной температуре для испарения воды и изопропанола. Предпочтительно, чтобы смесь, любое оборудование, используемое для переноса и фильтрации раствора, а также второй контейнер были нагреты до температуры около 65°C.

В предпочтительном воплощении варианта (С) антирастворитель выбран из метил-трет-бутилового эфира, толуола, гексана, пентана, хлороформа и метилхлорида.

Вариант (С) обычно реализуется путем растворения треоосульфана в выбранном органическом растворителе, который может включать воду, фильтрации полученного раствора, добавления раствора к антирастворителю, чтобы вызвать кристаллизацию, и отделения образованных кристаллов фильтрацией.

Изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей кристаллическую форму В согласно изобретению или треоосульфана согласно изобретению и необязательно по меньшей мере одну фармацевтически приемлемую добавку.

Фармацевтически приемлемые добавки включают, например, наполнители, связующие, носители, разбавители, разрыхлители, смазывающие вещества, стабилизаторы, буферные агенты, эмульгаторы, подсластители, ароматизаторы, консерванты и увлажняющие агенты.

В зависимости от способа введения фармацевтическая композиция по изобретению может содержать от 0,01 до 100 мас.%, от 1 до 90 мас.%, от 25 до 80 мас.%, от 30 до 70 мас.%, от 40 до 60 мас.% или приблизительно 50 мас.% кристаллической формы В или треоосульфана согласно изобретению.

Фармацевтические композиции могут быть для системного введения, например перорального введения в форме таблеток, микротаблеток, гранул, порошков, капсул, сиропов или многоэлементных гранул, пилюль, пастилок, саше или растворов, или для парентерального введения, например внутривенного, подкожного или внутрисуставного, в форме растворов, суспензий или эмульсий, которые могут быть получены из порошков или лиофилизатов, или для ректального введения в форме суппозиториев, пены или тому подобно.

Добавки для таблеток предпочтительно выбирают из группы, состоящей из наполнителей, связующих, разрыхлителей и смазывающих веществ. Примерами наполнителей являются полиолы или сахара, причем предпочтительные наполнители выбирают из группы, состоящей из маннита, сахарозы, сорбита, крахмала, мальтозы, глюкозы, лактозы, декстрозы, ксилита и производных целлюлозы. Примерами лубрикантов являются стеарат магния, стеарат кальция, тальк или полиэтиленгликоли. Дополнительные подходящие добавки для таблеток выбирают из группы, состоящей из крахмала, камеди, силиката кальция, микрокристаллической целлюлозы, поливинилпирролидона, сахара или производных целлюлозы. Другими примерами добавок для таблеток являются буферы, такие как фосфатный, цитратный, тартратный и/или сукцинатный буферы, в качестве стабилизаторов или агентов, регулирующих рН, и добавки,

облегчающие образование гранул.

Фармацевтическая композиция согласно изобретению может принимать форму прессованной таблетки, которая необязательно покрыта одним или несколькими пленкообразующими агентами. В частности, покрытие таблетки может содержать по меньшей мере один компонент, выбранный из группы производных целлюлозы, например предварительно желатинизированного крахмала, простого эфира целлюлозы (например, этилцеллюлозы, метилцеллюлозы, гидроксипропилцеллюлозы и гидроксипропилцеллюлозы, в частности, сшитой карбоксиметилцеллюлозы натрия), сложных эфиров целлюлозы (например, фталатацетата целлюлозы или фталатгидроксипропилметилцеллюлозы), акриловых полимеров или сополимеров, предпочтительно сополимеров метакрилата и аминоэфира (например, Eudragit RS или Eudragit RL), или сополимеров этилакрилата и метакриловой кислоты (например, этилакрилат 1:1 метакриловой кислоты), восковых материалов (например, карнаубского воска), полиэтиленгликолей (например, макрогола 6000, макрогола 20000), (сшитого) поливинилпирролидона (например, повидон К30, повидон К25, кросповидона), поливинилового спирта или его производных (например, поливинилацетатфталата), пигментов (например, диоксида титана), стеариновой кислоты, стеарата магния, моностеарата глицерина и талька.

Фармацевтическая композиция по изобретению также может иметь форму жидкого препарата для перорального введения, например форму сиропа или суспензии. Примерами добавок, включенных в такой жидкий препарат, являются сахар и/или смесь этанола, воды, глицерина и пропиленгликоля, предпочтительно забуференные до подходящего значения pH. Жидкий препарат может предпочтительно также включать по меньшей мере одну добавку, выбранную из группы красителей, ароматизаторов, сахара и/или карбоксиметилцеллюлозы в качестве загустителя.

Кроме того, фармацевтическая композиция согласно изобретению может также иметь форму твердой или мягкой капсулы, где кристаллическая форма В или тресульфат согласно изобретению может быть смешана с растительным маслом или полиэтиленгликолем. Твердые капсулы также могут быть заполнены жидкими или полутвердыми композициями, содержащими кристаллическую форму В или тресульфат согласно изобретению.

Фармацевтические композиции согласно изобретению для парентерального применения представляют собой стерильные водные или неводные композиции. Обычно они включают по меньшей мере один водный и/или неводный растворитель. Обычно парентеральные композиции изотоничны или разбавлены средствами изотонического разведения, например изотоническим раствором NaCl.

Фармацевтические композиции по изобретению в форме растворов для инъекций или инфузий или суспензий могут быть приготовлены из стерильных порошков, лиофилизатов, гранул и/или таблеток, которые могут находиться в однодозовых или многодозовых контейнерах, например, в запечатанных ампулах и флаконах. Композиции могут включать антиоксиданты, буферные агенты или поверхностно-активные вещества. Водные и неводные суспензии могут включать суспендирующие агенты и загустители.

Предпочтительно, чтобы фармацевтическая композиция согласно изобретению находилась в форме порошка, таблетки, гранул или капсулы и, в частности, в форме лиофилизата.

Неожиданно было обнаружено, что лиофилизат согласно изобретению, включающий кристаллическую форму В или тресульфат согласно изобретению, показывает очень благоприятные характеристики и, в частности, содержит только очень небольшое количество метансульфоновой кислоты даже после хранения. Кроме того, такой лиофилизат также демонстрирует превосходные восстанавливающие свойства, поскольку время, необходимое для его полного растворения, обычно составляет всего 90 с или даже меньше. Это существенное преимущество по сравнению с обычными продуктами при приготовлении готовых к употреблению растворов, например растворов для инфузий или инъекций, из лиофилизата.

Изобретение также относится к кристаллической форме В, тресульфату или фармацевтической композиции согласно изобретению для применения в качестве лекарственного средства. В другом варианте осуществления изобретение также относится к кристаллической форме В, тресульфату или фармацевтической композиции согласно изобретению для применения в лечении рака и, в частности, рака яичников. В еще одном варианте осуществления изобретение также относится к кристаллической форме В, тресульфату или фармацевтической композиции согласно изобретению для применения в кондиционирующей терапии перед трансплантацией костного мозга или стволовых клеток крови.

В дополнительном аспекте изобретение также относится к применению кристаллической формы В, тресульфата или фармацевтической композиции 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 стволовых клеток крови, которые включают введение пациентам кристаллической формы В, тресульфата или фармацевтической композиции согласно изобретению.

Наконец, изобретение также относится к применению кристаллической формы В, тресульфата или фармацевтической композиции согласно изобретению для приготовления фармацевтических растворов и, в частности, растворов для инъекций или инфузий. Такие растворы обычно готовят растворением кристаллической формы В, тресульфата или фармацевтической композиции в растворителе, таком как рас-

творитель, обычно используемый для восстановления.

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

Примеры

Способы.

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

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 (XRPD) регистрировали при комнатной температуре с использованием дифрактометра Bruker D8 Advance (Cu-K α 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 2θ . 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 α =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 (XRPD) регистрировали при комнатной температуре с использованием дифрактометра Bruker D8 Advance (Cu-K α 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 2θ 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.% CaF₂ (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 (XRPD) регистрировали при комнатной температуре с использованием дифрактометра Bruker D8 Advance (Cu-K α 1=1,54059 Å, монохроматор первичного луча Johansson, позиционно-чувствительный детектор) в режиме пропускания с вращением образца. Данные собирали в диапазоне от 4 до 50 градусов 2θ 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.

Оптическая микроскопия.

Исследования проводили с использованием микроскопа Leica DMRB, оснащенного системой камер фирмы Карра типа ZELOS. Образцы исследовали в очищенном силиконовом масле на очищенной лотке, и изображения получали с поляризованным светом и лямбда-проскальзыванием для более высокого цветового контраста.

Определение количества треоосульфана методом RP-HPLC.

Количество треоосульфана в соответствующем образце определяли с помощью обращённо-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 °С
Вводимый объем	20 мкл
Разбавитель	697 мг K ₂ HPO ₄ / 1000 мл, pH 4.5 (H ₃ PO ₄)
Детекция	Рефрактометрический детектор
Контрольный раствор	50 мг/мл треоосульфана в разбавителе
Раствор образца	50 мг/мл треоосульфана 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 ₂ O / ацетонитриле (7:93) (об./об.)
Расход	1,4 мл/мин
Температура колонки	45 °С
Вводимый объем	20 мкл
Детектор	35 °С
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.
Исследуемый раствор	Растворяли образец для анализа в воде для ВЭЖХ до конечной концентрации 20 мг/мл.

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 кулонометра 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 кулонометра Карла Фишера через сухой азот. Измерение повторяли один раз. Пустые стеклянные флаконы использовали для коррекции пустого образца.

Пример 1. Получение формы В с использованием воды/изопропанола 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.% изопропанола, 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.

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

Пример 2. Получение формы В с использованием 1,4-диоксана 20,1 мг треоосульфана отвешивали во

флаконе (объем 4,0 мл), который был снабжен уплотнением из PTFE (политетрафторэтилена) и мешалкой. 185 мкл 1,4-диоксана добавляли при комнатной температуре. После полного растворения твердого вещества герметизирующий слой удаляли и растворителю давали возможность испариться досуха при комнатной температуре.

Полученные кристаллы анализировали с помощью XRPD, который показал, что они представляют собой кристаллическую форму В согласно изобретению.

Пример 3. Получение формы В с использованием метилизобутилкетона.

19,7 мг тресульфана отвешивали во флакон (объем 4,0 мл), который был снабжен уплотнением из PTFE (политетрафторэтилена) и мешалкой. Добавляли 2,5 мл метилизобутилкетона (МИБК) при комнатной температуре. После полного растворения твердого вещества раствор полностью отбирали шприцем (объем 5 мл) и фильтровали с использованием 0,2 мкм фильтра во второй сосуд (объем 4,0 мл). Затем растворителю давали испариться из открытого флакона досуха при комнатной температуре.

Полученные кристаллы анализировали с помощью XRPD, который показал, что они представляют собой кристаллическую форму В согласно изобретению.

Пример 4. Получение формы В с использованием этилацетата.

20,0 мг тресульфана отвешивали во флакон (объем 4,0 мл), который был снабжен уплотнением из PTFE (политетрафторэтилена) и мешалкой. Добавляли 2,0 мл этилацетата при комнатной температуре. После полного растворения твердого вещества раствор полностью отбирали шприцем (объем 5 мл) и фильтровали с использованием 0,2 мкм фильтра во второй сосуд (объем 4,0 мл). Затем растворителю давали испариться из открытого флакона досуха при комнатной температуре.

Полученные кристаллы анализировали с помощью XRPD, который показал, что они представляют собой кристаллическую форму В согласно изобретению.

Пример 5. Получение формы В с использованием тетрагидрофурана.

50,0 мг тресульфана отвешивали во флакон (объем 4,0 мл), который был снабжен уплотнением из PTFE (политетрафторэтилена) и мешалкой. Добавляли 0,85 мл тетрагидрофурана (THF) при комнатной температуре. После полного растворения твердого вещества раствор полностью отбирали шприцем (объем 5 мл) и фильтровали с использованием фильтра 0,2 мкм во второй сосуд (объем 5,0 мл), который содержал 2,85 мл метил-трет-бутилового эфира (MTBE). Затем вторую ампулу осторожно встряхивали, что быстро приводило к образованию кристаллов, которые отделяли фильтрованием.

Полученные кристаллы анализировали с помощью XRPD, который показал, что они представляют собой кристаллическую форму В согласно изобретению.

Пример 6. Получение формы В с использованием метилэтилкетона.

50,1 мг тресульфана отвешивали во флакон (объем 4,0 мл), который был снабжен уплотнением из PTFE (политетрафторэтилена) и мешалкой. Добавляли 1,1 мл метилэтилкетона (МЕК) при комнатной температуре. После полного растворения твердого вещества раствор полностью отбирали шприцем (объем 5 мл) и фильтровали с использованием 0,2 мкм фильтра во второй сосуд (объем 5,0 мл), который содержал 3,3 мл метил-трет-бутилового эфира (MTBE). Это привело к немедленному образованию кристаллов, которые отделили фильтрацией.

Полученные кристаллы анализировали с помощью XRPD, который показал, что они представляют собой кристаллическую форму В согласно изобретению.

Кроме того, кристаллы были исследованы с помощью оптической микроскопии, и соответствующая микрофотография показана на фиг. 2.

Пример 7. SCXRD-анализ формы В.

Подходящий монокристалл формы В был выбран под микроскопом из кристаллов, полученных в соответствии с примером 3, и проанализирован с помощью рентгеновской дифракции монокристаллов (SCXRD). Полученные данные представлены выше в разделе, предшествующем примерам.

Пример 8. Получение кристаллической формы А (ссылка).

Примерно 5 г тресульфана 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.

Картина XRPD высушенных кристаллов показана на фиг. 3 и подтверждает, что это кристаллическая форма А тресульфана. Кристаллическая форма А имеет картину XRPD, имеющую характеристические пики 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 2θ .

Кроме того, кристаллы были исследованы с помощью оптической микроскопии, и соответствующая микрофотография показана на фиг. 4.

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.

Пример 9. Получение лиофилизата кристаллической формы В.

Раствор для предварительной лиофилизации 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 треоосульфана 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 раствора для предварительной лиофилизации, целевая доза около 5000 мг треоосульфана на флакон

Концентрация треоосульфана	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 сублимационную сушилку GT 2 (производитель: Hof Sonderanlagenbau (Lohra, Германия)) с площадью полки 0,4 м² и емкостью ледового конденсатора 8 кг, включая средства измерения перепада давления, и лиофилизировали в соответствии со следующим циклом лиофилизации.

Цикл лиофилизации

	Этап	Температура полки	Температура ледового конденсатора	Давление	Продолжительность этапа	Суммарное время
#	Описание	[°C]	[°C]	[мбар]	(ч:мин)	(ч:мин)
1	Загрузка	30	-	1000	00:01	00:01
2	Линейное изменение температуры замораживания (1,17 К/мин)	-45	-	1000	01:04	01:05
3	Замораживание	-45	-	1000	06:00	07:05
4	Линейное изменение температуры отжига (1 К/мин)	-10	-	1000	00:35	07:40
5	Отжиг	-10	-	1000	06:00	13:40
6	Линейное изменение температуры замораживания (1 К/мин)	-45	-	1000	00:35	14:15
7	Замораживание	-45	-	1000	03:00	17:15
8	Регулировка вакуума	-45	≤ -70	0,33	00:30	17:45
9	Линейное изменение температуры первичной сушки (0,94 К/мин)	35	≤ -70	0,33	01:25	19:10
10	Первичная сушка	35	≤ -70	0,33	62:00	81:10

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

Свойства лиофилизатов

Количество треоосульфана [мас. %]	Количество воды [мас. %]	Количество метансульфоновой 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

Картина XRPD лиофилизатов показана на фиг. 5.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Кристаллическая форма В треоосульфана, которая имеет картину рентгеновской порошковой дифракции, имеющую характеристические пики при 20,87 и 23,47 ± 0,20 градусов 2Θ.

2. Кристаллическая форма В по п.1, которая имеет картину рентгеновской порошковой дифракции, имеющую характеристические пики при 20,87, 23,47, 26,20, 29,65, 30,81, 34,54, 35,30, 36,87 и 46,24 ± 0,20 градусов 2Θ.

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

4. Кристаллическая форма В по любому из пп.1-3, которая 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 2Θ

Область	Градусы 2Θ
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. Композиция треоосульфана, которая содержит по меньшей мере 96 мас. % кристаллической формы В по любому из пп.1-4 относительно объединенного количества кристаллической формы В и кристаллической формы А.

6. Композиция треоосульфана по п.5, которая содержит по меньшей мере 97 мас. %, предпочтительно по меньшей мере 98 мас. % и более предпочтительно по меньшей мере 99 мас. % указанной кристаллической формы В относительно объединенного количества кристаллической формы В и кристаллической формы А.

7. Композиция треоосульфана, которая содержит по меньшей мере 75 мас. % кристаллической формы В по любому из пп.1-5 относительно количества треоосульфана.

8. Композиция треоосульфана по п.7, которая содержит 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. % указанной кристаллической формы В относительно количества треоосульфана.

9. Композиция треоосульфана по любому из пп.5-8, которая содержит менее 20 мас. %, в частности менее 15 мас. %, предпочтительно менее 10 мас. % и более предпочтительно менее 5 мас. % аморфной фазы.

10. Композиция тресульфана по любому из пп.5-9, которая содержит менее 0,2 мас.%, предпочтительно менее 0,1 мас.% и более предпочтительно менее 0,05 мас.% метансульфоновой кислоты.

11. Способ получения кристаллической формы В по любому из пп.1-4 или композиции тресульфана по любому из пп.5-10, который включает:

(А) рекристаллизацию тресульфана из органического растворителя, необязательно содержащего воду; или

(В) растворение тресульфана в органическом растворителе, необязательно содержащем воду, и обеспечение возможности испарения растворителя и необязательно воды досуха; или

(С) растворение тресульфана в органическом растворителе, необязательно содержащем воду, и добавление антирастворителя.

12. Способ по п.11, где органический растворитель в варианте (А), варианте (В) и варианте (С) выбран из группы простых эфиров, кетонов, сложных эфиров и спиртов или их смесей и предпочтительно представляет собой диоксан, метилизобутилкетон, этилацетат, тетрагидрофуран и изопропанол или их смесь.

13. Способ по п.11 или 12, в котором в варианте (В) применяют смесь воды и изопропанола и воде и изопропанолу дают испариться досуха при комнатной температуре.

14. Способ по п.13, в котором смесь включает около 80 мас.% воды и около 20 мас.% изопропанола.

15. Способ по п.11 или 12, в котором в варианте (С) антирастворитель выбран из метил-трет-бутилового эфира, толуола, гексана, пентана, хлороформа и метиленхлорида.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая кристаллическую форму В по любому из пп.1-4 или композицию тресульфана по любому из пп.5-10 и необязательно по меньшей мере одну фармацевтически приемлемую добавку.

17. Фармацевтическая композиция по п.16, которая находится в форме порошка, таблетки, гранул или капсулы и, в частности, в форме лиофилизата.

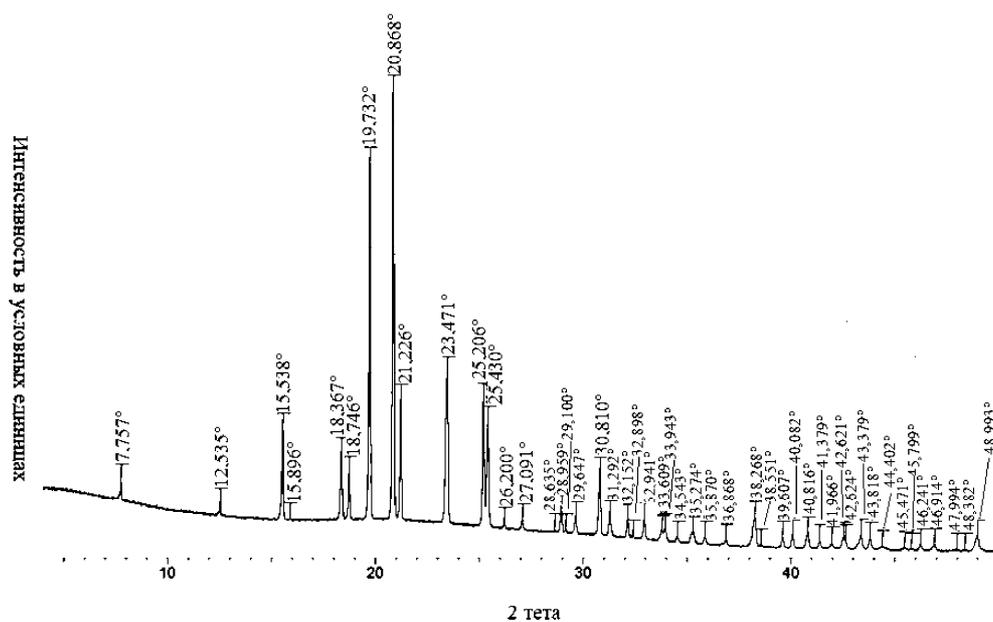
18. Кристаллическая форма В по любому из пп.1-4, композиция тресульфана по любому из пп.5-10 или фармацевтическая композиция по п.16 или 17, используемая в качестве лекарственного средства.

19. Кристаллическая форма В по любому из пп.1-4, композиция тресульфана по любому из пп.5-10 или фармацевтическая композиция по п.16 или 17, используемая в лечении рака и, в частности, рака яичников.

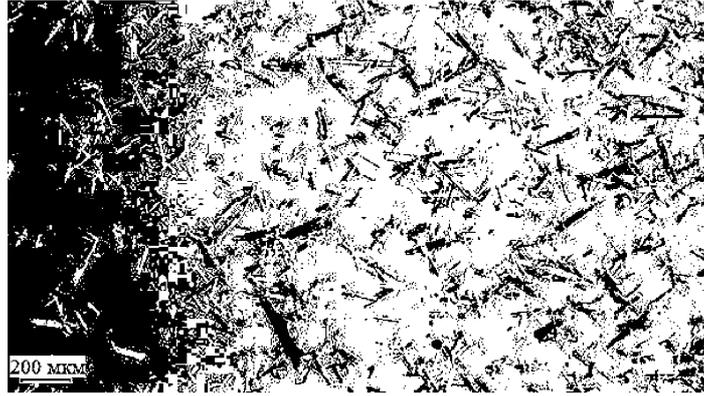
20. Кристаллическая форма В по любому из пп.1-4, композиция тресульфана по любому из пп.5-10 или фармацевтическая композиция по п.16 или 17, используемая в кондиционирующей терапии перед трансплантацией костного мозга или стволовых клеток крови.

21. Применение кристаллической формы В по любому из пп.1-4, композиции тресульфана по любому из пп.5-10 или фармацевтической композиции по п.16 или 17 для приготовления фармацевтических растворов.

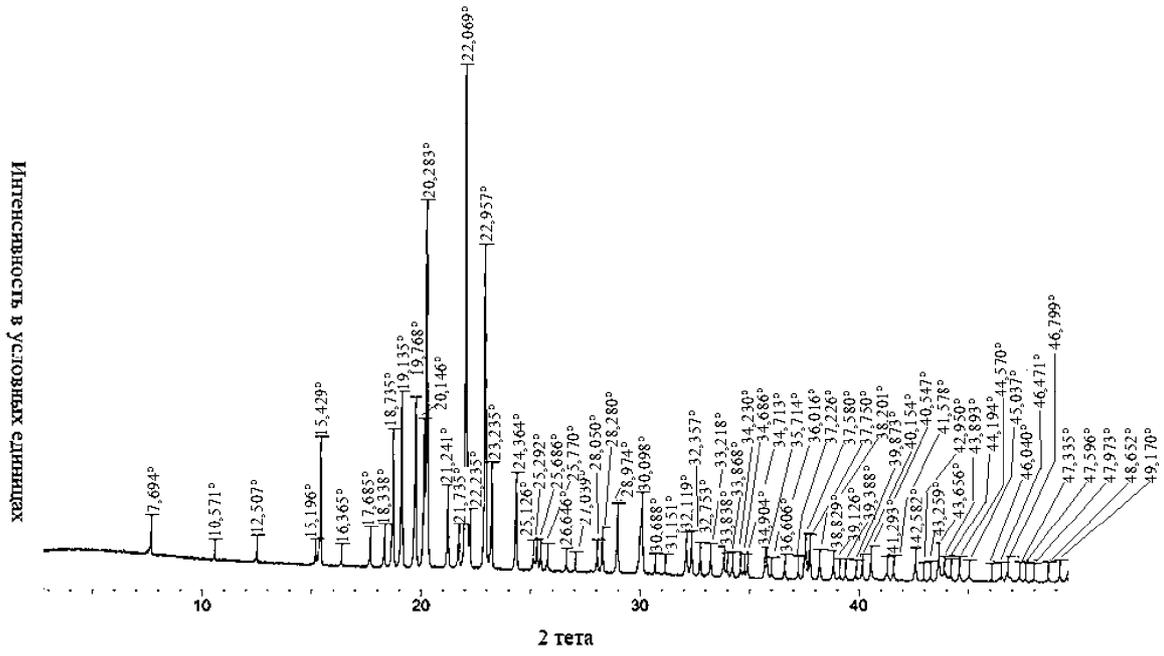
22. Применение по п.21, где фармацевтические растворы представляют собой растворы для инъекции или инфузии.



Фиг. 1



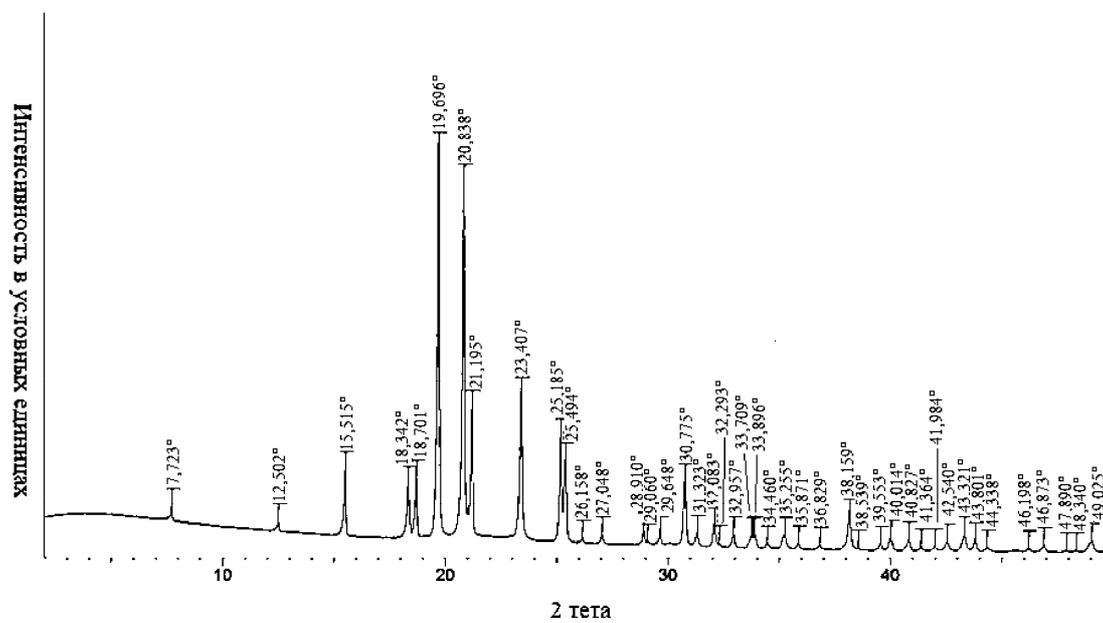
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2