

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 045396

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.22

(21) Номер заявки
202191066

(22) Дата подачи заявки
2019.10.17

(51) Int. Cl. A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
C07K 5/06 (2006.01)

(54) СОЕДИНЕНИЯ, СОДЕРЖАЩИЕ ДЕЙТЕРИЙ

(31) 1816998.7; 1909695.7

(32) 2018.10.18; 2019.07.05

(33) GB

(43) 2021.07.08

(86) PCT/EP2019/078250

(87) WO 2020/079165 2020.04.23

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ОНКОПЕПТАЙДС АБ (SE)

(72) Изобретатель:
Леманн Фредрик (SE)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

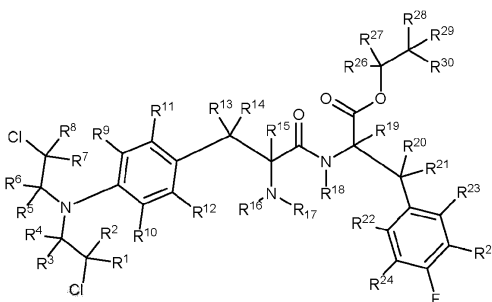
(56) WO-A1-2014065751

WO-A1-2012146625

TUNG R.: "The Development of Deuterium-Containing Drugs", INNOVATIONS IN PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY, SAMEDAN LTD, GB, no. 32, 1 March 2010 (2010-03-01), pages 24-26, 28, XP009148260, ISSN: 1471-7204, page 28, column 1, line 34 - column 2, line 10

BÉRGLUND ÅKE ET AL.: "First-in-human, phase I/IIa clinical study of the peptidase potentiated alkylator melflufen administered every three weeks to patients with advanced solid tumor malignancies", INVESTIGATIONAL NEW DRUGS, MARTINUS NIJHOFF PUBLISHERS, BOSTON, US, vol. 33, no. 6, 10 November 2015 (2015-11-10), pages 1232-1241, XP035906340, ISSN: 0167-6997, DOI: 10.1007/S10637-015-0299-2 [retrieved on 2015-11-10], page 1239, column 2, line 10 - line 31; figure 1; table 5

(57) В изобретении предложено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль



(I)

где каждый R¹-R³⁰ независимо выбран из группы, состоящей из H и дейтерия, при этом по меньшей мере один из R¹-R³⁰ представляет собой дейтерий с уровнем содержания выше природного содержания дейтерия. Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим предложенные соединения, и к применению указанных соединений.

B1

045396

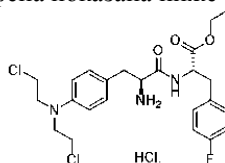
045396 B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к новым дейтерированным производным мелфлуфена с особенно полезными свойствами. Новые дейтерированные производные мелфлуфена или их соли находят применение при лечении или профилактике рака.

Уровень техники

Мелфлуфен (также известный как мелфалан флуфенамид и этиловый эфир L-мелфаланил-4-фтор-L-фенилаланина) представляет собой противоопухолевое средство, применимое для лечения рака, в частности, для лечения множественной миеломы. Мелфлуфен описан в WO 01/96367 и WO 2014/065751. Структура гидрохлоридной соли мелфлуфена показана ниже



Мелфлуфен представляет собой сильнодействующий и высоко липофильный алкилирующий агент, который обеспечивает целенаправленную доставку алкилирующих метаболитов к опухолевым клеткам. В отличие от других гидрофильных алкилирующих агентов высокая липофильность мелфлуфена приводит к его быстрому накоплению в тканях и клетках. Будучи внутри клетки мелфлуфен может непосредственно связываться с ДНК или он может легко гидролизироваться под действием внутриклеточных пептидаз с образованием мелфалана или может гидролизироваться под действием внутриклеточных эстераз с образованием дезэтилмелфлуфена, который также обладает алкилирующими свойствами. Высокая активность эстераз и пептидаз в опухолях человека приводит к быстрому образованию метаболитов мелфлуфена в таких клетках, что затем инициирует приток большого количества мелфлуфена (Gullbo, J., et al, J Drug Target, (2003), Vol 11, стр. 355-363; Wickstrom, M., et al., Biochem Pharmacol (2010), Vol 79, стр. 2381-1290). Поскольку дезэтилмелфлуфен и мелфалан являются относительно гидрофильными, существует возможность внутриклеточного захвата указанных агентов.

Добавление мелфлуфена к панелям первичных культур опухолевых клеток человека приводит к характеру активности, аналогичному характеру активности мелфалана, но с эффективностью, большей в от 50 до 100 раз (Wickstrom M., et al, Invest New Drugs (2008), Vol 26, pages 195-204), что объясняется увеличением внутриклеточной концентрации в от 10 до 20 раз (Gullbo, J., et al., J Drug Target, (2003) Vol 11, стр. 355-363; Wickstrom, M., et al, Biochem Pharmacol (2010) Vol 79, стр. 2381-1290). Такое поведение можно объяснить высокоэффективным накоплением мелфлуфена в указанных клетках и эффективным образованием метаболитов мелфлуфена.

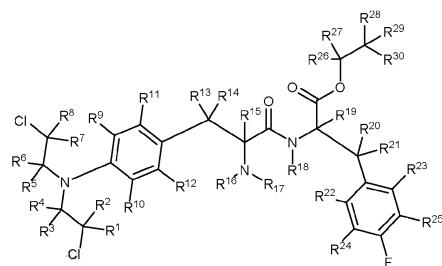
После синтеза мелфлуфен обычно получают в кристаллической форме. Кристаллическую форму можно растворить только в сильноокислых водных растворах, которые часто непригодны для производственных и фармацевтических целей. В предыдущих фармацевтических препаратах кристаллическую форму растворяли в растворе диметилацетамида (ДМА) и глюкозы. Однако такой препарат был нестабильным и легко образовывал нежелательные димеры мелфлуфена. Органические растворители, такие как ДМА, также могут быть опасными для пациентов и могут повреждать изделия медицинского назначения, применяемые для введения. Как описано в WO 2012/146625 и WO 2014/065751, было обнаружено, что лиофилизированные препараты мелфлуфена обладают улучшенной стабильностью и растворимостью в водных растворах.

Соединения, которые по своей природе являются нестабильными, с трудом поддаются манипулированию и с большей вероятностью образуют нежелательные метаболиты и примеси. Алкилирующие агенты, такие как мелфлуфен, представляют дополнительные трудности, поскольку они обладают возможностью образовывать нежелательные генотоксические метаболиты и примеси, которые могут вызывать у пациента ненаправленные эффекты. Соответственно, алкилирующие агенты с плохой стабильностью часто с трудом поддаются манипулированию и могут иметь нежелательные фармакологические свойства. Следовательно, существует потребность в производных мелфлуфена с улучшенной стабильностью и улучшенной пригодностью к обращению.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что дейтерированные производные мелфлуфена обладают улучшенными свойствами по сравнению с мелфлуфеном с уровнем природного содержания дейтерия.

Сущность изобретения

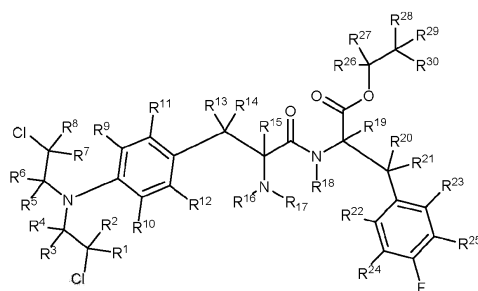
В настоящем изобретении предложено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль



(I)

где
каждый R^1-R^{30} независимо выбран из группы, состоящей из H и дейтерия, при этом по меньшей мере один из R^1-R^{30} представляет собой дейтерий с уровнем содержания выше природного содержания дейтерия.

В настоящем изобретении также предложено соединение формулы (Ia) или его фармацевтически приемлемая соль



(Ia)

где
каждый R^1-R^{30} независимо выбран из группы, состоящей из H и дейтерия, при этом по меньшей мере один из R^1-R^{30} представляет собой дейтерий с уровнем содержания выше природного содержания дейтерия.

Кроме того, в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая дейтерированный мелфлуфен формулы (I) или (Ia) вместе с приемлемым носителем. Композиция может необязательно содержать дополнительный терапевтический агент, например, ингибитор протеазы (PI), иммуномодулирующее средство (IMiD) или алкилятор.

В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая дейтерированный мелфлуфен формулы (I) или (Ia) вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Указанная фармацевтическая композиция может необязательно содержать дополнительный терапевтический агент, например, ингибитор протеазы (PI), иммуномодулирующее средство (IMiD) или алкилятор.

В настоящем изобретении дополнительно предложено соединение или фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного средства. Кроме того, также предложено соединение или фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению для применения при лечении или профилактике рака, например, множественной миеломы, рака груди, рака легких, рака яичников, лейкозов и лимфом.

В настоящем изобретении также предложен способ лечения пациента, включающий введение фармацевтически эффективного количества соединения или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению.

Описание графических материалов

На фиг. 1 показаны средние концентрации в плазме мелфлуфена-d5 (III) в объединенной группе самцов и самок собак породы бигль после инфузии 1,25 и 2,5 мг/кг мелфлуфена-d5 (III).

На фиг. 2 показано сравнение индивидуального и среднего (\pm SD) значений C_{max} мелфлуфена-d5 (III) или мелфлуфена после введения мелфлуфена-d5 (III) (группа 3, 2,5 мг/кг) или мелфлуфена (группа 4, 2,5 мг/кг) самцам и самкам собак породы бигль.

На фиг. 3 показано сравнение индивидуального и среднего (\pm SD) значений AUC_{last} мелфлуфена-d5 (III) или мелфлуфена после введения мелфлуфена-d5 (III) (группа 3, 2,5 мг/кг) или мелфлуфена (группа 4, 2,5 мг/кг) самцам и самкам собак породы бигль.

На фиг. 4 показано сравнение индивидуального и среднего (\pm SD) значений C_{max} дезэтил-мелфлуфена после инфузии мелфлуфена-d5 (III) (группа 3, 2,5 мг/кг) и мелфлуфена (группа 4, 2,5 мг/кг) самцам и самкам собак породы бигль.

На фиг. 5 показано сравнение индивидуального и среднего (\pm SD) значений AUC_{last} дезэтил-

мелфлуфена после инфузии мелфлуфена-d₅ (III) (группа 3, 2,5 мг/кг) и мелфлуфена (группа 4, 2,5 мг/кг) самцам и самкам собак породы бигль.

На фиг. 6a и 6b показаны средние концентрации в плазме мелфлуфена-d₅ (III) и его метаболитов дезэтилмелфлуфена и мелфалана после инфузии 1,25 мг/кг мелфлуфена-d₅ (III) самцам и самкам собак породы бигль (объединенная группа 2 собак разного пола).

На фиг. 7a и 7b показаны средние концентрации в плазме мелфлуфена-d₅ (III) и его метаболитов дезэтилмелфлуфена и мелфалана после инфузии 2,5 мг/кг мелфлуфена-d₅ (III) самцам и самкам собак породы бигль (объединенная группа 3 собак разного пола).

На фиг. 8a и 8b показаны средние концентрации в плазме мелфлуфена и его метаболитов дезэтилмелфлуфена и мелфалана после инфузии 2,5 мг/кг мелфлуфена самцам и самкам собак породы бигль (объединенная группа 4 собак разного пола).

На фиг. 9 показано сравнение индивидуального и среднего (\pm SD) значений C_{max} мелфалана после инфузии мелфлуфена-d₅ (III) (группа 3, 2,5 мг/кг) или мелфлуфена (группа 4, 2,5 мг/кг) самцам и самкам собак породы бигль.

На фиг. 10 показано сравнение индивидуального и среднего (\pm SD) значений AUC_{last} мелфалана после инфузии мелфлуфена-d₅ (III) (группа 3, 2,5 мг/кг) или мелфлуфена (группа 4, 2,5 мг/кг) самцам и самкам собак породы бигль.

На фиг. 11 показано сравнение индивидуального и среднего (\pm SD) значений t_{1/2,z} мелфалана после инфузии мелфлуфена-d₅ (III) (группа 3, 2,5 мг/кг) или мелфлуфена (группа 4, 2,5 мг/кг) самцам и самкам собак породы бигль.

На фиг. 12 показано сравнение индивидуального и среднего (\pm SD) значений AUC_∞ мелфалана после инфузии мелфлуфена-d₅ (III) (группа 3, 2,5 мг/кг) или мелфлуфена (группа 4, 2,5 мг/кг) самцам и самкам собак породы бигль.

Подробное описание изобретения

В настоящем изобретении предложено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, в котором каждый R¹-R³⁰ независимо выбран из группы, состоящей из H и дейтерия, при этом по меньшей мере один из R¹-R³⁰ представляет собой дейтерий с уровнем содержания выше природного содержания дейтерия.

В настоящем изобретении также предложено соединение формулы (Ia) или его фармацевтически приемлемая соль, в котором каждый R¹-R³⁰ независимо выбран из группы, состоящей из H и дейтерия, при этом по меньшей мере один из R¹-R³⁰ представляет собой дейтерий с уровнем содержания выше природного содержания дейтерия.

Природное содержание дейтерия составляет 0,0156 мол.%, где мол. % относится к проценту от общего количества молей водорода в образце, представляющему собой дейтерий. Таким образом, в 1 моле природного водорода 0,156 ммоль представляет собой дейтерий, или в образце, содержащем 6,022×10²³ атомов природного водорода, содержится 9,39×10¹⁹ атомов дейтерия, или в образце, содержащем 6413 атомов природного водорода, содержится один атом дейтерия.

В мелфлуфене имеется 30 углерод-водородных (C-H) групп, каждая из которых содержит изотопы водорода согласно их распределению в природе. Следовательно, в образце мелфлуфена содержание дейтерия в каждом положении составляет примерно 0,0156 мол.%. Следовательно, в 1 моле мелфлуфена содержится 4,68 ммоль дейтерия, или в образце, содержащем 6,022×10²³ молекул мелфлуфена, содержится 2,8×10²¹ атомов дейтерия, или в 214 молекулах мелфлуфена содержится 1 атом дейтерия.

Если в настоящем документе один или более из R¹-R³⁰ формулы (I) или (Ia) обозначены как "дейтерий", содержание дейтерия в указанном положении больше, чем природное содержание дейтерия. Уровень содержания дейтерия, превышающий природное содержание дейтерия, может составлять по меньшей мере 1 мол.%, 5 мол.%, 10 мол.%, 50 мол.%, 90 мол.% или 98 мол.%.

Дейтерий представляет собой безопасный и стабильный изотоп водорода. Энергия, необходимая для разрыва связи углерод-дейтерий (C-D), выше, чем энергия, необходимая для разрыва связи углерод-водород (C-H). Следовательно, реакции, включающие разрыв связи C-D, протекают с более медленной скоростью, чем реакции, приводящие к разрыву связи C-H. Если разрыв связи C-H происходит на скорости-определяющей стадии реакции, замещение на связь C-D будет уменьшать скорость реакции. Такой эффект называют кинетическим изотопным эффектом дейтерия (DKTE).

Влияние дейтерирования на фармакологические свойства лекарственного средства является непредсказуемым и должно определяться эмпирически. В некоторых отдельных случаях было показано, что дейтерирование улучшает фармакологические свойства лекарственного средства (см., например, WO 2010/044981). В других случаях дейтерирование может не иметь клинически значимого эффекта или может оказывать отрицательное влияние на фармакологические свойства лекарственного средства.

Дейтерирование лекарственного средства может уменьшать скорость его метаболизма под действием таких ферментов, как цитохромы P450 (CYPs), эстеразы, пептидазы, редуктазы, дегидрогеназы и оксидазы, что, тем самым, приводит к изменению его фармакологических свойств. Также возможно, что дейтерирование может влиять на изменение метаболического профиля лекарственного средства, явление,

которое часто называют "метаболическим переключением".

Метаболическое переключение может происходить, когда дейтерированное лекарственное средство связывается с метаболизирующими ферментами в другой конформации по сравнению с недеитерированным лекарственным средством. Это может привести к появлению других пропорций известных метаболитов или даже к образованию новых метаболитов (Fischer et al., *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2006, 9(1), 100-109). Невозможно предсказать, как повышенное содержание дейтерия в определенном положении может изменить профиль метаболитов лекарственного средства. Также невозможно предсказать, улучшит ли измененный профиль метаболитов фармакологические свойства лекарственного средства или ухудшит их.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что дейтерированные производные мелфлуфена согласно настоящему изобретению обладают особенно полезными свойствами. Например, дейтерированные производные мелфлуфена при введении путем инфузии приводят к увеличению системного воздействия самого производного, а также активного метаболита мелфалана по сравнению с эквивалентной дозой мелфлуфена. Такой эффект описан ниже в примере (а), и, в частности, на фиг. 3, 4, 9 и 10 примера (а), на которых показаны средние и индивидуальные значения C_{max} и AUC_{last} мелфлуфена-d5 (III)/мелфлуфена или мелфалана после введения собакам мелфлуфена-d5 (III) или мелфлуфена.

Результат усиленного воздействия мелфлуфена-d5 (III) и мелфалана при применении одинаковых доз мелфлуфена-d5 (III) и мелфлуфена демонстрирует очень значительные преимущества. Как упоминалось выше, превосходную клиническую эффективность мелфлуфена можно объяснить высокоэффективным накоплением мелфлуфена в клетках и эффективным образованием метаболитов мелфлуфена. Таким образом, производное, приводящее к еще более сильному воздействию производного мелфлуфена и более сильному воздействию активного метаболита мелфалана по сравнению с мелфлуфеном, является особенно полезным, поскольку, как предполагается, оно улучшит оба из указанных свойств мелфлуфена. Наряду с перечисленными преимуществами, означающими, что понадобится производить, хранить и вводить меньшее количество соединения, это также позволяет вводить более низкую дозу дейтерированного производного мелфлуфена по сравнению с эквивалентной дозой мелфлуфена, что снижает риск побочных эффектов от введения мелфлуфена; или, при введении такой же дозы, что и доза мелфлуфена, можно обеспечить более сильное воздействие дейтерированного производного мелфлуфена и мелфалана, что приводит к повышению возможности получения клинической пользы для пациента без увеличения риска непереносимых токсических побочных эффектов.

Предпочтительные соединения согласно настоящему изобретению представляют собой соединения, в которых по меньшей мере один из R^1 - R^{30} представляет собой дейтерий. Особенно предпочтительными соединениями согласно настоящему изобретению являются соединения, в которых по меньшей мере один из R^1 - R^8 представляет собой дейтерий; по меньшей мере, один из R^9 - R^{15} представляет собой дейтерий; по меньшей мере один из R^{16} - R^{18} представляет собой дейтерий; по меньшей мере один из R^{19} - R^{25} представляет собой дейтерий или по меньшей мере один из R^{26} - R^{30} представляет собой дейтерий.

Другими предпочтительными соединениями согласно настоящему изобретению являются соединения, в которых по меньшей мере два из R^1 - R^8 представляют собой дейтерий; по меньшей мере три из R^1 - R^8 представляют собой дейтерий; по меньшей мере четыре из R^1 - R^8 представляют собой дейтерий; по меньшей мере пять из R^1 - R^8 представляют собой дейтерий; по меньшей мере шесть из R^1 - R^8 представляют собой дейтерий; по меньшей мере семь из R^1 - R^8 представляют собой дейтерий или по меньшей мере восемь из R^1 - R^8 представляют собой дейтерий.

Другими предпочтительными соединениями согласно настоящему изобретению являются соединения, в которых по меньшей мере два из R^9 - R^{15} представляют собой дейтерий; по меньшей мере три из R^9 - R^{15} представляют собой дейтерий; по меньшей мере четыре из R^9 - R^{15} представляют собой дейтерий; по меньшей мере пять из R^9 - R^{15} представляют собой дейтерий; по меньшей мере шесть из R^9 - R^{15} представляют собой дейтерий или по меньшей мере семь из R^9 - R^{15} представляют собой дейтерий.

Другими предпочтительными соединениями согласно настоящему изобретению являются соединения, в которых по меньшей мере два из R^{16} - R^{18} представляют собой дейтерий; или по меньшей мере три из R^{16} - R^{18} представляют собой дейтерий.

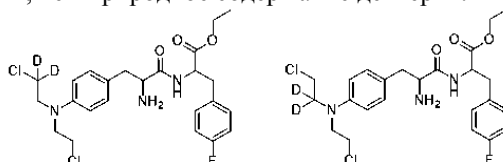
Другими предпочтительными соединениями согласно настоящему изобретению являются соединения, в которых по меньшей мере два из R^{19} - R^{25} представляют собой дейтерий; по меньшей мере три из R^{19} - R^{25} представляют собой дейтерий; по меньшей мере четыре из R^{19} - R^{25} представляют собой дейтерий; по меньшей мере пять из R^{19} - R^{25} представляют собой дейтерий; по меньшей мере шесть из R^{19} - R^{25} представляют собой дейтерий; или по меньшей мере семь из R^{19} - R^{25} представляют собой дейтерий.

Другими предпочтительными соединениями согласно настоящему изобретению являются соединения, в которых по меньшей мере два из R^{26} - R^{30} представляют собой дейтерий; по меньшей мере три из R^{26} - R^{30} представляют собой дейтерий; по меньшей мере четыре из R^{26} - R^{30} представляют собой дейтерий; или пять из R^{26} - R^{30} представляют собой дейтерий. Согласно одному особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения соединения согласно настоящему изобретению представляют собой соединения, в которых пять из (т.е. каждый из) R^{26} - R^{30} представляют собой дейтерий.

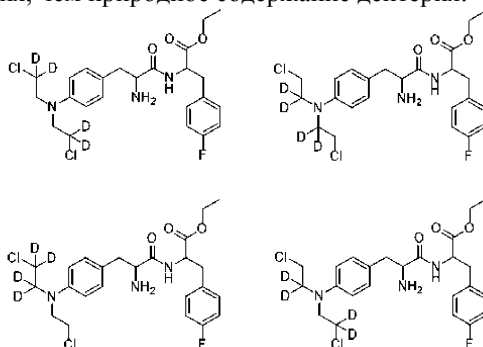
Другими предпочтительными соединениями согласно настоящему изобретению являются соедине-

ния, в которых по меньшей мере два из R^1-R^{30} представляют собой дейтерий. Особенно предпочтительными соединениями являются соединения, в которых по меньшей мере один из R^1-R^8 представляет собой дейтерий и по меньшей мере один из R^9-R^{15} , $R^{16}-R^{18}$, $R^{19}-R^{25}$ или $R^{26}-R^{30}$ представляет собой дейтерий; по меньшей мере один из R^9-R^{15} представляет собой дейтерий и по меньшей мере один из R^1-R^8 , $R^{16}-R^{18}$, $R^{19}-R^{25}$ или $R^{26}-R^{30}$ представляет собой дейтерий; по меньшей мере один из $R^{16}-R^{18}$ представляет собой дейтерий и по меньшей мере один из R^1-R^8 , R^9-R^{15} , $R^{19}-R^{25}$ или $R^{26}-R^{30}$ представляет собой дейтерий; по меньшей мере один из $R^{19}-R^{25}$ представляет собой дейтерий и по меньшей мере один из R^1-R^8 , R^9-R^{15} , $R^{16}-R^{18}$ или $R^{26}-R^{30}$ представляет собой дейтерий; или по меньшей мере один из $R^{26}-R^{30}$ представляет собой дейтерий и по меньшей мере один из R^1-R^8 , R^9-R^{15} , $R^{16}-R^{18}$ или $R^{19}-R^{25}$ представляет собой дейтерий.

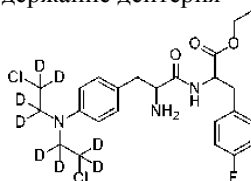
Согласно одному из вариантов реализации настоящего изобретения по меньшей мере два из R^1-R^8 представляют собой дейтерий. Например, соединения согласно настоящему изобретению можно выбрать из следующей группы, в которой каждый из атомов, обозначенных как дейтерий (D), характеризуется большим содержанием дейтерия, чем природное содержание дейтерия:



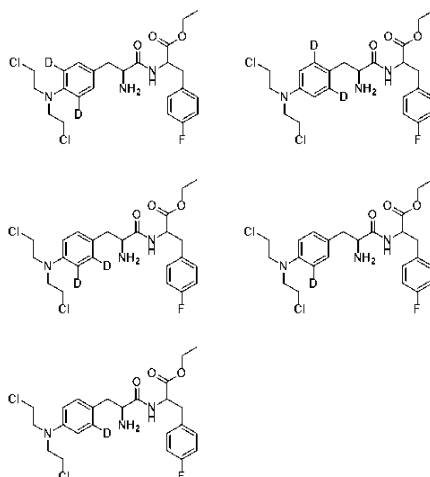
Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере четыре из R^1-R^8 представляют собой дейтерий. Например, соединения согласно настоящему изобретению можно выбрать из следующей группы, в которой каждый из атомов, обозначенных как дейтерий (D), характеризуется большим содержанием дейтерия, чем природное содержание дейтерия:



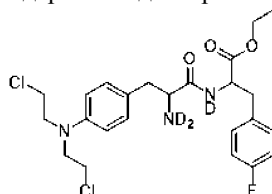
Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере восемь из R^1-R^8 представляют собой дейтерий. Например, соединение согласно настоящему изобретению имеет следующую структуру, в которой каждый из атомов, обозначенных как дейтерий (D), характеризуется большим содержанием дейтерия, чем природное содержание дейтерия



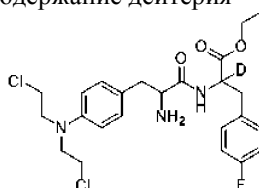
Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере два из R^9-R^{15} представляют собой дейтерий, например, по меньшей мере два из R^9-R^{12} представляют собой дейтерий. Например, соединения согласно настоящему изобретению можно выбрать из следующей группы, в которой каждый из атомов, обозначенных как дейтерий (D), характеризуется большим содержанием дейтерия, чем природное содержание дейтерия



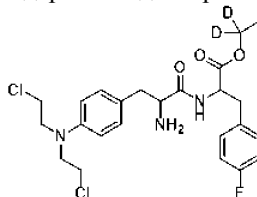
Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере три из R^{16} - R^{18} представляют собой дейтерий. Например, соединение согласно настоящему изобретению имеет следующую структуру, в которой каждый из атомов, обозначенных как дейтерий (D), характеризуется большим содержанием дейтерия, чем природное содержание дейтерия



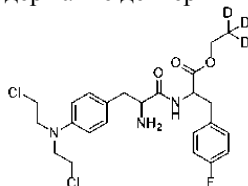
Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере один из R^{19} - R^{25} представляет собой дейтерий. Например, соединение согласно настоящему изобретению имеет следующую структуру, в которой каждый из атомов, обозначенных как дейтерий (D), характеризуется большим содержанием дейтерия, чем природное содержание дейтерия



Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере два из R^{26} - R^{30} представляют собой дейтерий. Например, соединение согласно настоящему изобретению имеет следующую структуру, в которой каждый из атомов, обозначенных как дейтерий (D), характеризуется большим содержанием дейтерия, чем природное содержание дейтерия

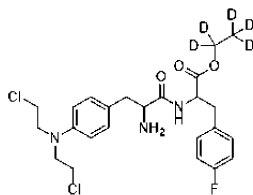


Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере три из R^{26} - R^{30} представляют собой дейтерий. Например, соединение согласно настоящему изобретению имеет следующую структуру, в которой каждый из атомов, обозначенных как дейтерий (D), характеризуется большим содержанием дейтерия, чем природное содержание дейтерия

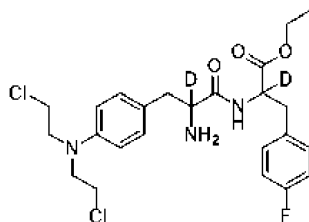


Согласно особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения пять из R^{26} - R^{30} представляют собой дейтерий (т.е. каждый из R^{26} - R^{30} представляет собой дейтерий). Например, соединение согласно настоящему изобретению имеет следующую структуру, в которой каждый из атомов, обозначенных как дейтерий (D), характеризуется большим содержанием дейтерия, чем природное со-

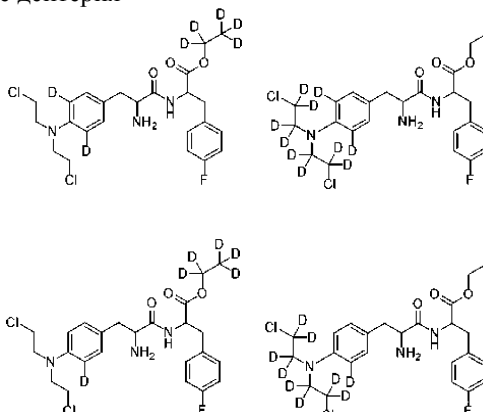
держание дейтерия



Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере один из R^9 - R^{15} представляет собой дейтерий и по меньшей мере один из R^{19} - R^{25} представляет собой дейтерий. Например, соединение согласно настоящему изобретению имеет следующую структуру, в которой каждый из атомов, обозначенных как дейтерий (D), характеризуется большим содержанием дейтерия, чем природное содержание дейтерия



Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере один из R^9 - R^{15} представляет собой дейтерий и по меньшей мере один из R^1 - R^8 или R^{26} - R^{30} представляет собой дейтерий. Например, соединения согласно настоящему изобретению можно выбрать из следующей группы, в которой каждый из атомов, обозначенных как дейтерий (D), характеризуется большим содержанием дейтерия, чем природное содержание дейтерия



Соединения согласно настоящему изобретению можно получить с применением способов, известных специалистам в области органической химии, и путем общепринятой модификации известных процедур получения мелфлуфена. Процедуры получения мелфлуфена описаны в WO 01/96367 и WO 2016/180740. Процедуры получения дейтерированных соединений известны в данной области техники. См., например, Sajiki, *New Horizons of Process Chemistry* (2017), Springer, стр. 29-40, и Hanson, *The Organic Chemistry of Isotopic Labelling* (2011), глава 3, RSC Publishing.

Соединения согласно настоящему изобретению можно получить синтетическими методами, в которых используют дейтерированные реагенты. Альтернативно, дейтерий можно ввести путем восстановления восстанавливаемых фрагментов с помощью дейтерированных восстановителей. Еще одним альтернативным подходом является применение постсинтетических реакций водородно-дейтериевого обмена с применением газообразного D_2 в присутствии металлического катализатора, например, катализатора Pd/C или Pt/C.

Соединения согласно настоящему изобретению можно получить с применением комбинации дейтерированных и недейтерированных реагентов. Подходящими дейтерированными реагентами являются реагенты, в которых уровень содержания каждого дейтерия превышает природное содержание дейтерия. Например, уровень содержания дейтерия составляет по меньшей мере 1 мол.%, 5 мол.%, 10 мол.%, 50 мол.%, 90 мол.% или 98 мол.%. Подходящие дейтерированные реагенты включают дейтерированную хлоруксусную кислоту, дейтерированный хлорэтанол, дейтерированный оксид этилена, дейтерированный этанол, дейтерированный пара-фторфенилаланин, дейтерированный пара-нитрофенилаланин и дейтерированный пара-аминофенилаланин. Дейтерированные реагенты можно приобрести у частных поставщиков. Альтернативно, их можно получить из недейтерированных реагентов посредством реакции водородно-дейтериевого обмена, как описано выше.

Соединения согласно настоящему изобретению также можно получить с применением дейтериро-

ванных восстановителей. Подходящие дейтерированные восстановители включают дейтерированный боран, комплекс дейтерированного борана-основания Льюиса, бородейтерид, дейтерид металла и газообразный D₂ в присутствии металлического катализатора.

Соединения согласно настоящему изобретению также можно получить из мелфлуфена с применением реакции водородно-дейтериевого обмена.

Конкретные способы получения соединений согласно настоящему изобретению описаны в настоящем документе в разделе "Примеры".

Во избежание неопределенности в настоящем документе при применении термина "дейтерированный мелфлуфен" указанный дейтерированный мелфлуфен включает свою соль(и), если не указано иное. Мелфлуфен и его соли, в частности, его гидрохлоридная соль, известны, например, из WO 01/96367 и WO 2014/065751, при этом такие соли подходят для применения в настоящем изобретении.

Соли дейтерированного мелфлуфена, подходящие для применения в настоящем изобретении, представляют собой соли, в которых противоион является фармацевтически приемлемым. Подходящие соли включают соли, образованные органическими или неорганическими кислотами. В частности, подходящие соли, образованные кислотами согласно настоящему изобретению, включают соли, образованные минеральными кислотами, сильными органическими карбоновыми кислотами, такими как алканкарбоновые кислоты, содержащие от 1 до 4 атомов углерода, которые не содержат или содержат заместитель, например, галоген, такими как насыщенные или ненасыщенные дикарбоновые кислоты, такие как гидроксикарбоновые кислоты, такими как аминокислоты, или образованные органическими сульфоновыми кислотами, такими как (C₁-C₄)-алкил- или арилсульфоновые кислоты, которые не содержат или содержат заместитель, например, галоген. Фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли включают соли, полученные из соляной, бромистоводородной, серной, азотной, лимонной, винной, уксусной, фосфорной, молочной, пировиноградной, уксусной, трифторуксусной, янтарной, перхлорной, фумаровой, малеиновой, гликолевой, молочной, салициловой, щавелевой, щавелевоуксусной, метансульфоновой, этансульфоновой, п-толуолсульфоновой, муравьиной, бензойной, малоновой, нафталин-2-сульфоновой, бензолсульфоновой, изэтионовой, аскорбиновой, яблочной, фталевой, аспарагиновой и глутаминовой кислот, лизина и аргинина.

Предпочтительные соли дейтерированного мелфлуфена включают кислотно-аддитивные соли, такие как соли, полученные из соляной, бромистоводородной, уксусной, п-толуолсульфоновой, винной, серной, янтарной, фосфорной, щавелевой, азотной, метансульфоновой, яблочной, малеиновой и лимонной кислоты. Более предпочтительно, соль дейтерированного мелфлуфена согласно настоящему изобретению представляет собой гидрохлоридную соль (т.е. аддитивную соль, полученную из соляной кислоты).

Специалистам в области органической химии будет понятно, что многие органические соединения могут образовывать комплексы с растворителями, в которых они взаимодействуют или из которых они осаждаются или кристаллизуются. Такие комплексы известны как "сольваты". Например, комплекс с водой известен как "гидрат". Указанный комплекс может включать растворитель в стехиометрических или нестехиометрических количествах. Сольваты описаны в *Water-Insoluble Drug Formulation*, 2nd ed R. Lui CRC Press, стр. 553 и *Wu et al. Pharm Res* 12(7), 1995, 945-954. Перед добавлением в раствор дейтерированный мелфлуфен формулы (I) и (Ia), предназначенный для применения в настоящем изобретении, или его соль может быть в форме сольвата. Сольваты дейтерированного мелфлуфена, подходящие для применения в качестве лекарственного средства, представляют собой сольваты, в которых ассоциированный растворитель является фармацевтически приемлемым. Например, гидрат представляет собой фармацевтически приемлемый сольват.

Хотя соединение согласно настоящему изобретению можно вводить само по себе, предпочтительно, чтобы оно присутствовало в композиции и, в частности, в фармацевтической композиции. Фармацевтические композиции включают композиции, подходящие для перорального, парентерального (в том числе подкожной, внутрикожной, внутрикостной инфузии, внутримышечного, внутрисосудистого (болус или инфузия) и интрамедуллярного введения), внутрибрюшинного, трансмукозального, трансдермального, ректального и местного введения (в том числе кожного применения, буккального, сублингвального и внутриглазного введения), хотя наиболее подходящий путь может зависеть, например, от состояния и расстройства субъекта, подвергаемого лечению.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению, подходящие для перорального введения, могут быть представлены в виде дискретных единиц, таких как капсулы, крахмальные облатки или таблетки, каждая из которых содержит предварительно определенное количество активного ингредиента; в виде порошка или гранул; в виде раствора или суспензии в водной жидкости или неводной жидкости; или в виде жидкой эмульсии масло в воде или жидкой эмульсии вода в масле. Дейтерированный мелфлуфен также может быть представлен в виде болуса, электуария или пасты. Различные фармацевтически приемлемые носители и их составы описаны в монографиях о стандартных составах и лекарственных формах, например, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, автор E. W. Martin (См. также Wang, Y. J. и Hanson M. A., *Journal of Parenteral Science and Technology*, Technical Report № 10, Supp. 42:2S, 1988).

Фармацевтические композиции для парентерального введения включают водные и неводные сте-

рильные растворы для инъекций, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатики и растворенные вещества, которые делают композицию изотоничной крови предполагаемого реципиента; и водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие средства и загустители. Такие составы предпочтительно могут быть представлены в контейнерах для однократных доз или для разделенных дозах, например, запаянных ампулах и флаконах. Состав можно хранить в сублимированном (лиофилизированном) состоянии, требующем только добавления стерильного жидкого носителя, например, физиологического раствора или воды для инъекций, непосредственно перед применением. В случае хорошо известного соединения мелфлуфена такие лиофилизированные составы известны из WO 2012/146625 и WO 2014/065751. Соединения согласно настоящему изобретению можно получить аналогичным образом, например, в лиофилизированной форме, содержащей активный ингредиент и сахарозу, например, при массовом отношении от 1:25 до 1:75, например 1:50. Экстемпоральные инъекционные растворы и суспензии, а также инфузионные растворы и суспензии, можно приготовить из стерильных порошков, гранул или другой сухой композиции. Примеры композиций для парентерального введения включают растворы или суспензии для инъекций, которые могут содержать, например, подходящие нетоксичные, парентерально приемлемые разбавители или растворители, такие как маннит, 1,3-бутандиол, вода, раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия или другие подходящие диспергирующие или смачивающие и суспендирующие средства, в том числе синтетические моно- или диглицериды и жирные кислоты, включая олеиновую кислоту или Cremaphor.

Фармацевтические композиции для назального, аэрозольного или ингаляционного введения включают растворы в солевом растворе, которые могут содержать, например, бензиловый спирт или другие подходящие консерванты, стимуляторы абсорбции для повышения биодоступности и/или другие солибилизирующие или диспергирующие средства, такие как средства, известные в данной области техники.

Фармацевтические композиции для ректального введения могут быть представлены в виде суппозитория с обычными носителями, такими как масло какао, синтетические сложные эфиры глицеридов или полиэтиленгликоль. Указанные носители, как правило, являются твердыми при обычных температурах, но разжижаются и/или растворяются в ректальной полости с высвобождением лекарственного средства.

Фармацевтические композиции для местного введения в рот, например буккального или сублингвального введения, включают пастилки для рассасывания, содержащие активный ингредиент в ароматизированной основе, такой как сахароза и аравийская камедь или трагакантовая камедь, и пастилки, содержащие активный ингредиент в такой основе, как желатин и глицерин или сахароза и аравийская камедь. Примеры композиций для местного применения включают носитель для местного применения, такой как Plastibase (минеральное масло, желатинизированное полиэтиленом).

Соединения, композиции и фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно использовать для лечения и/или профилактики рака, уменьшения роста опухоли и/или уничтожения опухолевых клеток. Таким образом, дейтерированный мелфлуфен можно использовать для лечения и/или продления жизни пациентов, страдающих раковыми заболеваниями. Настоящее изобретение особенно полезно при лечении и/или профилактике множественной миеломы, рака груди, рака легких, рака яичников, лейкозов и лимфом, в частности при рецидиве указанного состояния или когда такое состояние с трудом поддается лечению. Настоящее изобретение находит особое применение при лечении рецидивной рефрактерной множественной миеломы.

Количество дейтерированного мелфлуфена, необходимое для достижения терапевтического эффекта, будет меняться в зависимости от конкретного пути введения и характеристик пациента, подвергаемого лечению, например, вида, возраста, массы, пола, патологических состояний, конкретного заболевания и его тяжести и других соответствующих медицинских и физических факторов. Обычный квалифицированный врач может легко определить и ввести эффективное количество дейтерированного мелфлуфена, необходимое для лечения или профилактики рака.

Дейтерированный мелфлуфен или его соль можно вводить ежедневно, через сутки или раз в трое суток, еженедельно, каждую вторую, третью или четвертую неделю или даже в виде высокой однократной дозы в зависимости от субъекта и формы рака, подвергаемого лечению.

Дейтерированный мелфлуфен или его соль (за исключением массы любой соли) предпочтительно можно вводить в количестве от примерно 15 до 150 мг на одно введение. Например, 15, 20, 25, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 или 150 мг.

Альтернативно, дейтерированный мелфлуфен или его соль (за исключением массы любой соли) можно вводить в однократной высокой дозе. Однократная высокая доза может составлять от примерно 150 до 1200 мг, например, от примерно 150 до 800 мг. Например, такую дозу можно выбрать из 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100 и 1200 мг. Например, ее можно выбрать из 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700 и 800 мг.

Хотя согласно настоящему изобретению дейтерированный мелфлуфен или его соль можно использовать в качестве единственного активного ингредиента, его также можно использовать в комбинации с одним или более дополнительным терапевтическим агентом(ами), при этом применение таких комбинаций предложено в одном из предпочтительных вариантов реализации настоящего изобретения. Такие

дополнительные терапевтические агенты могут представлять собой средства, применимые для лечения или профилактики рака, или другие фармацевтически активные вещества. Указанные агенты известны в данной области техники. Примеры дополнительных терапевтических агентов для применения в настоящем изобретении включают стероиды (преднизон и дексаметазон), IMiDs (талидомид, леналидомид и помалидомид), PIc (бортезомиб и карфилзомиб), ингибиторы гистондеацетилазы (HDAC) (панобиностат) и обычные химиотерапевтические препараты (алкиляторы (например, мелфалан, циклофосфамид) и доксорубин).

Примеры

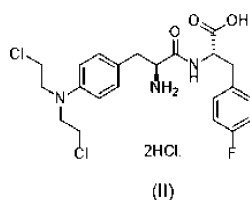
Синтез соединения согласно настоящему изобретению

Общие подробности эксперимента

Если не указано иное, все реагенты и растворители были приобретены у коммерческих источников и использовались без дополнительной очистки. Мелфлуфен и промежуточные соединения мелфлуфена можно получить с помощью методов синтеза, описанных в WO 2016/180740 или в WO 01/96367.

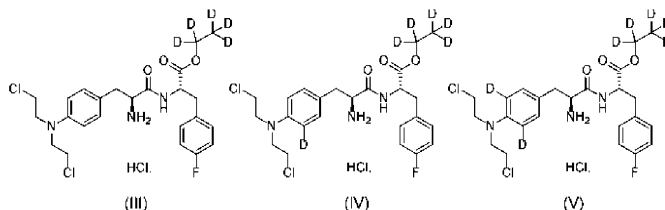
Исследования методом аналитической ВЭЖХ/ЖХМС выполняли с применением детектора для жидкостной хроматографии/масс-селективного детектора Agilent серии 1100 (MSD, одиночный квадрупольный детектор), оборудованного интерфейсом для электрораспыления и УФ-диодно-матричным детектором. Анализы выполняли двумя методами, используя либо колонку ACE 3 C8 (3,0×50 мм) с 10-97% градиентом ацетонитрила в 0,1% водной трифторуксусной кислоте (ТФК) в течение 3 мин и расходом 1 мл/мин (условие #1), либо колонку Xbridge C18 (3,0×50 мм) с 10-97% градиентом ацетонитрила в 10 мМ бикарбонате аммония в течение 3 мин и расходом 1 мл/мин (условие #2), при этом в обоих методах применяли УФ-детектирование при 305 нм. Спектры ¹H ЯМР регистрировали на приборе Bruker 400 МГц при 25°C. Исследования методом препаративной ВЭЖХ выполняли в системе Gilson, оборудованной УФ-детектором, с применением колонки Xbridge Prep C18 5 мкМ OBD (19 ×50 мм), используя ацетонитрил и 50 мМ бикарбонат аммония в качестве буфера.

Пример 1. Синтез (2S)-2-[[[(2S)-2-амино-3-[4-[бис(2-хлорэтил)амино]фенил]пропаноил]амино]-3-(4-фторфенил)пропановой кислоты (II)



Гидрохлорид мелфлуфена (500 мг, 0,93 ммоль) суспендировали в воде (10 мл) с последующим добавлением концентрированной HCl (10 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч. К реакционной смеси добавляли толуол и концентрировали полученный раствор в вакууме. Указанную процедуру повторяли три раза. Затем раствор упаривали досуха в вакууме. Неочищенную смесь использовали в примере 2 в качестве исходного вещества.

Пример 2. Синтез мелфлуфена-d5 (III), мелфлуфена-d6 (IV) и мелфлуфена-d7 (V)

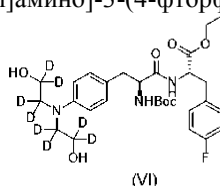


Соединение II (507 мг, 0,93 ммоль) растворяли в этаноле-d6 (4,86 г, 93,32 ммоль) и кипятили с обратным холодильником. Через 2 ч происходило почти полное превращение соединения II в сложный эфир. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и затем упаривали досуха в вакууме с получением белого твердого вещества (495 мг, 95%).

ЯМР конечного соединения показал частичное дейтерирование в орто-положениях анилиновой функциональной группы. Интегрирование дублета при δ 6,78-6,82 ppm позволило предположить, что конечный образец представлял собой гетерогенную смесь мелфлуфена-d5 (III), мелфлуфена-d6 (IV) и мелфлуфена-d7 (V), при этом указанный конечный образец содержал примерно 12,5% мелфлуфена d5. (III). Известно, что в обмене дейтерий-протон участвуют протоны в анилиновой функциональной группе при нагревании и в кислой среде в дейтерированном растворителе.

ЖХ-МС (условие #1): t_R 2,28 мин (чистота > 97%), масса/заряд [M+H] 505. ЖХ-МС (условие #2): t_R 2,63 мин (чистота > 98%), масса/заряд [M+H] 505. ¹H ЯМР (400 МГц, MeOD): δ/ppm 2,92-2,97 (m, 1H), 3,01-3,06 (m, 1H), 3,16-3,21 (dd, 2H), 3,67-3,71 (m, 4H), 3,78-3,81 (m, 4H), 4,02-4,05 (m, 1H), 4,69-4,73 (m, 1H), 6,78-6,82 (d, 0,25H), 7,02-7,07 (t, 2H), 7,19 (s, 2H), 7,24-7,28 (m, 2H).

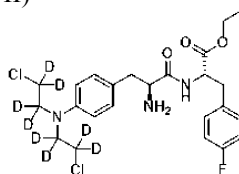
Пример 3. Синтез этил(2S)-2-[[2S)-3-[4-[бис(1,1,2,2-тетрадейтерио-2-гидроксиэтил)амино]фенил]-2-(трет-бутоксикарбониламино)пропаноил]амино]-3-(4-фторфенил)пропаноата (VI)



(VI)

Этил(2S)-2-[[2S)-3-(4-аминофенил)-2-трет-бутоксикарбониламино]пропаноил]амино]-3-(4-фторфенил)пропаноат (470 мг, 0,99 ммоль, подходящий метода синтеза см. в WO 2016/180740) суспендировали в ацетонитриле. К реакционной смеси при комнатной температуре добавляли Na_2CO_3 (210,42 мг, 1,99 ммоль). Затем реакционную смесь перемешивали в течение 15 мин перед добавлением 1,1,2,2-тетрадейтерио-2-йодэтанола (0,17 мл, 2,18 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение месяца при кипячении с обратным холодильником. После охлаждения реакционную смесь разделяли на дихлорметан (ДХМ) и воду и экстрагировали ДХМ. Концентрировали органическую фазу и очищали продукт с помощью препаративной ВЭЖХ с получением указанного в заголовке соединения (0,29 г, 51%).

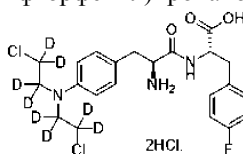
Пример 4. Синтез мелфлуфена-d8 (VII)



(VII)

Соединение VI (290 мг, 0,51 ммоль) растворяли в ДХМ с последующим медленным добавлением POCl_3 . Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь разделяли на воду и ДХМ, а затем подщелачивали путем добавления 1 М NaOH. Указанное в заголовке соединение экстрагировали диэтиловым эфиром и выпаривали растворитель в вакууме с получением указанного в заголовке соединения в виде бледно-желтой пены приблизительно 95% чистоты (96 мг, 37%). ЖХ-МС (условие #1): t_R 2,27 мин, масса/заряд $[M+H]$ 506. ЖХ-МС (условие #2): t_R 2,63 мин, масса/заряд $[M+H]$ 506. ^1H ЯМР (400 МГц, MeOD): δ /ppm; 1,00-1,15 (t, 3H), 2,80-2,84 (m, 1H), 2,91-2,95 (m, 1H), 3,04-3,09 (dd, 2H), 3,90-3,94 (m, 1H), 4,03-4,08 (q, 2H), 4,58-4,62 (m, 1H), 6,68-6,70 (d, 2H), 6,90-6,94 (t, 2H), 7,07-7,10 (d, 2H), 7,13-7,17 (m, 2H).

Пример 5. Получение (2S)-2-[[2S)-2-амино-3-[4-[бис(2-хлор-1,1,2,2-тетрадейтерио-этил)амино]фенил]пропаноил]амино]-3-(4-фторфенил)пропаноата (VIII)



(VIII)

Соединение VII (20 мг, 0,04 ммоль) суспендировали в воде (3 мл) с последующим добавлением концентрированной HCl (3 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. К реакционной смеси добавляли толуол и концентрировали полученный раствор в вакууме. Указанную процедуру повторяли три раза. Остаток растворяли в ацетонитриле/воде и переносили во флакон с последующим удалением растворителя путем применения потока N_2 с получением указанного в заголовке соединения (13,7 мг, 64%). ЖХ-МС (условие #1): t_R 1,97 мин (чистота > 95%), масса/заряд $[M+H]$ 478. ЖХ-МС (условие #2): t_R 1,72 мин (чистота > 94%), масса/заряд $[M+H]$ 478.

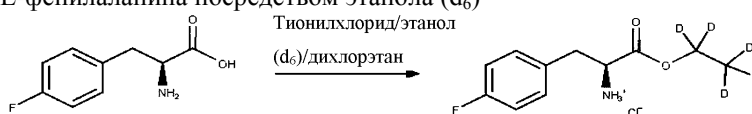
Пример 6. Биологическая активность

Для оценки соединений использовали флуоресцентный анализ микрокультур на цитотоксичность (FMCA) (Larsson, R., et al., 1992: Int J Cancer, 50,177-185). Вкратце, подготавливали 96-луночные микротитрационные планшеты (NUNC, Роскилле, Дания), используя 20 мкл раствора лекарственного средства с концентрацией, в десять раз превышающей требуемую концентрацию, которые хранили до двух месяцев при -70°C . В общем случае, вещества сначала растворяли в абсолютном или кислом этаноле до концентраций от 4,0 до 8,2 мМ, а затем разбавляли стерильной водой или стерильным фосфатно-буферным солевым раствором. Все разведения водой осуществляли непосредственно перед проведением экспериментов для минимизирования влияния гидролиза иприта. Конечные концентрации этанола не превышали 1% об./об. В нулевой день эксперимента 180 мкл суспензии клеток подходящей концентрации добавляли в лунки замороженного планшета, при этом шесть лунок служили в качестве контрольных (только суспензия клеток) и шесть лунок служили в качестве холостых (только клеточная среда). После 72 ч инкубирования клетки один раз промывали PBS и добавляли 100 мкл диацетата флуоресцеина (10 мкг/мл) в физиологическом буфере. Еще через 45 минут измеряли генерируемую флуоресценцию (возбуждение

485 нм; излучение 528 нм) в 96-луночном сканирующем флуорометре (Fluoroscan II, Labsystems Oy, Хельсинки, Финляндия). Генерируемая флуоресценция пропорциональна количеству живых клеток, и полученные данные представлены в виде показателя выживаемости (флуоресценция в тест-лунке в процентах от контрольных лунок с вычтенными значениями холостой лунки) и IC_{50} (концентрация, ингибирующая на 50%, рассчитанная с помощью программного обеспечения GraphPad Prism@ (Graphpad Software Inc., Сан-Диего, Калифорния, США). Критерии качества успешного анализа включали коэффициент вариации менее 30% в холостых лунках (шесть лунок), контрольных лунках (шесть лунок) и тест-лунках (три лунки), соответственно, контрольный сигнал более чем в десять раз превышающий сигнал холостой лунки и, наконец, исходная жизнеспособность клеток более 70% (первичные культуры опухолей человека) или 90% (клеточные линии) согласно оценке на основе теста вытеснения трипанового синего.

Диацетат флуоресцеина (FDA, Sigma) растворяли в ДМСО до концентрации 10 мг/мл и хранили в темноте в замороженном виде в качестве исходного раствора. Использовали среду роста клеток RPMI-1640 (Sigma) с добавлением 10% инактивированной нагреванием фетальной телячьей сыворотки (FCS, Sigma chemical Co., Сент-Луис, Миссури), 2 мМ глутамин, 100 мкг/мл стрептомицина и 100 мкг/мл пенициллина.

Пример 7а. Получение гидрохлорида (2H_5)этил(2S)-2-амино-3-(4-фторфенил)пропаноата путем этерификации п-фтор-L-фенилаланина посредством этанола (d_6)



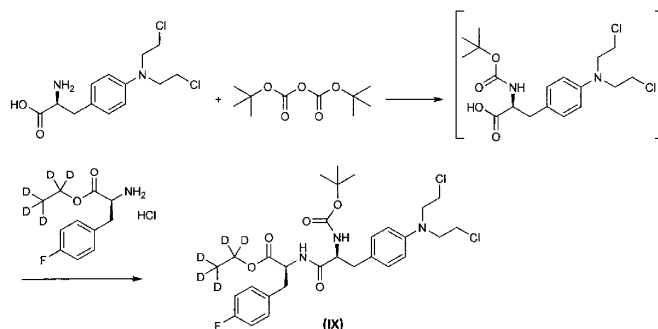
п-фтор-L-фенилаланин (1,0 кг, номер CAS 1132-68-9) суспендировали в смеси этанола- d_6 (2,5 л, номер CAS: 1516-08-1) и 1,2-дихлорэтана (2,0 л). Скруббер, содержащий NaOH (5 М раствор), соединяли с выпускным отверстием реактора, расположенным после конденсатора. Для отслеживания разложения скрубберной жидкости добавляли бромтимоловый синий (1-2 мг).

Реактор нагревали до внутренней температуры 60°C. После достижения внутренней температуры 60°C начинали добавление тионилхлорида (600 мл) с медленной скоростью. Сначала образовался очень густой осадок. Первоначально очень густая суспензия разжижалась в процессе реакции. Общее время добавления составляло примерно 3 ч. Обеспечивали достижение внутренней температуры не более 70°C и контролировали указанную температуру путем регулирования соответствующим образом температуры обшивки. После завершения добавления температуру обшивки регулировали таким образом, чтобы поддерживать внутреннюю температуру в диапазоне от 65 до 70°C.

Полное превращение в требуемый гидрохлорид (2H_5)этил(2S)-2-амино-3-(4-фторфенил)пропаноата достигали через 3 ч после момента завершения добавления тионилхлорида. После подтверждения полного превращения (анализ ЖХ-МС в следующих условиях: колонка ACE 3 C8 (3,0×50 мм) с 10-90% градиентом В в течение 3 мин; подвижная фаза А, водная 0,1% ТФК, подвижная фаза В, чистый ацетонитрил, расход 1 мл/мин, УФ-детектирование при 215-395, 254 и 220 нм), реакционную смесь охлаждали (внутренняя температура примерно 45°C) и добавляли трет-бутилметилового эфира (12,5 л) с получением продукта в виде белого осадка. Смесь перемешивали до получения гомогенной смеси.

Затем полученную смесь охлаждали до внутренней температуры 0°C и оставляли созреть при такой температуре до фильтрации в течение примерно 30 мин. Твердый гидрохлорид (2H_5)этил(2S)-2-амино-3-(4-фторфенил)пропаноата промывали с применением примерно 1 л трет-бутилметилового эфира и затем высушивали при максимальной температуре 30°C при пониженном давлении. Полученный продукт осторожно просеивали для удаления комков, если таковые имелись. Практический выход гидрохлорида (2H_5)этил(2S)-2-амино-3-(4-фторфенил)пропаноата составлял 92%. ЖХ-МС: t_R 1,43 мин, масса/заряд [M+H] 217.

Пример 7b. Получение килограммовых количеств (2H_5)этил(2S)-2-[(2S)-3-{4-[бис(2-хлорэтил)амино]фенил}-2-[[трет-бутоксикарбонил]амино}пропанамидо]-3-(4-фторфенил)пропаноата (IX)



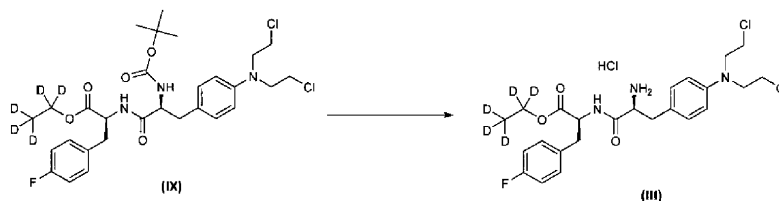
Мелфалан (1,663 кг, 5,45 моль, 1 экв.) добавляли к смеси, состоящей из очищенной воды (16,0 кг), NaOH (32%, водный, 1,04 кг) и тетрагидрофурана (10,0 кг), при 10-15°C. Добавляли смесь ди-трет-

бутилдикарбоната (1,308 кг, 5,99 моль, 1,1 экв.) и тетрагидрофурана (4,75 кг) при 10-15°C. Реакционную смесь перемешивали в течение от 4 до 5 ч при 18-23°C до достижения степени превращения мелфалана не менее 97,0% (ВЭЖХ). Температуру доводили до 15-20°C и при поддержании указанной температуры доводили pH до 2,5-3,0 с помощью 1,5 М HCl. Добавляли этилацетат (7,34 кг) и разделяли фазы. Водную фазу экстрагировали этилацетатом (7,34 кг). Объединенные органические фазы высушивали с помощью сульфата магния, фильтровали и промывали фильтрационный осадок этилацетатом. Растворители удаляли путем перегонки в вакууме и высушивали остаток, содержащий (2S)-3-{4-[бис(2-хлорэтил)амино]фенил}-2-[[трет-бутоксикарбонил]амино]пропановую кислоту, в вакууме в течение не менее 12 ч при 20-25°C. ВЭЖХ: время удерживания 11,9 мин. (Условия ВЭЖХ были следующими: растворитель для образцов ацетонитрил:вода, 1:1 (об./об.), колонка Waters, Atlantic T3 (3 мкм, 4,6×150 мм), 10-90-10% градиент В в течение 23 мин, расход 1 мл/мин, подвижная фаза А: 500 мкл 85% фосфорной кислоты в 1,0 л воды качества MQ, подвижная фаза В: 500 мкл 85% фосфорной кислоты в 1,0 л ацетонитрила, с УФ-детектированием при 262 нм).

Остаток в виде (2S)-3-{4-[бис(2-хлорэтил)амино]фенил}-2-[[трет-бутоксикарбонил]амино]пропановой кислоты повторно растворяли в дихлорметане (44,0 кг). Добавляли 4-метилморфолин (1,378 кг, 13,63 моль, 2,5 экв.) с последующим добавлением гидрохлорида (²H₅)этил(2S)-2-амино-3-(4-фторфенил)пропаноата (1,377 кг, 5,45 моль, 1,0 экв.), 1-гидроксибензотриазола, H₂O (0,083 кг, 0,54 моль, 0,1 экв.) и N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида, HCl (1,045 кг, 5,45 моль, 1,0 экв.). Реакционную смесь перемешивали в течение от 3 до 4 ч при 18-23°C до достижения степени превращения (2S)-3-{4-[бис(2-хлорэтил)амино]фенил}-2-[[трет-бутоксикарбонил]амино]пропановой кислоты в (²H₅)этил(2S)-2-[(2S)-3-{4-[бис(2-хлорэтил)амино]фенил}-2-[[трет-бутоксикарбонил]амино]пропанамидо]-3-(4-фторфенил)пропаноат не менее 97,0% (ВЭЖХ) (условия ВЭЖХ были следующими: растворитель для образцов ацетонитрил, колонка Waters, Atlantic T3 (3 мкм, 4,6×150 мм), 10-90-10% градиент В в течение 23 мин, расход 1 мл/мин, подвижная фаза А: 500 мкл 85% фосфорной кислоты в 1,0 л воды качества MQ, подвижная фаза В: 500 мкл 85% фосфорной кислоты в 1,0 л ацетонитрила, с УФ-детектированием при 262 нм).

С помощью 5% KHSO₄ (водн.) доводили pH до 3,0-4,0. Отделяли органическую фазу и экстрагировали водную фазу дихлорметаном (29,0 кг). Первую органическую фазу промывали 6% NaHCO₃. Отделяли органическую фазу и оставшуюся водную фазу подвергали обратной экстракции с применением второй органической фазы. Объединенные органические фазы высушивали с помощью сульфата магния, фильтровали и промывали дихлорметаном. Высушенную органическую фазу концентрировали путем перегонки в вакууме до получения от 22 до 26 л. Восстановленную органическую фазу применяли в колоночной хроматографии (силикагель (40-63 мкм, 22,4 кг), n-гептан (6,7 кг) и дихлорметан (52,2 кг)). Колонку элюировали с помощью 6% этилацетата/дихлорметана. Фракции, содержащие (²H₅)этил(2S)-2-[(2S)-3-{4-[бис(2-хлорэтил)амино]фенил}-2-[[трет-бутоксикарбонил]амино]пропанамидо]-3-(4-фторфенил)пропаноат (ТСХ) объединяли и упаривали при пониженном давлении до получения от 26 до 28 л. Добавляли этилацетат (5,8 кг) и продолжали выпаривание до получения от 26 до 28 л. Повторяли указанную процедуру. После добавления этилацетата начиналось осаждение (²H₅)этил(2S)-2-[(2S)-3-{4-[бис(2-хлорэтил)амино]фенил}-2-[[трет-бутоксикарбонил]амино]пропанамидо]-3-(4-фторфенил)пропаноата. Необязательно, для облегчения осаждения можно добавлять затравочные кристаллы (²H₅)этил(2S)-2-[(2S)-3-{4-[бис(2-хлорэтил)амино]фенил}-2-[[трет-бутоксикарбонил]амино]пропанамидо]-3-(4-фторфенил)пропаноата. Снова добавляли этилацетат (5,8 кг), при этом необязательную стадию затравки можно повторить. Полученную смесь упаривали при пониженном давлении до получения от 19 до 21 л и добавляли n-гептан (22,1 кг) при 35-45°C. Суспензию охлаждали до от -2 до 2°C и перемешивали в течение от 2 до 18 ч. Твердое вещество выделяли путем центрифугирования и промывали фильтрационный осадок с помощью n-гептана. Твердое вещество высушивали в вакууме при 30°C с получением (²H₅)этил(2S)-2-[(2S)-3-{4-[бис(2-хлорэтил)амино]фенил}-2-[[трет-бутоксикарбонил]амино]пропанамидо]-3-(4-фторфенил)пропаноата (2,6 кг, 80%) в виде твердого вещества от белого до слегка желтого цвета. ВЭЖХ: время удерживания 13,4 мин.

Пример 7с. Получение килограммовых количеств мелфлуфена-d5 (III) (гидрохлорид (²H₅)этил(2S)-2-[(2S)-2-амино-3-{4-[бис(2-хлорэтил)амино]фенил}пропанамидо]-3-(4-фторфенил)пропаноата)



Раствор (²H₅)этил(2S)-2-[(2S)-3-{4-[бис(2-хлорэтил)амино]фенил}-2-[[трет-бутоксикарбонил]амино]пропанамидо]-3-(4-фторфенил)пропаноата (соединение IX) (3,10 кг, 5,14 моль) в 1,3 М HCl в ацетонитриле, полученный из хлористого водорода (1,31 кг, 35,9 моль) и ацетонитрила (21,7 кг), перемешива-

ли в течение от 12 до 24 ч при 29-33°C. Получали степень превращения (²H₅)этил(2S)-2-[(2S)-3-{4-[бис(2-хлорэтил)амино]фенил}-2-[[трет-бутоксикарбонил]амино]пропанамидо]-3-(4-фторфенил)пропаноата в гидрохлорид (²H₅)этил(2S)-2-[(2S)-2-амино-3-{4-[бис(2-хлорэтил)амино]фенил}пропанамидо]-3-(4-фторфенил)пропаноата не менее 99,0% (ВЭЖХ) (условия ВЭЖХ были следующими: растворитель для образцов ДМСО, ацетонитрил, 1:9 (об./об.), колонка Waters, Atlantic T3 (3 мкм, 4,6×150 мм), 10-90-10% градиент В в течение 23 мин, расход 1 мл/мин, подвижная фаза А: 500 мкл 85% фосфорной кислоты в 1,0 л воды качества MQ, подвижная фаза В: 500 мкл 85% фосфорной кислоты в 1,0 л ацетонитрила, с УФ-детектированием при 262 нм).

Реакционную смесь подвергали окончательной фильтрации и разбавляли ацетонитрилом (68,9 кг). Затем осуществляли перегонку при пониженном давлении при применении температуры рубашки 45°C. При достижении объема реакционной смеси 86 л добавляли ацетонитрил (22,7 кг) и продолжали перегонку. Когда оставалось 86 л реакционной смеси, добавляли ацетонитрил (22,7 кг) и продолжали перегонку. Когда объем в реакторе составлял 86 л, добавляли ацетонитрил (22,7 кг) и продолжали перегонку до достижения в реакторе объема 86 л.

Добавляли трет-бутилметилловый эфир (68,4 кг) в течение от 25 до 45 мин при 35-45°C с последующим охлаждением до 22-28°C. После перемешивания при такой температуре в течение от 60 до 120 мин неочищенный гидрохлорид (²H₅)этил(2S)-2-[(2S)-2-амино-3-{4-[бис(2-хлорэтил)амино]фенил}пропанамидо]-3-(4-фторфенил)пропаноата отфильтровывали и промывали трет-бутилметилловым эфиром (12,5 кг). Неочищенное вещество высушивали в вакууме в реакторе при заданном значении температуры рубашки 30°C.

Добавляли ацетонитрил (84,0 кг) и перемешивали полученную суспензию в течение от 30 до 90 минут при 48-54°C с последующим охлаждением до 40-45°C. Добавляли трет-бутилметилловый эфир (74,6 кг) в течение от 40 до 70 мин при 38-45°C с последующим охлаждением до 22-28°C. После перемешивания при такой температуре в течение от 60 до 120 мин неочищенный гидрохлорид (²H₅)этил(2S)-2-[(2S)-2-амино-3-{4-[бис(2-хлорэтил)амино]фенил}пропанамидо]-3-(4-фторфенил)пропаноата отфильтровывали и промывали трет-бутилметилловым эфиром (14,0 кг). Сушка в вакууме при 30-35°C позволила получить гидрохлорид (²H₅)этил(2S)-2-[(2S)-2-амино-3-{4-[бис(2-хлорэтил)амино]фенил}пропанамидо]-3-(4-фторфенил)пропаноата (мелфлуфен-d₅, (III)) (2,5 кг, 90%) в виде твердого вещества от белого до грязно-белого цвета. ВЭЖХ: время удерживания 9,0 мин.

Биологические испытания

Пример (а). Исследование *in vivo* на собаках

Было проведено сравнительное исследование токсичности однократной дозы на собаках, в котором сравнивали мелфлуфен-d₅ (III) и мелфлуфен, для изучения токсикокинетики мелфлуфена и мелфлуфена-d₅ (III) и их метаболитов, дезэтилмелфлуфена и мелфалана, после однократного внутривенного введения собаке мелфлуфена-d₅ (III) или мелфлуфена в форме 30-минутной инфузии.

(i) Введение и цели

Целью данного исследования было сравнение потенциальной острой токсичности мелфлуфена-d₅ (III) и мелфлуфена. Токсикокинетику мелфлуфена-d₅ (III), мелфлуфена и их метаболитов дезэтилмелфлуфена и мелфалана оценивали после однократного внутривенного введения собакам в форме 30-минутной инфузии.

(ii) Материалы и методы

Сокращения

В настоящем документе использовали следующие сокращения:

AUC _∞	Площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени до бесконечного времени
AUC _{last}	Площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени до последней определяемой концентрации
C _{last}	Последняя определяемая концентрация в плазме
C _{max}	Максимальная концентрация в плазме
%CV	Коэффициент вариации среднего значения в процентах
час	Час
SD	Стандартное отклонение
t _{1/2,z}	Кажущийся конечный период полувыведения
T _{last}	Время последней определяемой концентрации
T _{max}	Время достижения максимальной концентрации
%AUC _{extr}	Процент экстраполированной площади

План исследования

Мелфлуфен-d₅ (III) или мелфлуфен вводили самцам и самкам собак в форме 30-минутной инфузии

согласно следующей схеме:

Тестируемая группа	Введенное соединение	Доза (мг/кг)	Объем (мл/кг)	Концентрация (мг/мл)	Количество животных	
					Самцы	Самки
1	5% раствор глюкозы	0 (носителем)	5	0	3	3
2	мелфлуфен-d5 (III)	1,25	5	0,25	3	3
3	мелфлуфен-d5 (III)	2,5	5	0,5	3	3
4	мелфлуфен	2,5	5	0,5	3	3

Контрольная группа получала 5% раствор глюкозы.

Сбор образцов

Образцы крови брали из периферической вены в день 1 перед введением дозы, через 15 минут, 30 минут (непосредственно перед окончанием инфузии), 40 мин, 1, 2, 4 и 6 ч после начала инфузии).

Образцы крови собирали в гепаринизированные пробирки для сбора образцов, помещали в баню с ледяной водой и сразу же центрифугировали (3 мин, 10000 g, + 4°C). Полученную плазму разделяли на две аликвоты, помещали в предварительно охлажденные криопробирки и в морозильную камеру при -70°C до проведения анализа.

Токсикокинетические расчеты

Токсикокинетические анализы плазмы на мелфлуфен-d5 (III), мелфлуфен и их метаболиты, дезэтил-мелфлуфен и мелфалан, проводили в соответствии со стандартным некомпартментным подходом с применением системы Phoenix WinNonlin (v. 6.3, Certara Company, США).

После введения C_{max} максимальная концентрация и T_{max} , время, за которое была достигнута максимальная концентрация, принимали за координаты наивысшей концентрации в плазме во времени. C_{last} , последняя определяемая концентрация и T_{last} , время последней определяемой концентрации, приведены в качестве параметров.

Площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени до последней определяемой концентрации, AUC_{last} , рассчитывали с применением линейного правила трапеций.

По возможности рассчитывали следующие параметры:

$t_{1/2,z}$, период полувыведения в конечной фазе, рассчитывали с помощью линейного регрессионного анализа кривой зависимости натурального логарифма концентрации от времени согласно формуле

$$t_{1/2,z} = \frac{\ln(2)}{\lambda_z}$$

где λ_z представляет собой наклон регрессионной кривой. Оценку $t_{1/2,z}$ проводили по меньшей мере в трех временных точках.

AUC_{∞} - площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени до бесконечного времени, рассчитывали путем добавления части площади, рассчитанной как C_{last}/λ_z , к AUC_{last} при условии моноэкспоненциального спада.

Долю AUC_{∞} , приходящуюся на экстраполированную площадь под кривой, рассчитывали следующим образом:

$$\%AUC_{extr} = 100 \cdot \frac{AUC_{last-\infty}}{AUC_{\infty}}$$

Концентрации в плазме на основе индивидуальных и описательных статистических данных (среднее значение $\pm SD$, %CV) и токсикокинетические параметры приведены с тремя значащими цифрами.

(iii) Результаты

Мелфлуфен-d5 (III), мелфлуфен и их метаболиты дезэтилмелфлуфен и мелфалан не определялись в образцах плазмы контрольной группы (группа 1), а также в отобранных до введения дозы образцах групп 2, 3 и 4, подвергаемых лечению.

Параметры системного воздействия мелфлуфена-d5 (III), мелфлуфена и их метаболитов, дезэтил-мелфлуфена и мелфалана, на самцов и самок были сопоставимы, поэтому также были приведены описательные статистические данные параметров объединенной группы самцов и самок.

Мелфлуфен-d5 (III)

Обобщенные токсикокинетические параметры мелфлуфена-d5 (III) представлены в табл. 1 и 2.

Таблица 1

			Мелфлуфен-d5 (III)			
Группа	Пол		Tmax (ч)	Cmax (мкмоль/л)	Tlast (ч)	AUClast (ч×мкмоль/л)
2	Самцы	Среднее значение	0,250	0,0977	0,556	0,0377
		SD	0,00	0,0339	0,0964	0,0137
		CV%	0,00	34,7	17,4	36,4
2	Самки	Среднее значение	0,500	0,0993	0,50	0,0296
		SD	0,00	0,0326	0,00	0,00925
		CV%	0,00	32,8	0,00	31,3
3	Самцы	Среднее значение	0,417	0,346	0,611	0,124
		SD	0,144	0,107	0,0964	0,0497
		CV%	34,6	31,0	15,8	40,1
3	Самки	Среднее значение	0,333	0,159	0,611	0,0564
		SD	0,144	0,0271	0,0964	0,021
		CV%	43,3	17,1	15,8	37,2

Таблица 2

			Мелфлуфен-d5 (III)			
Группа	Пол		Tmax (ч)	Cmax (мкмоль/л)	Tlast (ч)	AUClast (ч×мкмоль/л)
2	Самцы +самки	Среднее значение	0,375	0,0985	0,528	0,0336
		SD	0,137	0,0297	0,0682	0,0114
		CV%	36,5	30,2	12,9	33,9
3	Самцы +самки	Среднее значение	0,375	0,253	0,611	0,0902
		SD	0,137	0,124	0,0862	0,0503
		CV%	36,5	49,3	14,1	55,8

Мелфлуфен-d₅ (III), который вводили путем инфузии в течение 30 мин в дозах 1,25 и 2,5 мг/кг (группы 2 и 3), достигал своей максимальной концентрации в плазме в середине инфузии, а затем исчезал в пределах 40 мин от начала дозирования. Вследствие недостаточного количества временных точек при проведении конечной фазы период полувыведения не рассчитывали.

Воздействие мелфлуфена-d₅ (III) в отношении пика и площади под кривой увеличивалось с дозой (в 2,7 раз относительно 2-кратного увеличения дозы, рассчитано на основе обобщенных тендерных параметров).

Средние +SD концентрации в плазме мелфлуфена-d₅ (III) после введения 1,25 и 2,5 мг/кг показаны на фиг. 1.

Мелфлуфен

Обобщенные токсикокинетические параметры мелфлуфена приведены в следующих табл. 3 и 4.

Таблица 3

			Мелфлуфен			
Группа	Пол		Tmax (ч)	Cmax (мкмоль/л)	Tlast (ч)	AUClast (ч×мкмоль/л)
4	Самцы	Среднее значение	0,250	0,124	0,500	0,0326
		SD	0,00	0,0469	0,00	0,0112
		CV%	0,00	37,7	0,00	34,4
4	Самки	Среднее значение	0,417	0,163	0,500	0,0539
		SD	0,144	0,0812	0,00	0,0319
		CV%	34,6	49,8	0,00	59,2

Таблица 4

Группа	Пол		Мелфлуфен			
			T _{max} (ч)	C _{max} (мкмоль/л)	T _{last} (ч)	AUC _{last} (ч×мкмоль/л)
4	Самцы +самки	Среднее значение	0,333	0,144	0,500	0,0433
		SD	0,129	0,063	0,00	0,0244
		CV%	38,7	43,8	0,00	56,4

Аналогично мелфлуфену-d₅ (III) кинетику мелфлуфена, введенного путем инфузии в течение 30 мин в дозе 2,5 мг/кг (группа 4), характеризовали пик через 15-30 мин и быстрое исчезновение из плазмы.

Сравнение системного воздействия мелфлуфена-d₅ (III) и мелфлуфена

Сравнение индивидуальных и средних (\pm SD) параметров системного воздействия мелфлуфена-d₅ (III) (группа 3, 2,5 мг/кг) и мелфлуфена (группа 4, 2,5 мг/кг) в объединенной группе самцов и самок собак породы бигль показано на фиг. 2 (C_{max}) и фиг. 3 (AUC_{last}).

Среднее воздействие мелфлуфена было в 2 раза ниже, чем воздействие мелфлуфена-d₅ (III) в дозе 2,5 мг/кг. Как показано на фиг. 2 и 3, различие средних значений частично было обусловлено высокими концентрациями, измеренными у одного самца собаки, получавшего мелфлуфен-d₅ (III). Однако, как можно видеть на фиг. 2 и 3, на которых показаны индивидуальные значения C_{max} и AUC_{last} для каждого животного, существует четкая тенденция к увеличению C_{max} и увеличению AUC_{last} в случае применения мелфлуфена-d₅ (III) по сравнению с мелфлуфеном.

Изменчивость между животными (CV%) в двух группах была одного и того же порядка величины.

Дезэтилмелфлуфен

Обобщенные токсикокинетические параметры метаболита дезэтилмелфлуфена приведены в табл. 5 и 6.

Таблица 5

Группа	Пол		Дезэтил-мелфлуфен			
			T _{max} (ч)	C _{max} (мкмоль/л)	T _{last} (ч)	AUC _{last} (ч×мкмоль/л)
2	Самцы	Среднее значение	0,500	0,0356	0,667	0,0155
		SD	0,00	0,00678	0,00	0,00334
		CV%	0,00	19,0	0,00	21,5
2	Самки	Среднее значение	0,500	0,0308	0,667	0,0132
		SD	0,00	0,00123	0,00	0,00108
		CV%	0,00	3,98	0,00	8,15
3	Самцы	Среднее значение	0,417	0,134	1,00	0,0655
		SD	0,144	0,0703	0,00	0,0364
		CV%	34,6	52,4	0,00	55,6
3	Самки	Среднее значение	0,50	0,0703	1,00	0,0358
		SD	0,00	0,0063	0,00	0,0035
		CV%	0,00	8,96	0,00	9,78
4	Самцы	Среднее значение	0,50	0,0822	1,00	0,0363
		SD	0,00	0,034	0,00	0,0143
		CV%	0,00	41,3	0,00	39,4
4	Самки	Среднее значение	0,417	0,0605	0,889	0,0287
		SD	0,144	0,00317	0,192	0,00592
		CV%	34,6	5,24	21,6	20,6

Таблица 6

Группа	Пол		Дезэтил-мелфлуфен			
			T _{max} (ч)	C _{max} (мкмоль/л)	T _{last} (ч)	AUC _{last} (ч×мкмоль/л)
2	Самцы +самки	Среднее значение	0,500	0,0332	0,667	0,0144
		SD	0,00	0,0051	0,00	0,00256
		CV%	0,00	15,4	0,00	17,8
3	Самцы +самки	Среднее значение	0,458	0,102	1,00	0,0506
		SD	0,102	0,0567	0,00	0,0283
		CV%	22,3	55,5	0,00	55,8
4	Самцы +самки	Среднее значение	0,458	0,0714	0,945	0,0325
		SD	0,102	0,0246	0,136	0,0106
		CV%	22,3	34,5	14,4	32,7

После инфузии 1,25 и 2,5 мг/кг мелфлуфена-d₅ (III) (группы 2 и 3) в момент первого взятия образцов в плазме появлялся метаболит дезэтилмелфлуфен, который достигал своей максимальной концентрации через 15-30 мин и больше не определялся через 40-60 мин после введения дозы (1,25-2,5 мг/кг). Период полувыведения, оцениваемый только на одном животном при введении дозы 2,5 мг/кг, составлял 5 мин.

Воздействие дезэтилмелфлуфена на C_{max} увеличивалось в 3,1 раза и на AUC_{last} в 3,5 раза относительно 2-кратного увеличения дозы мелфлуфена-d₅ (III) (рассчитано на основе объединенных тендерных параметров).

После введения мелфлуфена (группа 4) профиль дезэтилмелфлуфена в плазме был аналогичен профилю, наблюдаемому после введения мелфлуфена-d₅ (III), в отношении t_{max} и t_{last}. Период полувыведения, оцениваемый только у одного животного при введении дозы 2,5 мг/кг, составлял 7 мин.

Сравнение системного воздействия дезэтилмелфлуфена после введения мелфлуфена-d₅ (III) или мелфлуфена

Сравнение индивидуальных и средних (\pm SD) параметров системного воздействия дезэтилмелфлуфена после инфузии мелфлуфена-d₅ (III) (группа 3, 2,5 мг/кг) и мелфлуфена (группа 4, 2,5 мг/кг) в объединенной группе самцов и самок собак породы бигль показано на фиг. 4 (C_{max}) и фиг. 5 (AUC_{last}).

Среднее воздействие дезэтилмелфлуфена было ниже после инфузии мелфлуфена в количестве 2,5 мг/кг, чем после инфузии мелфлуфена-d₅ (III) в количестве 2,5 мг/кг. Как показано на фиг. 4 и 5, различие средних значений в основном было обусловлено высокими концентрациями дезэтил-мелфлуфена, измеренными у одного самца собаки, получавшего мелфлуфен-d₅ (III). Однако, как можно видеть на фиг. 4, на которой показаны индивидуальные значения C_{max} для каждого животного, существует тенденция к увеличению C_{max} дезэтил-мелфлуфена после инфузии мелфлуфена-d₅ (III) по сравнению с мелфлуфеном.

Мелфалан

Обобщенные токсикокинетические параметры метаболита мелфалана приведены в табл. 7 и 8.

Таблица 7

			Мелфалан					
Группа	Пол		Tmax (ч)	Cmax (мкмоль/л)	Plast (ч)	AUClast (ч×мкмоль/л)	T1/2,z (ч)	AUC∞ (ч×мкмоль/л)
2	Самцы	Среднее значение	0,556	1,33	4	1,77	0,658	1,80
		SD	0,0964	0,174	0	0,295	0,071	0,312
		CV%	17,4	13,1	0	16,7	10,8	17,3
2	Самки	Среднее значение	0,500	1,13	4	1,44	0,654	1,47
		SD	0,00	0,0701	0	0,216	0,0186	0,221
		CV%	0,00	6,17	0	15	2,84	15,1
3	Самцы	Среднее значение	0,500	2,93	4	3,28	0,658	3,33
		SD	0,00	0,751	0	0,517	0,0203	0,522
		CV%	0,00	25,6	0	15,8	3,09	15,7
3	Самки	Среднее значение	0,500	2,59	4	2,99	0,587	3,03
		SD	0,00	0,286	0	0,293	0,0407	0,302
		CV%	0,00	11,0	0	9,80	6,94	10,0
4	Самцы	Среднее значение	0,500	2,40	4	2,84	0,681	2,9
		SD	0,00	0,649	0	0,0622	0,0362	0,0534
		CV%	0,00	27,1	0	2,19	5,31	1,84
4	Самки	Среднее значение	0,500	2,07	4	2,61	0,626	2,64
		SD	0,00	0,565	0	0,752	0,0662	0,747
		CV%	0,00	27,3	0	28,9	10,6	28,3

Таблица 8

Группа	Пол		Мелфалан					
			T _{max} (ч)	C _{max} (мкмоль/л)	T _{last} (ч)	AUC _{last} (ч×мкмоль/л)	T _{1/2,z} (ч)	AUC _∞ (ч×мкмоль/л)
2	Самцы +самки	Среднее значение	0,528	1,23	4	1,60	0,656	1,63
		SD	0,0682	0,161	0	0,292	0,0465	0,304
		CV%	12,9	13	0	18,2	7,09	18,6
3	Самцы +самки	Среднее значение	0,5	2,76	4	3,13	0,622	3,18
		SD	0	0,542	0	0,408	0,0484	0,416
		CV%	0	19,7	0	13,0	7,78	13,1
4	Самцы +самки	Среднее значение	0,5	2,23	4	2,72	0,654	2,77
		SD	0	0,572	0	0,494	0,0563	0,495
		CV%	0	25,6	0	18,1	8,62	17,8

После инфузии 1,25 и 2,5 мг/кг мелфлуфена-d₅ (III) в момент первого взятия образцов в плазме появлялся метаболит мелфалан, который достигал своей максимальной концентрации в среднем через t_{max} 30 минут и определялся в течение до 4 часов после введения каждой дозы мелфлуфена-d₅ (III). Расчетный период полувыведения составлял примерно 40 мин.

После инфузии мелфлуфена (группа 4) профиль мелфалана в плазме был сопоставим с профилем, полученном при введении мелфлуфена-d₅ (III). T_{max} и t_{last} мелфалана при двух способах лечения были одинаковыми.

Воздействие мелфалана в отношении пика и значений AUC увеличивалось с введением дозы мелфлуфена-d₅ (III): при объединении параметров собак разного пола 2-кратное увеличение дозы соответствовало 2,2-кратному увеличению средней C_{max} и 2,0-кратному увеличению AUC_{last} и AUC_∞ метаболита.

При введении двух нарастающих доз мелфлуфена-d₅ (III) AUC_{last} мелфалана была в 48 и 35 раз выше, чем воздействие мелфлуфена-d₅ (III), соответственно (рассчитано на основе средних значений AUC_{last} с применением объединенных данных собак разного пола). При введении двух нарастающих доз мелфлуфена-d₅ (III) AUC_{last} мелфалана была в среднем в 51,1 раза (диапазон от 37 до 70) и 44,8 раза (диапазон от 22 до 100) выше, чем воздействие мелфлуфена-d₅ (III), соответственно (рассчитано на основе индивидуальных значений объединенной группы собак разного пола).

После инфузии мелфлуфена AUC_{last} мелфалана была в среднем в 75 раз (диапазон от 38 до 142) выше, чем воздействие мелфлуфена (рассчитано на основе индивидуальных значений объединенной группы собак разного пола).

Средние +SD концентрации в плазме мелфлуфена-d₅ (III), мелфалана и дезэтил-мелфлуфена после инфузии мелфлуфена-d₅ (III) собакам (объединенные группы собак разного пола) в группе 2 или группе 3 показаны на фиг. 6а (группа 2, логарифмическая шкала) и 6б (группа 2, нелогарифмическая шкала) и фиг. 7а (группа 3, логарифмическая шкала) и 7б (группа 3, нелогарифмическая шкала). Как показано на фигурах 7а и 7б, средняя C_{max} после инфузии 2,5 мг/кг мелфлуфена-d₅ (III) составляла 2,73 мкмоль/л.

Средние +SD концентрации в плазме мелфлуфена, мелфалана и дезэтил-мелфлуфена после инфузии мелфлуфена собакам (объединенная группа собак разного пола) в группе 4 показаны на фиг. 8а (группа 4, логарифмическая шкала) и 8б (группа 4, нелогарифмическая шкала). Как показано на фиг. 8а и 8б, средняя C_{max} после инфузии 2,5 мг/кг мелфлуфена составляла 2,23 мкмоль/л.

Сравнение системного воздействия мелфалана после приема мелфлуфена-d₅ (III) или мелфлуфена

Сравнение индивидуальных и средних (± SD) параметров системного воздействия мелфалана после инфузии мелфлуфена-d₅ (III) (группа 3, 2,5 мг/кг) и мелфлуфена (группа 4, 2,5 мг/кг) в объединенной группе самцов и самок собак породы бигль показаны на фиг. 9 (C_{max}) и фиг. 10 (AUC_{last}). Результаты определения t_{1/2,z} и AUC_∞ также показаны на фиг. 11 и 12 соответственно.

Среднее воздействие мелфалана было ниже после инфузии мелфлуфена в количестве 2,5 мг/кг, чем

после инфузии мелфлуфена-d₅ (III) в количестве 2,5 мг/кг. Как можно видеть на фиг. 9, 10 и 21, на которых показаны индивидуальные значения C_{max}, AUC_{last} и AUC_∞ для каждого животного, наблюдается тенденция к увеличению C_{max}, увеличению AUC_{last} и увеличению AUC_∞ мелфалана после инфузии мелфлуфена-d₅ (III) по сравнению с мелфлуфеном. Как показано на фиг. 11, среднее значение t_{1/2,z} для мелфалана было ниже после инфузии мелфлуфена-d₅ (III) в количестве 2,5 мг/кг, чем после инфузии мелфлуфена, при этом наблюдается тенденция к снижению t_{1/2,z} для мелфалана у отдельных животных после инфузии мелфлуфена-d₅ (III) по сравнению с мелфлуфеном.

Выводы

Показатели системного воздействия мелфлуфена-d₅ (III), мелфлуфена и их метаболитов дезэтил-мелфлуфена и мелфалана после однократной 30-минутной инфузии мелфлуфена-d₅ (III) (1,25 и 2,5 мг/кг) или мелфлуфена (2,5 мг/кг) были одинаковыми у самцов и самок.

После инфузии мелфлуфена-d₅ (III) мелфлуфен-d₅ (III) и его метаболит дезэтил-мелфлуфен быстро исчезали из системного кровотока. Воздействие дезэтилмелфлуфена составляло примерно половину от воздействия исходного соединения.

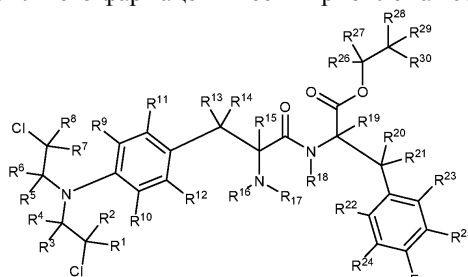
Метаболит мелфалан образовался быстро и в больших количествах. Мелфалан обнаруживали в плазме через 4 ч после окончания инфузии, при этом он разрушался с конечным периодом полувыведения примерно 40 мин. T_{max}, t_{last} и t_{1/2,z} мелфалана были постоянными в промежутке между дозами мелфлуфена-d₅ (III). В объединенной группе собак разного пола степень воздействия образовавшегося мелфалана была примерно в 50 раз выше, чем степень воздействия мелфлуфена-d₅ (III).

После увеличения нарастающих доз мелфлуфена-d₅ (III) при инфузии системное воздействие увеличивалось, как ожидалось (мелфалан) и немного больше, чем ожидалось (мелфлуфен-d₅ (III) и дезэтил-мелфлуфен), при условии пропорциональности доз.

Сравнивая эквивалентные дозы мелфлуфена-d₅ (III) и мелфлуфена, общее воздействие мелфлуфена-d₅ (III) и активного метаболита мелфалана была стабильно выше после инфузии мелфлуфена-d₅ (III) по сравнению с мелфлуфеном. Повышенное воздействие мелфлуфена-d₅ (III) и мелфалана при одинаковых дозах мелфлуфена-d₅ (III) и мелфлуфена является очень значительным преимуществом.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль



Формула (I)

где

каждый R¹-R⁸ и R²⁶-R³⁰ независимо выбран из группы, состоящей из H и дейтерия, при этом по меньшей мере один из R¹-R⁸ и R²⁶-R³⁰ представляет собой дейтерий с уровнем содержания дейтерия, составляющим по меньшей мере 1 мол.%; и

каждый R⁹-R²⁵ представляет собой водород.

2. Соединение по п.1, в котором каждый R¹-R⁸ и R²⁶-R³⁰ независимо выбран из группы, состоящей из H и дейтерия, при этом по меньшей мере один из R¹-R⁸ и R²⁶-R³⁰ представляет собой дейтерий с уровнем содержания дейтерия, составляющим по меньшей мере 5 мол.%, 10 мол.%, 50 мол.%, 90 мол.% или 98 мол.%.

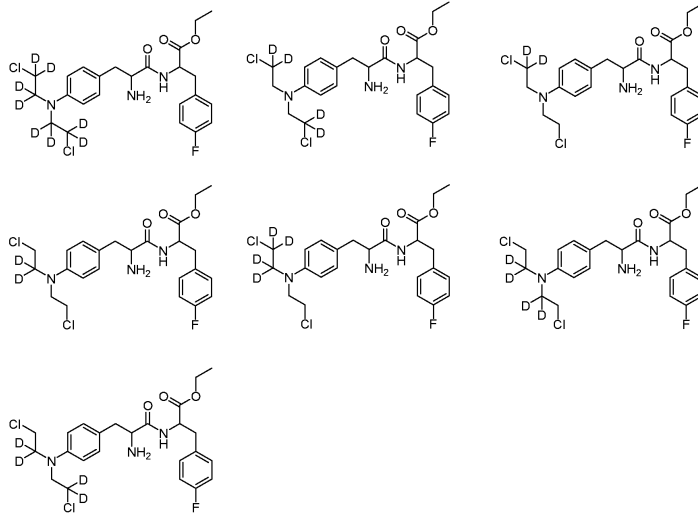
3. Соединение по п.1 или 2, в котором по меньшей мере один из R¹-R⁸ представляет собой дейтерий с уровнем содержания по меньшей мере 5 мол.% или по меньшей мере один из R²⁶-R³⁰ представляет собой дейтерий с уровнем содержания по меньшей мере 5 мол.%.

4. Соединение по п.3, в котором по меньшей мере два из R²⁶-R³⁰ представляют собой дейтерий.

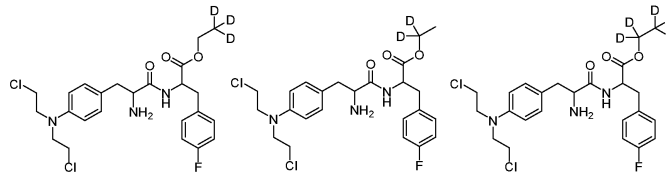
5. Соединение по п.4, в котором по меньшей мере два, три или четыре или каждый из R²⁶-R³⁰ представляет собой дейтерий.

6. Соединение по п.4 или 5, в котором уровень содержания дейтерия составляет от 10 до 98 мол.%.

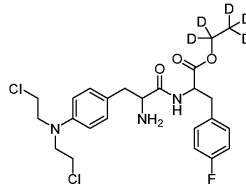
7. Соединение по п.3, отличающееся тем, что указанное соединение имеет структурную формулу, выбранную из следующей группы:



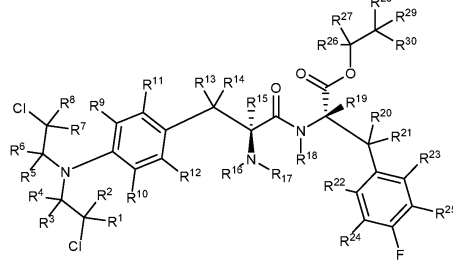
8. Соединение по пп.3, 4, 5 или 6, отличающееся тем, что указанное соединение имеет структурную формулу, выбранную из следующей группы:



9. Соединение по п.8, отличающееся тем, что указанное соединение имеет следующую структурную формулу:

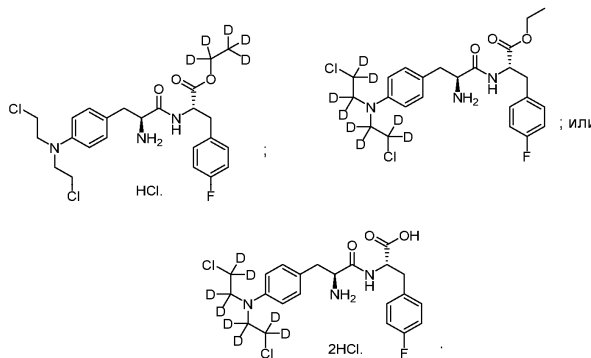


10. Соединение по п.1 или 2, или его фармацевтически приемлемая соль, отличающееся тем, что указанное соединение имеет структуру в соответствии с формулой (Ia)



(Ia)

11. Соединение по п.1, отличающееся тем, что указанное соединение имеет структурную формулу, выбранную из следующей группы:



12. Соединение по п.1, отличающееся тем, что указанное соединение представляет собой гидрохлорид $(^2\text{H}_5)$ этил (2S)-2-[(2S)-2-амино-3-{4-[бис(2-хлорэтил)амино]фенил}пропанамидо]-3-(4-фторфе-

нил)пропаноата.

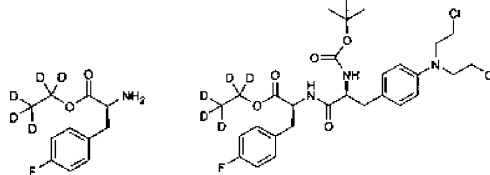
13. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение, определенное в любом из пп.1-2, вместе с фармацевтически приемлемым носителем.

14. Применение соединения по любому из пп.1-12 или фармацевтической композиции по п.13 в качестве лекарственного средства для лечения или профилактики множественной миеломы.

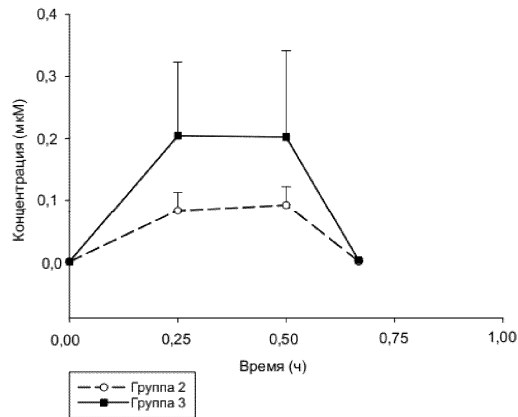
15. Применение соединения по любому из пп.1-12 или фармацевтической композиции по п.13 для лечения или профилактики множественной миеломы.

16. Способ лечения или профилактики для лечения или профилактики множественной миеломы, включающий введение эффективного количества соединения по пп.1-12 или фармацевтической композиции по п.13.

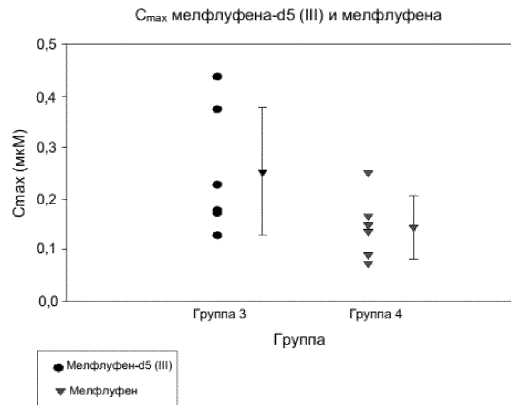
17. Соединение, имеющее структурную формулу, выбранную из следующей группы:



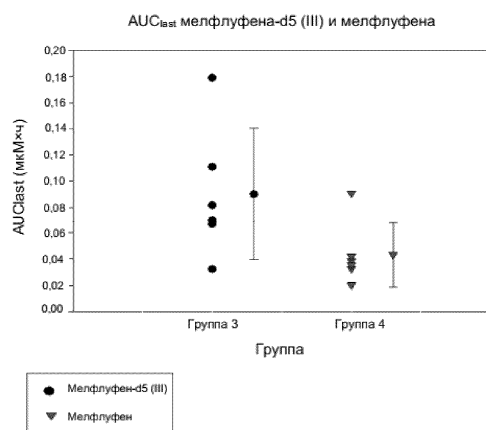
или его фармацевтически приемлемая соль.



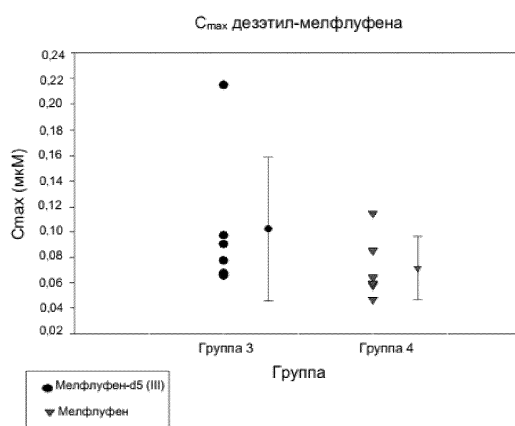
Фиг. 1



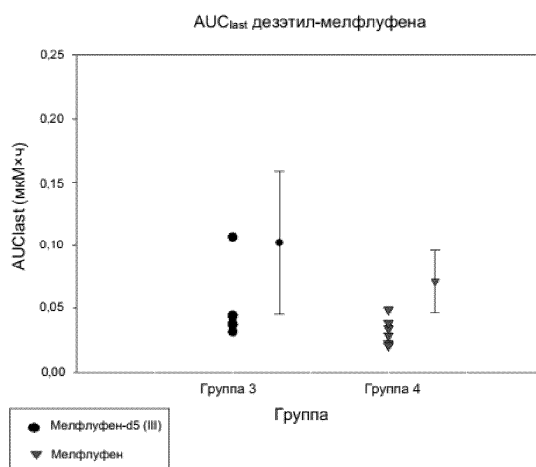
Фиг. 2



Фиг. 3

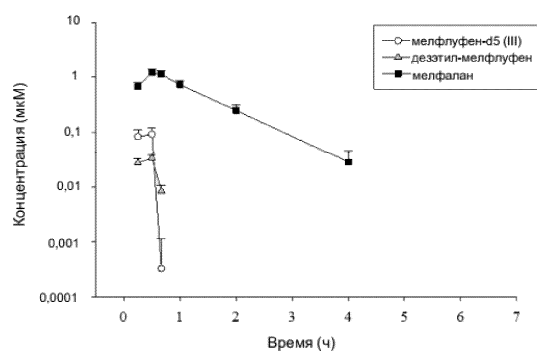


Фиг. 4



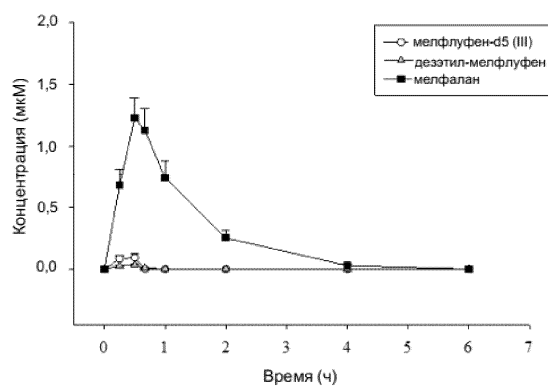
Фиг. 5

группа 2



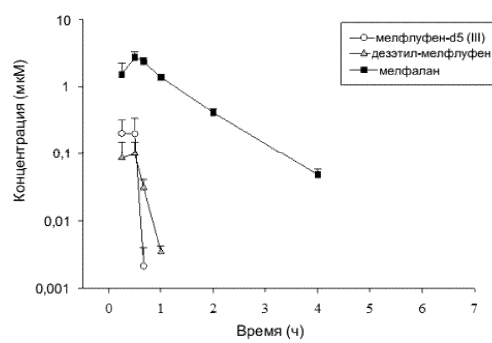
Фиг. 6а

группа 2



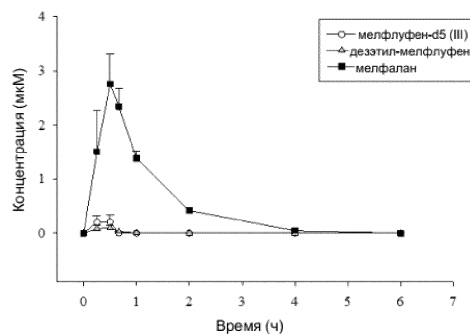
Фиг. 6б

группа 3

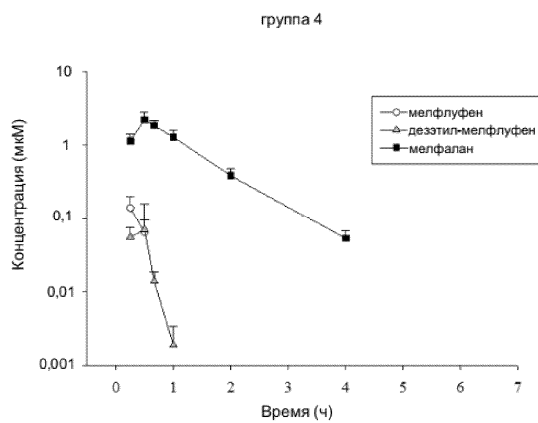


Фиг. 7а

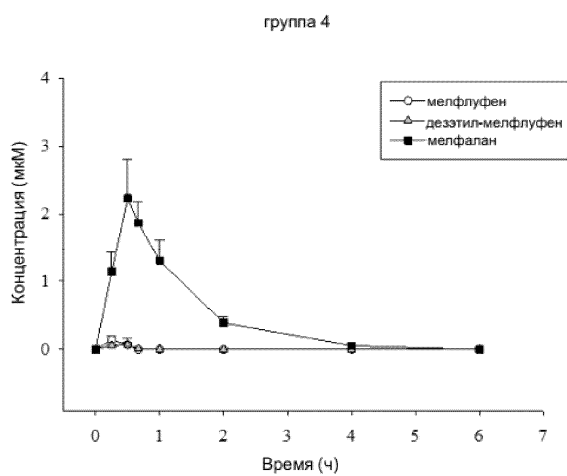
группа 3



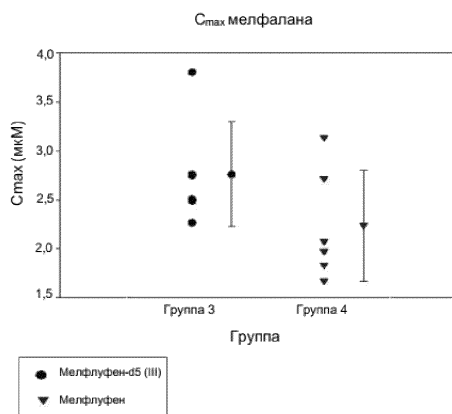
Фиг. 7б



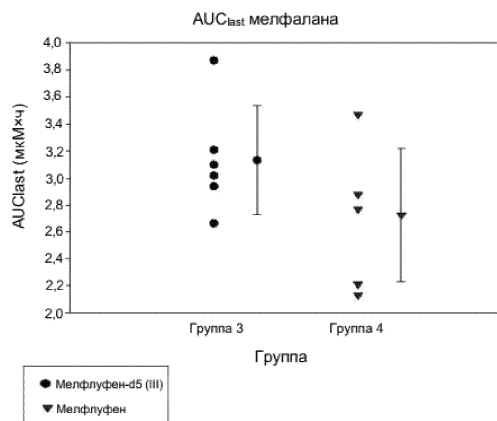
Фиг. 8а



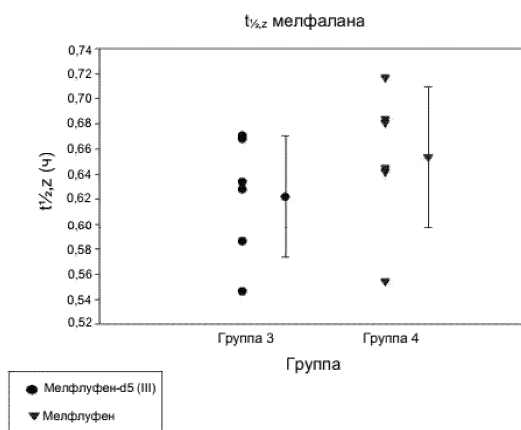
Фиг. 8b



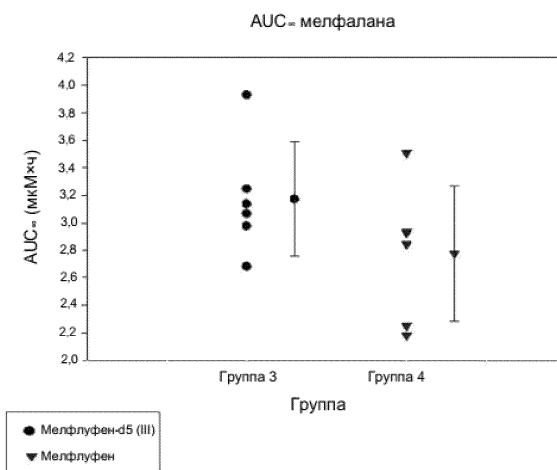
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12

