

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6929299号
(P6929299)

(45) 発行日 令和3年9月1日(2021.9.1)

(24) 登録日 令和3年8月12日(2021.8.12)

(51) Int.Cl.	F 1
A 61 K 31/53	(2006.01) A 61 K 31/53
A 61 K 9/19	(2006.01) A 61 K 9/19
A 61 K 9/08	(2006.01) A 61 K 9/08
A 61 P 35/00	(2006.01) A 61 P 35/00
A 61 P 35/02	(2006.01) A 61 P 35/02

請求項の数 8 (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願2018-550649 (P2018-550649)
(86) (22) 出願日	平成28年12月10日 (2016.12.10)
(65) 公表番号	特表2019-505571 (P2019-505571A)
(43) 公表日	平成31年2月28日 (2019.2.28)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2016/025175
(87) 國際公開番号	W02017/102097
(87) 國際公開日	平成29年6月22日 (2017.6.22)
審査請求日	令和1年9月26日 (2019.9.26)
(31) 優先権主張番号	1500520-0
(32) 優先日	平成27年12月18日 (2015.12.18)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	スウェーデン(SE)

(73) 特許権者	518214038 ヴィヴォルックス アーベー
	スウェーデン国 751 83 ウブサラ 、ウブサラ サイエンス パーク、ネクス トーベ アーベー 気付
(74) 代理人	110000855 特許業務法人浅村特許事務所
(72) 発明者	リンデール、スティグ スウェーデン国、プロンマ、アットウンダ ヴェーゲン 4
審査官	高橋 樹理

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インドール誘導体を含む医薬組成物、その調製方法及びその使用

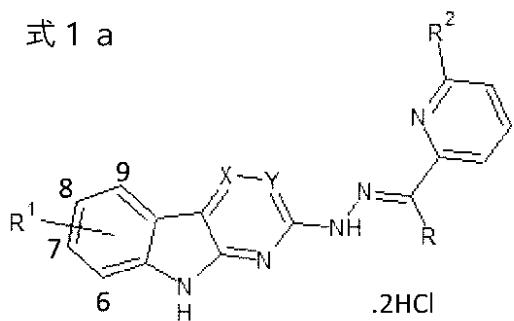
(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

薬理学的に活性な化合物の、薬学的に許容可能な一般式 1 a の二塩酸塩を含む癌の治療の使用のための凍結乾燥物である医薬組成物：

【化 1】

式 1 a



10

式中、RはH又はメチル、 CH_3CH_2 、もしくは $\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ であり、

R¹は、H、 6-CH_3 、 7-Cl 、 6-Cl 、 8-OCCH_3 、 8-OCF_3 、 9-Br 、 8-Cl 及び 8-CH_3 からなる群から選択され；

20

R² は、H であり；
 X は、C H 又はN であり；
 Y は、C H 又はN であり、

前記薬理学的に活性な化合物の少なくとも 95 重量% (w / w) は、E 異性体の形態で
 あり、

前記薬理学的に活性な化合物は、結晶形態の二塩酸塩であり、かつ室温における、製剤原
 料及び生成物の国際調和会議 (I C H) ガイドライン Q 1 A (R 2) 安定性試験 (ICH gu
 idelines Q1A Stability Testing of New Drug Substances and Products) において、少
 なくとも 12 ヶ月の安定性を有する。

【請求項 2】

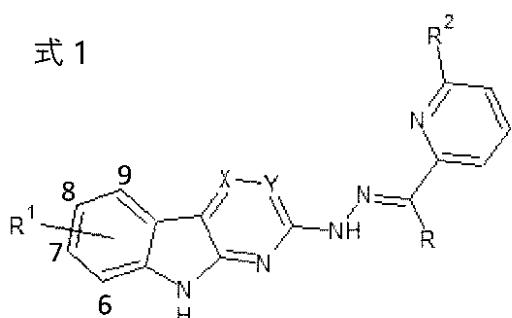
0.1 ~ 10 % (w / v) の濃度の薬学的に許容可能な添加剤をさらに含む、請求項 1
 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

以下のステップを含む、請求項 1 又は 2 に記載の医薬組成物を調製する方法：

i) 遊離塩として一般式 1 の化合物の溶液を提供するステップ、

式 1



10

20

式中、R は H 又はメチル、C H₃ C H₂、もしくはC H₂ C (C H₃)₃ であり、
R¹ は、H、6 - C H₃、7 - C l、6 - C l、8 - O C H₃、8 - O C F₃、9 - B
 r、8 - C l 及び 8 - C H₃ からなる群から選択され；

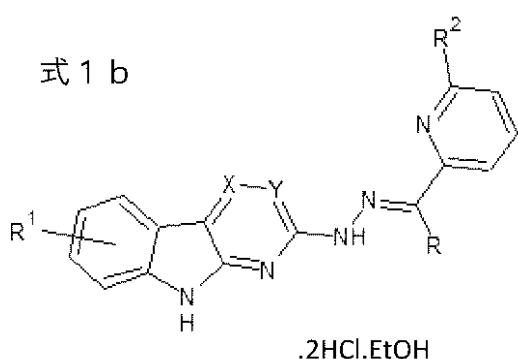
R² は、H であり；

X は、C H 又はN であり；

Y は、C H 又はN である、

i i) 前記溶液を一般式 1 の化合物を二塩酸塩に形成するのに十分な量のエタノール中の
 塩酸 (pH の範囲は 1 ~ 4) と反応させて二塩酸塩を形成するステップであって、ここで、二塩酸塩は、自発的に沈殿し、該二塩酸塩は一般式 1 b の化合物を含む、ステップ、

式 1 b



30

40

式中、R は H 又はメチル、C H₃ C H₂、もしくはC H₂ C (C H₃)₃ によって置換
 されたメチレンであり、

50

R¹は、H、6 - C H₃、7 - Cl、6 - Cl、8 - O C H₃、8 - O C F₃、9 - Br、8 - Cl及び8 - C H₃からなる群から選択され；

R²は、Hであり；

Xは、C H又はNであり；

Yは、C H又はNであり、

残留エタノールが二塩酸塩沈殿物の2～20重量%の範囲であり、

i i i) 溶媒のステップ(i i)で得られる二塩酸塩を含む沈殿物をストリッピングするステップ、

i v) 任意に、薬学的に許容可能な添加物を含む、水性溶媒中にステップ(i i i)の二塩酸塩を溶解させるステップ、及び

v) 下記表に従い混合物を凍結乾燥し、それによって請求項1又は2に記載の二塩酸塩化合物を含む凍結乾燥粉末又はケーキを得るステップ。

表3

ステップタイプ	温度(T °C)	時間(時間)	真空(mbar)
棚	5	/	/
凍結ステップ	5	0.30	/
凍結ランプ	-45	0.50	/
凍結ステップ	-45	4	/
凍結ランプ(アニーリング)	-25	1	/
凍結ステップ(アニーリング)	-25	2	/
凍結ランプ(アニーリング)	-45	1	/
凍結ステップ	-45	4	/
チャンバーバキューム	-45	/	0.200
一次乾燥	-45	0.10	0.200
一次乾燥ランプ	25	3	0.200
一次乾燥ステップ	25	XX*	0.200
二次乾燥ランプ	25	10	最大
サイクルの終わり			

【請求項4】

請求項1又は2に記載の医薬組成物を0.5～30mg/mlの範囲の最終濃度及びpH 0.5～4の範囲の水性溶媒中において再構成することによって調製される、点滴液に適した医薬組成物。

【請求項5】

10

20

30

40

50

治療を必要とする対象に投与される、対象において癌を治療する使用において用いられる請求項 1、2 又は 4 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 6】

癌が、固体腫瘍、液体腫瘍又は血液腫瘍である、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

別の抗癌治療と組み合わされる、請求項 1～2 及び 4～6 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 8】

有効量が、0.01～10 mg / kg 体重、0.1～5 mg / kg 体重、又は 1～4 mg / kg 体重の範囲である、請求項 1～2 及び 4～7 のいずれかに記載の医薬組成物。 10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、その高い薬理学的に活性な異性体の高い内容を含む、インドール誘導体の改善された安定な医薬組成物に関する。本発明はまた、組成物の使用による癌の治療の方法及びその調製方法に関する。本発明はまた、組成物の使用による癌の治療のための方法及びその調製のための方法に関する。本発明はさらに、薬理学的に活性な化合物の大規模合成を可能にすることに関する。 20

【0002】

インドール誘導体及びその薬学的に許容可能な塩は、N-メチリデン実体におけるシス/トランス異性体 (Z/E 異性体) の混合物の形態で、WO 2012/128689 及び WO 2014/046589 に開示される。これらの化合物は、固体癌の治療で有用である。抗癌効果は、化合物の鉄-キレート化特性に基づくと考えられている。生理学的条件における異性化の速度は、実質的であると思われたので、異性体の薬理学的效果は、実質的に類似しているか、又は同一であるとさえ推定された。

【0003】

Eshbala は、N-(1-ピリジン-2-イル-メチリデン)-N-(9H-1,3,4,9-テトラザ-フルオレン-2-イル)-ヒドラジン誘導体を抗ウイルス及び抗癌剤として開示し、ここで、1つの化合物のみが細胞傷害活性を示す。医薬組成物は、特にその薬理学的に活性な成分が明確に定義されていることが望ましい。したがって、化合物は、2つの異性体に存在する場合、前記化合物のより活性な異性体が、その医薬組成物において支配的でなければならないことが不可欠である。また、医薬組成物は、その成分の顕著な変化なしに、長期間保存するのに十分なほど安定でなければならない。 30

【0004】

新たしく効果的な抗癌剤は、癌に罹患している患者のために開発が必要である。最終的な製品に到達するまで、全面的な薬物開発は、多くの困難に関連している。当初、有望な化合物が同定され、異なるインビトロモデルにおいて実験的に試験され、その後、異なるマウスモデルの使用によって全臨床試験が最も頻繁に開始される。この点までは、少量の化合物しか合成する必要がなく、純度の要求は、ヒトで行われる臨床研究で必要とされるものよりも低い。例えば、活性化合物を同定及び単離し、特定の異性体が他のものよりも強力であるかどうか、純度、安定性の許容される程度をさらに有し、前記化合物が、大規模で製造ができるかを調査し、重要である薬剤開発における多くのステップがある。これらは、些細なステップではなく、上記のような製造上の問題により、多くの有望な化合物 / 薬剤が市場に出回っていない。 40

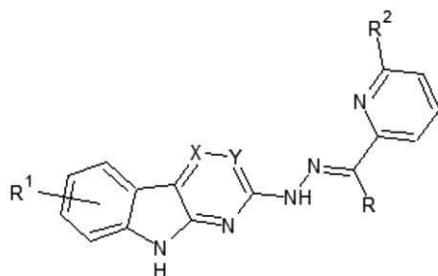
【0005】

発明の概要

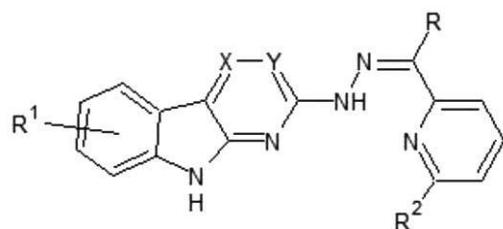
本発明は、式 1 の E 及び Z 形態の混合物が、高立体純度のそれらの二塩酸塩の E 形態に移すことができることという洞察に基づく 50

【化1】

式1



E形態



Z形態

10

【0006】

本発明の第1の目的は、一般式1で表される化合物又は薬学的に許容される塩の薬学的に活性な異性体(E)の高含量を含む明確で安定な医薬組成物を提供することであり、式中：

RはH又はメチル又はC₁-C₄直鎖又は分枝アルキルで置換されるメチレンであり、

R¹は、H、C₁-C₄直鎖又は分枝アルキル、メトキシ、1~3個のフッ素、臭素で置換されるメトキシ、及びハロゲンからなる群から選択され；

20

R²は、H又はC₁-C₄直鎖又は分枝アルキルであり；

Xは、CH又はNであり、

Yは、CH又はNであり、及び

ここで、薬理学的に活性な化合物又は薬学的に許容可能な塩の少なくとも95重量%(w/w)は、本請求項1に記載のE異性体の形態である。

【0007】

医薬組成物は、癌の治療に使用されることが意図される。1つの側面において、前記化合物の少なくとも96重量%、又は97重量%、又は98重量%、又は少なくとも98.5重量%は、E型である。別の側面において、薬理学的に活性な化合物の少なくとも99重量%、好ましくは少なくとも99.5重量%、最も好ましくは少なくとも99.8重量%がE異性体の形態である。理想的には、前記化合物の100重量%は、E異性体の形態である。本発明の医薬組成物はまた、少なくとも1つの薬理学的に許容可能な添加剤及び/又は担体をさらに含み得る。

30

【0008】

本発明の好ましい態様によれば、一般式1の化合物は、R¹によって置換されていないモノ-、ジ-又はトリ-アザカルバゾリルの6、7、7、9位の1つで、C₁-C₄直鎖又は分枝アルキルによってさらに置換され得る。

【0009】

一般式1、並びに1a及び1bの好ましい化合物を表1に列挙する。

1つの態様において、R及びR¹は、CH₃であり、R²は、Hである。好ましくは、RはCH₃であり、R¹は6-CH₃であり、R²はHである。より好ましくはX及びYは、Nである。

40

【0010】

また別の態様において、RはCH₂C(CH₃)₃であり、R¹はCH₃であり、R²はHである。好ましくは、RはCH₂C(CH₃)₃であり、R¹は、6-CH₃である、R²はHである。より好ましくは、X及びYはNである。

本発明の最も好ましい化合物は、化合物A、B及びCである(表1参照)。

【0011】

1つの態様において、本発明の医薬組成物は、結晶形態の薬学的に許容可能な塩の形態の一般式1の薬理学的に活性な化合物を含む。塩は、式1の遊離塩基の安定化に適した任

50

意の塩、すなわち、例えば塩化物、硝酸塩及び硫酸塩などの酸性塩であり得る。塩は、モノ又はジ塩であり得る。好ましくは、塩は、モノ塩又は二塩酸塩である。最も好ましくは、二塩酸塩である。

【0012】

添加剤(複数可)は、マンニトール、グルコース、スクロース又は他の適切な糖誘導体のいずれかであり得る。好ましい態様において、添加剤は、D-マンニトールである。D-マンニトールの濃度は、0.5~20% (w/v) の範囲であり得る。好ましくは、濃度は、1.0~15重量% (w/v) の範囲である。より好ましくは、濃度は、3~10% (w/v) の範囲である。最も好ましくは、濃度は、4~6% (w/v) の範囲である。D-マンニトールの濃度は、別の側面において、約5% (w/v) であることがより好ましい。

【表1】

表1 本発明の例示的な化合物

化合物	R	R ¹	R ²	X	Y
A	CH ₃	6-CH ₃	H	N	N
B	CH ₂ CH ₃	6-CH ₃	H	N	N
C	CH ₂ C(CH ₃) ₃	6-CH ₃	H	N	N
D	CH ₃	7-Cl	H	N	N
E	CH ₃	6-Cl	H	N	N
F	CH ₃	8-0CH ₃	H	N	N
G	CH ₃	8-0CF ₃	H	N	N
H	CH ₃	9-Br	H	N	N
I	CH ₃	8-Cl	H	N	N
J	CH ₃	8-CH ₃	H	N	N
K	H	6-CH ₃	H	CH	CH

【0013】

本発明は、上記医薬組成物を調製する方法をさらに提供する。方法は、以下のステップを含む：

- i . 遊離塩基として一般式1の化合物の溶液を提供するステップ、
- ii . 溶液を一般式1 b の化合物、すなわち、二塩酸塩を形成するのに十分な量のエタノール中の塩酸と反応させるステップであって、二塩酸塩が自発的に析出するステップ；
- iii . 溶媒のステップ(iii)で得られた二塩酸塩を含む沈殿物をストリッピングするステップ、

iv . 任意には、薬学的に許容可能な添加剤を含む、水性溶媒中にステップ(iii)の二塩酸塩を含む沈殿物を溶解するステップ、及び

- v . 混合物を凍結乾燥させ、それによって凍結乾燥粉末又はケーキを得るステップ。

10

20

30

40

50

【0014】

一般式1の遊離塩基の溶媒は、例えばメタノールであり得る。沈殿物のストリッピング、すなわちステップ(i i i)は、例えば空気又は不活性ガスブリードによって真空でされ得る。

E異性体の量は、上記医薬組成物と同じ範囲である。

1つの態様において、水性溶媒は水である。好ましくは、滅菌水である。

【0015】

添加剤(複数可)は、上記の通りであることができる。沈殿物を溶解させる順序は、プロセスにおいて限定されず、変更され得る。沈殿物は、例えば、固体形態であり得、添加剤と例えば固体形態で混合され得、攪拌しながら水性溶媒に添加され得る。あるいは、添加剤は、固体沈殿物が添加され、攪拌しながら溶解される水溶液に溶解され得る。10

【0016】

さらなる目的は、前記貯蔵安定性医薬組成物の水溶液の形態の注射又は点滴のための医薬製剤を提供することである。

水性溶媒においてステップ(v)の凍結乾燥粉末を再構成することにより、例えば、注射用水(WFI)として、医薬製剤が得られる。

【0017】

薬理学的に活性な化合物の濃度は、0.05~40mg/mlの範囲であり得る。1つの態様において、薬理学的に活性な化合物の濃度は、0.1~30mg/mlの範囲である。より好ましくは、薬理学的に活性な化合物は、0.5~20mg/mlの範囲であり得る。さらにより好ましくは、薬理学的に活性な化合物は、0.75~10mg/mlの範囲であり得る。前記薬理学的に活性な化合物の濃度は、最も好ましくは、約1mg/mlであり得る。20

【0018】

製剤のpHは4未満である。前記製剤のpHは、薬理学的に活性な化合物の濃度に依存し、通常、0.5~4の範囲である。例えば、薬理学的に活性な化合物の1mg/mlの濃度を有する製剤は、2~3の範囲のpHを有する。

【0019】

再構成は、第1の量の溶媒を添加することによって凍結乾燥物を溶解させ、その後所望の最終濃度まで溶媒を添加するなど、1つ以上のステップで実施され得る。30

前記薬理学的に活性な化合物を含む凍結乾燥粉末を再構築するための水性溶媒はまた、上記のような薬理学的に許容可能な添加剤を含み得る。

【0020】

本発明の別の目的は、本発明の医薬組成物を単独で、又は別の抗癌治療と組み合わせて、本発明の医薬組成物を使用することによって対象の癌を緩和、軽減又は治療するための方法を提供することである。

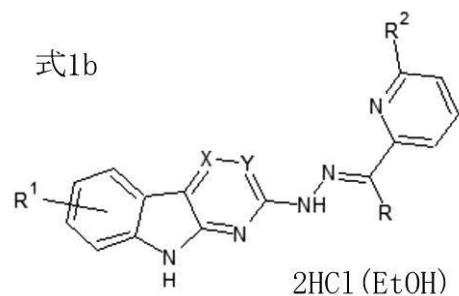
【0021】

医薬製剤の投与経路は、点滴入又は注射によるものであり得る。しかしながら、製剤又は組成物の投与のための任意の適切な経路を使用し得る。製剤又は組成物は、例えば、動脈内、筋肉内、胸膜内、経口、直腸、経腸、病変内又は腫瘍内、及び髄腔内投与で投与され得る。40

【0022】

本発明の別の目的は、一般式1bで例示される沈殿物を提供することであり、

【化2】



10

式中、一般式1bの少なくとも95重量% (w/w)の薬理学的に活性な化合物は、E異性体の形態である。

【0023】

E異性体の量は、上記の医薬組成物の範囲と同じであり得る。

一般式1bの化合物は、式1のインドール誘導体の沈殿物であり、ここで置換R、R¹、R²、X及びYは、式1について上記で定義した通りである。一般式1bの好ましい化合物を表1に列挙する。一般式1bの最も好ましい化合物は、表1の化合物A、B及びCとして置換される。

【0024】

本発明の別の目的は、上記の前記化合物又はその薬学的に許容可能な塩を含む沈殿物を調製する方法を提供することであり、前記方法は、医薬組成物について上記のプロセスステップi)~ii)に対応する。

20

【0025】

1つの側面において、エタノール中の二塩酸（すなわち、ステップii）を2つのステップで添加し、エタノール中の塩酸の1.0~1.15当量を第1のステップで添加し、エタノール中の塩酸の2.0~2.5当量を第2ステップで添加する。あるいは、1つのステップ又は複数のステップで添加を行い得る。塩は、ステップ(iii)において自発的に沈殿する。

上記の沈殿物はまた、医薬組成物中で使用されることができる。

【0026】

30

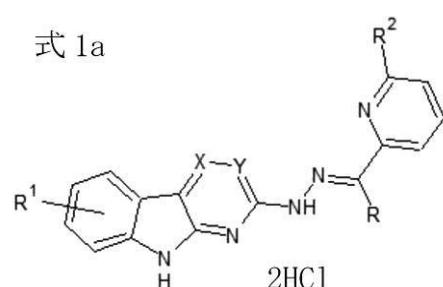
沈殿物を直接的に、又は凍結乾燥物へのさらなる加工前の乾燥後に使用されることがある。

前記沈殿物のエタノール含量は、前記沈殿物の2~15重量%の範囲である。好ましくは、前記沈殿物の4~13重量%又は、9~11重量%の範囲である。1つの態様において、エタノールの量は、前記沈殿物の10.4~10.6重量%である。

【0027】

本発明は、一般式1aの化合物を含む凍結乾燥物をさらに提供し、

【化3】



40

式中、一般式1aの薬理学的に活性な化合物の少なくとも95重量% (w/w)は、E異性体の形態である。E異性体の量は、上記の医薬組成物について同じ範囲であり得る。

【0028】

50

一般式 1 a の化合物は、式 I について上記インドール誘導体の二塩酸塩である。

最も好ましい化合物は、上記式 1 及び 1 b について記載されるような置換基である。

【 0 0 2 9 】

本発明は、前記凍結乾燥物を調製する方法をさらに提供し、その方法は、以下のステップを含む：

a) 一般式 1 b の沈殿物を水性溶媒に溶解するステップ、

b) 得られた溶液をろ過するステップ、

c) ステップ b) の溶液を凍結乾燥させて、一般式 1 a の化合物を含む凍結乾燥物を得るステップ。

【 0 0 3 0 】

1 つの側面において、沈殿物は、ステップ a) で攪拌しながら水性溶媒に溶解され得る。この方法は、詳細な説明でさらに記載される。

ステップ a) の沈殿物は、式 1 又は 1 b について記載される化合物のいずれかとして置換され得る。別の側面において、沈殿物は、記載された化合物の 1 つ又は組み合わせを含み得る。さらに別の態様において、本発明の異なる化合物を含む別個の沈殿物を混合し得る。

【 0 0 3 1 】

水性溶媒は、少なくとも 1 つの薬理学的に許容可能な添加剤をさらに含み得る。添加剤及び添加剤の濃度、上記のように記載され得る。

ステップ b) の得られた溶液を、好ましくは、少なくとも 1 つの滅菌フィルターを通してろ過することができ、いくつかの態様において、ステップ b) の得られた溶液を、2 つの滅菌フィルターでろ過する。得られた溶液は、例えば、ステップ c) の前に滅菌バルク中に回収され得る。ステップ b) の溶液はまた、凍結乾燥に適したバイアルに充填され得る。

【 0 0 3 2 】

本発明のさらに別の目的は、医薬組成物での使用のための上記のような沈殿物又は凍結乾燥物を提供することである。

本発明の医薬組成物（すなわち、凍結乾燥物）及び沈殿物は、室温で少なくとも 12 ヶ月間安定である。好ましくは、医薬組成物（すなわち、凍結乾燥物）は、室温で少なくとも 24 ヶ月間安定である。

【 0 0 3 3 】

本発明のさらに別の目的は、医薬組成物、すなわち、癌の治療において使用のための前記化合物を含む凍結乾燥物を提供することである。

1 つの側面において、本発明の凍結乾燥物は、例えば化合物 A 2 、 B 2 又は C 2 などの本発明の薬理学的に活性な化合物の 1 つだけを含み得る。別の側面において、本発明の凍結乾燥物は、本発明の化合物の組み合わせを含み得る。さらに別の側面において、本発明の前記化合物又は薬学的に許容可能な塩を含む凍結乾燥物は、癌治療で使用のための少なくとも 1 つの他の薬理学的に活性な化合物と組み合わせて本発明の化合物の少なくとも 1 つを含み得る。

【 0 0 3 4 】

本発明の化合物は、別々に又は混合物として投与され得る。化合物は、別の薬剤又は抗癌治療と同時に、又はその前後にさらに投与され得る。

上記の医薬組成物、沈殿物又は製剤は、例えば、病理学的に増殖する細胞によって特徴付けられる疾患又は障害の予防又は治療に使用され得る。

【 0 0 3 5 】

医薬製剤は、水性溶媒中に前記組成物を再構成することにより、点滴又は注射に適し得る。好ましくは、製剤は、点滴のために使用される。

薬理学的に活性な化合物の最終濃度は、0 . 5 ~ 3 0 m g / m l の範囲であり得る。

【 0 0 3 6 】

医薬組成物及び製剤は、0 . 5 ~ 4 の範囲の pH を有し得る。好ましくは、pH は、1

10

20

30

40

50

~ 3 の範囲である。上記のように、pHは、薬学的に活性な化合物の濃度に依存し、例えば、1 mg / ml の製剤のpHは、2 ~ 3 の範囲である。

医薬組成物又は製剤は、共治療剤をさらに含み得る。

好ましくは、本発明の医薬組成物及び製剤は、癌を治療するために使用される。

癌は、固体腫瘍、液体腫瘍及び血液腫瘍であり得る。

【0037】

さらに、上記の医薬、医薬製剤、組成物、沈殿物又は凍結乾燥物は、化学療法、免疫療法又は免疫調節療法、ホルモン療法、腫瘍の外科的除去、光線力学療法、レーザー療法、温熱療法、凍結療法、血管新生阻害、放射線療法、又はそれらの組み合わせなどの別の抗癌治療と組み合わせて使用され得る。

10

【0038】

本発明は、本発明の薬理学的に活性な化合物をそのような治療を必要とする対象に投与する、癌などの病理学的に増殖する細胞によって特徴付けられる疾患又は障害を治療する方法をさらに提供する。

【0039】

前記薬理学的に活性な化合物（複数可）の有効量は、個体及び癌の形態によって異なる。例えば、その量は、約0.1 ~ 10 mg / kg 体重、好ましくは0.5 ~ 5 mg / kg 、より好ましくは1 ~ 4 mg / kg 体重である。対象に与えられる総用量は、対象の状態及び癌の形態に依存し、前記対象の体重とは無関係に、5 ~ 800 mg の範囲であり得る。1つの側面において、対象に投与される用量は、30 ~ 300 mg の範囲である。用量は、以下に例示されるような別の癌治療と組み合わせて投与される場合、さらにより低いことができる。

20

【0040】

別の側面において、本発明は、上記の癌を別の抗癌治療と組み合わせて治療する方法を提供する。

上記の異なる態様は、互いに組み合わせることができ、又は別々に使用されることができる。

【0041】

本発明の1つ以上の態様の詳細は、以下の詳細な説明に記載される。本発明の他の特徴、目的、及び利点は、参照により組み込まれることにより、明細書及び図面、並びに添付の特許請求の範囲から明らかであるだろう。

30

【図面の簡単な説明】

【0042】

以下の図は、本発明の側面の例示であり、特許請求の範囲によって包含されるような本発明の範囲を限定することを意味しない。

【図1】図1は、化合物Aの沈殿物（A1）の合成のための合成経路、及び沈殿物の対応する塩、すなわち凍結乾燥物の塩形成ステップ（A2）を示す。

【図2】図2aは、化合物A1の99.8%の純度を示すHPLCクロマトグラムを示し、図2bは、X線クロマトグラフィーによって確認された化合物A1のE異性体構造を示す。

40

【図3】図3は、様々な細胞株における化合物Aの用量 - 反応曲線を示す。

【図4】図4a ~ dは、化合物A、B及びCについてHCT116細胞（A）における、及び化合物A（b）について、化合物B（c）について及び化合物C（d）についてHePG2細胞、RKO細胞、HeLa細胞、CEM細胞及びTHP-1細胞における用量 - 反応曲線を示す。

【0043】

本発明は、構成、プロセスステップ、及び材料などの本明細書中に開示される特定の構成、プロセスステップ、及び材料に限定されないが、材料は、幾分変化し得ることを理解すべきである。本明細書で使用される用語は、特定の態様のみを記載する目的のために使用され、本発明の範囲が添付の特許請求の範囲及びその等価物によってのみ限定される

50

ので、限定することを意図するものではないことも理解されたい。

【0044】

引用された全ての参考文献は、参照によってそれらの全体及び個々の刊行物又は特許又は特許出願がすべての目的のためにその全体が参照として組み込まれるように具体的かつ個々に示されているのと同じ程度に全ての目的について本明細書中に組み込まれる。

本発明は、本明細書中で提供される以下の定義、図及び例示的開示を参照することによつて最もよく理解される。

【0045】

本明細書において、一般式1の化合物は、その任意の薬学的に適した沈殿物、溶媒和物、塩又はプロドラッグを含むことが意図される。 10

本明細書において、用語沈殿物は、例えば、図1の反応4の沈殿ステップの生成物である、沈殿によって得られる二塩酸塩エタノール共結晶化合物、又は二塩酸エタノール溶媒和物を意味する。化合物は、本発明の式1の任意の化合物の沈殿物であり得る。

【0046】

本明細書において、薬学的に許容可能な化合物は、本明細書に記載される化合物の沈殿物、溶媒和物及び凍結乾燥物を含む。

本明細書において、用語「異性体」は、同じ組成及び分子量を有するが、物理的及び/又は化学的特性が異なる化合物を指す。そのような物質は、原子の同じ数と種類を有するが、構造は異なる。構造上の相違は、構成（幾何異性体）又は偏光面を回転させる能力（立体異性体）であり得る。用語「立体異性体」は、空間におけるこれらの原子の配置が異なる同一の構成の異性体をいう。 20

【0047】

本明細書において、特に記載されない限り、用語「薬学的に許容可能な添加剤」は、任意のタイプの非毒性、不活性固体、半固体又は液体充填剤、希釈剤、カプセル化材料又は製剤補助剤を意味する。

本明細書において、特に記載されない限り、用語「薬学的に活性な化合物」は、ヒト及び動物の両方を含む宿主に投与される場合、治療上有効な薬理学的応答を生じる任意の物質を包含する。

【0048】

本明細書において、用語「投与（administering）」又は「投与（administration）」は、薬理学的に有用である様式で対象に薬物を提供することを意味する。 30

本明細書において、特に記載されない限り、用語「細胞傷害性化合物」は、細胞の増殖を停止させるか、又は死滅させる能力を有する、すなわち、高い細胞傷害活性を有する化合物を指す。

【0049】

本明細書において、特に記載されない限り、用語「誘導体」は、元の構造の化学反応によって、又は元の構造の部分的な置換である「修飾」によって、又は設計及び新規合成によって直接的に元の構造から形成される化合物を指す。誘導体は、合成であり得るか、又は細胞の代謝産物若しくはインビトロ酵素反応であり得る。 40

【0050】

本明細書において、用語「癌」は、任意の悪性新生物疾患、すなわち、異常な及び制御されない細胞分裂によって引き起こされる任意に悪性増殖又は腫瘍を意味することを意味する。用語「癌」は、特に、固体、局在化腫瘍、及び非固形癌形態の両方を含むことを意味する。例えば、前記癌形態は、白血病（ALL、AML、CLL、CML、CMML）、T細胞白血病、多発性骨髄腫、卵巣癌、前立腺癌、子宮頸部腺癌、扁平上皮癌、乳癌、大腸癌、小腸癌、肛門癌、胃癌、腎臓癌、腎盂及び尿管の悪性黒色癌、尿道癌、膀胱癌、肝臓癌、虫垂癌、脾臓癌、肺癌、食道癌、口唇/口腔癌、鼻癌、喉頭癌、脳/中枢神経系癌、皮膚癌、甲状腺及び胸腺癌、肉腫、頭頸部癌、非ホジキンリンパ腫（NHL）、ホジキンリンパ腫、及び偽性腹膜炎からなる群から選択され得る。 50

【0051】

本発明は、E異性体に有利である医薬組成物を調製するための方法を提供する。単結晶X線は、E異性体が固体状態で支配的であることを確認した。

本発明の方法を使用することによって、少なくとも95重量%（HPLCによって確認、図2参照）の薬学的に活性な化合物（E異性体）を含む明確で安定な医薬組成物を得る。

【0052】

例1 化合物Aの合成

第1の実験において、化合物A（遊離塩基）を、アセトン／アセチレート／アセトン二トリルで希釈し、Z異性体ではなくE異性体は、溶媒の組み合わせに溶解し、容易にろ過した。この溶媒の組み合わせを使用することによって最終的なE異性体含量は、約92%であった。記載された溶媒の組み合わせは、少量生産中にはうまくいったが、必要とされる溶媒の量が多いため、生産を拡大することはできなかった。したがって、K g o k o n gら、2005年によって記載される1, 2, 4-トリアジノ[5, 6-b]インドール誘導体の合成に基づく化合物Aの合成は、本発明者らによって開発された（図1参照）。本発明者らは、溶媒としてメタノール（MeOH）、HClの担体としてエタノール中の塩酸（HCl/EtOH）（EtOHは、抗溶媒としても作用する）を使用する手順を開発した。スケールアッププロセスのその後の開発において、反応容積効率が改善された。さらに、遊離塩基（A）を最終的な塩酸沈殿物（A1）に大規模に変換するための適切な方法も開発された（図1、例1及び2参照）。遊離塩基（A）はMeOH単独では溶解しなかったが、約1当量のHCl/EtOHを添加すると、透明な溶液が得られた。

10

20

20

30

【0053】

観察されたジスルフィド種により、反応は、窒素下、空気酸化を避けるために実施され得る。反応ステップ1によって生成されたウェットケーキもまた、真空中で乾燥されて得るか、又はウェットケーキは、前もって乾燥することなくさらに処理され得る。不純物は、通気乾燥中に発生しうるので、真空中で乾燥させることによって、不純物の発生は、最小化される。反応ステップ2の生成物化合物が得られる。反応ステップ2の生成物化合物を50でエタノール（20mL/g化合物）中のわずかなに過剰の2-アセチルピリジン（1.5当量）と反応することは、生成物形成が得られたが、5時間後非常にゆっくり変換された（約8%）。

30

【0054】

図1は、化合物A（E及びZ異性体の混合物；IUPAC系統名：2-[（1E, Z）-1-（2-{6-メチル-5H-[1, 2, 4]トリアジノ[5, 6-b]インドール-3-イル}ヒドラジン-1-イリデン）エチル]-ピリジン）の合成の反応ステップ1～3を示す。

【0055】

ステップ1 7-メチルイサチン（4.75kg、29.5mol）の水性懸濁液に、2.85kg（31.3mol）のチオセミカルバジド及び6.15kg（44.5mol）の炭酸カリウムを加えた。攪拌した混合物を、還流下で約3時間加熱し、次に室温に冷却した。7.1のpHに到達するまで、酢酸（100%、3.3kg、55.0mol）をゆっくりと加えた。懸濁液を加圧ろ過器でろ過し、ろ過ケーキを水（19.4kg）で洗浄し、7.6kgの湿った6-メチル-2H, 3H, 5H-[1, 2, 4]トリアジノ[5, 6-b]インドール-3-チオンを得た。

40

【0056】

ステップ2 約4.6kgの乾燥6-メチル-2H, 3H, 5H-[1, 2, 4]トリアジノ[5, 6-b]インドール-3-チオンに対応する先のステップからの湿潤ろ過ケーキは、57.1kgのヒドラジン-水和物中に懸濁し、混合物を89で18時間攪拌した。反応混合物を室温に冷却して、生成物を遠心分離により単離し、水（15.9kg）及びエタノール（18.4kg）で洗浄し、1450RPMで排出した。3-ヒドラジニル-6-メチル-5H-[1, 2, 4]トリアジノ[5, 6-b]インドールの湿潤ろ過

50

ケーキ(乾燥重量3.8kgに相当する7.8kg)を洗浄した反応器に戻し、真空下で乾燥させた。

【0057】

ステップ3 ステップ2から乾燥した3-ヒドラジル-6-メチル-5H-[1,2,4]トリアジノ[5,6-b]インドールを、水(76.85kg)、酢酸(100%、6.70kg、111.6mol)及び2-アセチルピリジン(10.75kg、88.7mol)を加えた。混合物を3時間、48.5で攪拌して、室温に冷却し、NaOH(27%、6.3kg、110mol)をゆっくりと添加してpH7.0に到達し、20と25の間の温度に維持した。混合物をこの温度で11/4時間さらに攪拌し、生成物を遠心分離により単離した。水(7.3kg)及びエタノール(5.8kg)の混合物で洗浄後、ケーキを1450RPMで排出し、次に47で66時間真空オーブンで乾燥させて、ベージュ/緑色の固体材料の形態で5.82kgの表題化合物を得た。
10

【0058】

図1のステップ4は、化合物A1、化合物Aのエタノール共結晶(IUPAC系統名:2-[[(1E)-1-(2-{6-メチル-5H-[1,2,4]トリアジノ[5,6-b]インドール-3-イル}ヒドラジン-1-イリデン)エチル]-ピリジン二塩酸塩]の合成を示す。

2-[[(1E,Z)-1-(2-{6-メチル-5H-[1,2,4]トリアジノ[5,6-b]インドール-3-イル}ヒドラジン-1-イリデン)エチル]-ピリジン(5.80kg)にエタノール性HC1(12.4kg、1.05当量)を加え、透明な溶液が得られるまで、混合物を28~30で30分間攪拌した。溶液をろ過し、追加のエタノール性HC1(28.95kg、2.45当量)を攪拌下で25で1時間40分かけて加えた。1.05当量のHC1/EtOHの最初の添加の間に、存在するZ異性体の大部分は、E異性体に変換し、一部の一塩酸塩が形成される。二塩酸塩は、EtOH中2.45当量のHC1の添加によって自然に沈殿する。0.1MのNaOHフェノロフタレン指示薬を用いた滴定によるEtOH中のHC1のモル濃度の決定は、約1.1~1.4MのHC1であると計算された。同じ温度で15分間攪拌を続け、エタノール(45.8kg)を加えた。そのように形成された懸濁液を約0~-5に冷却し、1時間攪拌した。遠心分離によって単離された生成物をエタノール(0~5、45kg)で洗浄し、次に1450RPMで排出した。ケーキを真空下で37で42時間乾燥させ、7.57kgの表題化合物(残留溶剤を含まない場合は約108%、又はモノ-EtOH、二塩酸塩に基づいて98%を、黄色~橙色の固体として得た。
20
30

【0059】

得られたエタノール共結晶二塩酸塩沈殿物は、約2重量%~20重量%のエタノール含量を有する。

図1の反応ステップ5は、一般式1aの化合物を含む凍結乾燥組成物の形成を示す。

【0060】

HPLCによる異性体含量の分析

プロセス開発中、化合物A及び化合物A1の分析は、例えばサンプルの不安定性、溶解性不良、異性化、HPLC等による分析上の問題を引き起こした。したがって、より強固なHPLC法は、XBridg e C18、3.5μm、150×4.6mmカラムに基づいて発明者らにより開発された。この問題は、希釈剤としてMeOH中の2%ギ酸を使用し、コーティングされていない標準HPLCサンプルバイアルからAgilentのコーティング(シラン処理)バイアルに切り替えることによって、さらに解決された。
40

Agilent 1200/1260クロマトグラフィーシステム又は同等品を使用した。

【0061】

酸性HPLCを用いて化合物Aを分析した場合、約7%は、Z異性体の形態(0.1のTEA/H₂O中のサンプル調製物)であることがわかった。2日後、同じサンプルを再分析したところ、Z異性体の約2%、及び化合物A1への加水分解(約1%が検出された
50

) の開始が示された。これは、酸性条件(1~4の範囲のpH)が、望ましくないZ異性体を所望のE異性体に変換することを示すものであった。その後、塩形成(反応ステップ4)(エタノール中のHC1を使用して)を行うと、異性体含量は、<0.5%に低下した。これは、エタノール中のHC1の添加の際、所望の異性体への変換が生じるため、化合物A、B又はCの望ましくない異性体の比較的大きな含量(例えば5%)を許容することができるることを意味する。エタノール中のHC1の添加は、二塩酸塩沈殿物(化合物A1、B1及びC1など)を形成する。

【0062】

HPLC純度

10

HPLC純度は、全不純物として100%と計算された。0.05%未満の全てのピーク及びマトリックス中に存在するピークは、計算から除外される。各不純物の含量は、全ピーク面積(面積%)のパーセンテージとして計算した。全不純物は、不純物の合計0.05%である。

【0063】

不純物

各不純物の最終結果は、4つの結果の平均である。全不純物は、不純物の合計0.05%として報告される。

【0064】

残留溶媒

20

化合物A1の分析は、それが二塩酸塩エタノール共結晶組成物(沈殿物)であることを示した。化合物A1の理論的エタノール含量は10.6%であり、これは、上記のようなエタノール共結晶(沈殿物)の形成と一致する。

【0065】

化合物Aを含む組成物のプロセス開発の間、二塩酸塩エタノール共結晶(例えばA1)は、吸湿性が低く、異性体純度の加水分解および分解に対して有意により安定であることが驚くべきことに示された。

高いレベルのエタノールは、最終製剤(凍結乾燥物)の製造プロセスの一部であるその後の凍結乾燥の間に除去されるので、製剤原料(沈殿物)において許容されたことができたと結論付けられた。

30

【0066】

メタノールレベルは、比較的高いことを示し；典型的には、組成物A1のメタノール含有量は、1.4~1.8%であった。長時間の乾燥サイクルは、メタノール含有量を有意に減少させなかった。しかしながら、エタノールの場合のような、最終製剤(例えば、A2)の製造の間に使用されるその後の凍結乾燥サイクルは、ICH Q3Bガイドラインより低いレベルにメタノールを効率的に除去する。

【0067】

結論

エタノール及びメタノールレベルの両方は、最終製剤でICH Q3Cガイドラインよりも十分に低く、これは、注意深くモニターされるという事実に基づいて、より高いレベルは、製剤原料(すなわち、化合物A1の沈殿物)で許容されたことができたと結論付けられた。本明細書に記載される全ての他の制限は、Ph Eur又はUSP標準の範囲内である。

40

【0068】

同定

サンプルの同一性は、サンプル調製物のメインピーク及び同定のためのサンプル調製物のメインピークの目視検査に基づいた。化合物A1は、クロマトグラムにおいて単一のピークによって表される(図2a参照)。

【0069】

例2 安定性

50

二塩酸塩エタノール共結晶沈殿物及び凍結乾燥二塩酸塩の安定性試験を、製剤原料及び生成物の国際調和会議（I C H）ガイドラインQ 1 A（R 2）安定性試験にしたがって実施した。研究中の安定性サンプルを分析するために使用される全ての分析機器は、現行のc G M Pに適合している。

安定性試験は、1つの長期間試験（5、24、36ヶ月）及び加速試験（25 / 60% R H、6ヶ月）の2つの部分から構成される。

【0070】

化合物A（A 1）の二塩酸塩エタノール共結晶沈殿物は、密閉したH D P E容器に入れたヒートシールされたホイルラミネートパウチ内のヒートシールされた二重ポリエチレンバッグに充填した。サンプルを、長期条件5及び加速条件25 / 60% R Hで保存した。試験期間中、外観は、黄色～橙色の固体であった。予期しない低レベルの結晶化度を有する25 / 60% R HサンプルについてのX線粉末回折結果に基づいて分析を行った。結晶化度のレベルは、製剤原料の品質又は安定性に直接影響を有さないが、開発作業の一環として管理される。得られた36ヶ月の安定性データを以下の表2aに要約する。

10

【0071】

表2bは、25及び60%で、6ヶ月間にわたる二塩酸塩エタノール共結晶沈殿物の安定性データを示す。外観は、全期間の間、黄色～橙色の固体であった。

【0072】

結論

化合物A 1を含む本組成物は、少なくとも24ヶ月間安定である（表2a）。この期間中、化合物A 1の有意な分解は、2～8又は25 / 60% R H（6ヶ月）のいずれにおいても起こらなかった。化合物A 1の組成物を、2～8で保存し、輸送することが推奨される。しかしながら、25までの温度で24時間の保存は、問題にならないはずである。

20

【0073】

例3 2 - [(1) - 1 - (2 - { 6 - メチル - 5 H - [1 , 2 , 4] トリアジノ [5 , 6 - b] インドール - 3 - イル } ヒドラジン - 1 - イリデン) エチル] - ピリジン二塩酸塩のエタノール共結晶沈殿物の医薬組成物の製造

主に2 - [(1E) - 1 - (2 - { 6 - メチル - 5 H - [1 , 2 , 4] トリアジノ [5 , 6 - b] インドール - 3 - イル } ヒドラジン - 1 - イリデン) エチル] - ピリジン二塩酸塩（A 1）（160 mgの遊離塩基に対応する、A）のエタノール共結晶沈殿物の22.5 . 6 mgの倍数は、注射用水（P h . E u r .、10 ml）中のマンニトール（500 mg）の溶液に溶解させ、溶液を2つの0 . 2 μmフィルターを通してろ過することによって滅菌し、対応する数の滅菌バイアルに充填し、次に凍結乾燥させた（化合物A 2の塩を得る）。

30

【表2】

表2a										
時間(月)		0	1	3	6	9	12	18	24	36
RRT 0.92-	≤1.0	0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.07	<0.05	0-07
0.93										
RRT 1.13	≤1.0	<0.05	<0.05	<0.06	<0.06	<0.05	0.05	0.05	0.05	<0.05
										10
RRT 1.23-	≤1.0	0.05	0.05	0.06	0.06	0.05	0.06	0.06	0.06	0.06
1.24										
RRT 1.39	≤1.0	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.05	<0.05	<0.05
										20
RRT 1.47-	≤1.0	0.17	0.10	0.10	0.36 ²	0.09	<0.05	0.06	0.05	0.06
1.51										
総不純物	≤2.0	0.26	0.15	0.16	0.42	0.14	0.10	0.29	0.16	0.18
含水量 (% w/w)		2.53	2.34	2.18	2.50	2.88	2.65	2.73	3.37	2.46
										30

² RRTで不純物の相対面積=1.47-1.51は、予想よりも大きい。サンプル調製およびHPLC分析は、別の分析者によって繰り返され、その結果を確認した。この不純物のピーク面積の変動は、試験法のバリデーション中に観察された。

【0074】

本発明者らは、先行技術によって使用される通常の方法が300時間以上の乾燥を必要とするので、新しい凍結乾燥プロセスを開発した。新しい方法は、より積極的であり、以下の表3に概説される。

【表3】

表2b					
時間(月)	0	1	3	6	
RRT 0.92-0.93	≤ 1.0	0.05	< 0.05	0.05	0.07
RRT 1.12	≤ 1.0	< 0.05	< 0.05	< 0.05	0.05
RRT 1.24	≤ 1.0	0.05	0.05	0.06	0.05
RRT 1.38	≤ 1.0	< 0.05	< 0.05	0.05	< 0.05
RRT 1.49-1.51	≤ 1.0	0.17	0.10	0.06	0.36 ²
総不純物	≤ 2.0	0.26	0.16	0.22	0.52
含水量(% w/w)		2.53	2.41	2.30	2.45

² RRTにおける不純物の相対面積=1.47-1.51は、予想より高い。

【0075】

サンプル調製及びHPLC分析は、別の分析者によって繰り返され、結果を確認した。この不純物のピーク面積の変動は、試験法のバリデーション中に観察された。

最大負圧及び比較的高い温度を有し、表3のように温度をアニーリングすることにより、凍結乾燥ステップは、19時間に短縮された。

金属表面との接触は避けられた。存在するエタノール及び少量のメタノールは、凍結乾燥プロセスによって除去された。

【0076】

バイアルを窒素下でクリップシールし、5℃で保存した；24ヶ月間保存後、分解は見られなかった。

グルコース及びマンニトールを、単独で及びNaClと組み合わせて、添加剤として評価した。溶解度、凍結乾燥ケーキのテクスチャー及び不純物形成の抑制に関する最良の結果は、添加剤として5%(w/v)マンニトールを用いて得られた。凍結乾燥ケーキのより高い程度の崩壊が、充填剤としてグルコースで観察された。NaClによって生成されるpHの上昇は、化合物A2の溶解度を減少させたので、NaClの添加は、溶解度の問題を引き起こした。

【0077】

再構成及び注射のための凍結乾燥粉末（化合物Aの160mgの遊離塩基に相当）を2~8℃、24ヶ月までの条件で保存した。外観は、全試験期間中、及び目に見える粒子のない黄色~橙色溶液の再構築後、黄色~橙色の凍結乾燥ケーキであった。

【表4】

表3

ステップタイプ	温度 (T °C)	時間 (時間)	真空(mbar)
棚	5	/	/
凍結ステップ	5	0.30	/
凍結ランプ [°]	-45	0.50	/
凍結ステップ [°]	-45	4	/
凍結ランプ [°] (アニーリング)	-25	1	/
凍結ステップ [°] (アニーリング)	-25	2	/
凍結ランプ [°] (アニーリング)	-45	1	/
凍結ステップ [°]	-45	4	/
チャンバーバキューム	-45	/	0.200
一次乾燥	-45	0.10	0.200
一次乾燥ランプ [°]	25	3	0.200
一次乾燥ステップ [°]	25	XX*	0.200
二次乾燥ランプ [°]	25	10	最大
サイクルの終わり			

【0078】

25 / 60% R H の X 線粉末回折結果のために行われた分析は、予想外の低レベルの結晶化度を有した。結晶化度のレベルは、製剤原料の品質又は安定性に直接影響を与えないが、開発作業の一部として管理される。再構成時間は、最大 3 分であった。細菌の増殖は検出されず、製品の無菌性は、室温で 24 ヶ月の間影響を受けなかった。得られた安定性データを以下の表 4 a に要約する。

10

20

30

40

【表5】

時間(月)	0	1	3	6	12	18	24
pH	1.6	1.6	1.6	1.5	1.6	1.6	1.7
含水量 (%)	0.33	0.41	0.47	0.37	0.53	0.43	0.39
アッセイ(% w/w) ¹	97.8	98.4	95.9	97.3	93.9	94.6	94.2
総不純物 (%)	0.7	0.5	0.3	0.4	0.2	0.3	0.34
いずれかの個々の 純度(%)	0.4	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.10
特定の不純物* (%)	<0.5	<0.05	<0.05	0.08	0.08	0.10	0.09
Z異性体 (%)	0.1	0.1	0.1	0.1	<0.05	<0.05	0.05
RRT 0.92-0.93							
RRT 1.13	0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.05	<LOQ
RRT 1.23-1.24	0.06	0.05	0.08	0.05	0.06	0.05	0.05
RRT 1.39							
RRT 1.47-1.51	0.37	0.32	0.05	<0.05	<0.05	0.05	0.10

* 加水分解不純物 3-ヒドラジニル-6-メチル-5H-[1, 2, 4]トリアジノール
[5, 6-b]インドール

【0079】

L O Q は、0 . 0 5 % であり、ピーカー < L O Q を、< 0 . 0 5 % として記録した。
再構成及び注射のための凍結乾燥粉末（化合物 A の 1 6 0 m g の遊離塩基に相当）を加
速条件 2 5 / 6 0 % E H で保存した（表 4 b 参照）。外観は、全試験期間中、及び目に見
える粒子なく黄色～橙色の溶液の再構築後、黄色～橙色の凍結乾燥ケーキであった。2
5 / 6 0 % R H での X 線粉末回折結果のために行われた分析は、結晶化度の予想外の低
いレベルを有した。結晶化度のレベルは、製剤原料の品質又は安定性に直接影響を与えない
が、開発作業の一部として管理される。再構成時間は、最大 3 分であった。細菌の増殖
は検出されず、製品の無菌性は、室温で 2 4 ヶ月間影響を受けなかった。驚くべきことに、
凍結乾燥物は、室温で少なくとも 2 4 ヶ月安定であることを示した。得られた安定性デ
ータを、以下の表 4 b に要約する。

【表6】

時間(月)	0	1	3	6	12	18	24
pH	1.6	1.6	1.6	1.5	1.6	1.5	1.6
含水量(%)	0.33	0.39	0.55	0.45	0.59	0.49	0.45
アッセイ (% w/w) ¹	97.8	97.2	95.4	98.3	94.6	93.9	94.5
総不純物(%)	0.7	0.3	0.7	0.4	0.2	0.20	0.36
任意の個々の純度(%)	0.4	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.10
特定の不純物* (%)	<0.5	0.1	<0.05	0.08	0.08	0.10	0.10
Z異性体 (%)	0.1	<0.05	0.1	0.1	0.10	<0.05	0.05
RRT 0.92-0.93							
RRT 1.13	0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	nd	<LOQ
RRT 1.23-1.24	0.06	0.05	0.08	0.06	0.06	0.06	0.06
RRT 1.39							
RRT 1.47-1.51	0.37	0.13	0.05	<0.05	<0.05	nd	0.09

* 加水分解不純物 3-ヒドラジニル-6-メチル-5H-[1, 2, 4]トリアジノール
[5, 6-b]インドール

【0080】

LOQは、0.05%であり、ピーク<LOQを、<0.05%として記録した。pHは、0.5~4の範囲でなければならず、上記の例において、濃度は、約16mg/mlであり、pHは、1.3~2.3の範囲であり、含水量は1%未満である。Z異性体は、好ましくは2%未満であるが、しかしながら、本発明者らは、驚くべきことに、酸性条件は、E異性体に有利であることを見出した。

【0081】

化合物A2を含む凍結乾燥物は、驚くべきことに、凍結乾燥後の方が水を溶解する前よりも溶解性が低いことを示した。このため、構造的研究が行われ、この研究は、化合物A2は、凍結乾燥中のその結晶形態を変化させることを示した。新しい結晶形態は、水に溶けにくく、これは、二塩酸塩エタノール共結晶沈殿物(A1)及び二塩酸塩(A2)の間の溶解度の差異を説明する。実験は、沈殿物のこの枯渇が、形態学的形態の変化を誘導することを示した。実験の結果はまた、添加剤(D-マンニトール)は、新しい形態(morphic form)の形成について影響を与えないことを示した。凍結乾燥ケーキの不純物及びテクスチャーの形成に関する最良の結果は、表3に記載の凍結乾燥サイルから得られ、マンニトール含量は5%に設定した。

【0082】

例4 医薬製剤の調製

10

20

30

40

50

化合物 A 2 は、1 mg / ml で 24 時間までの副生成物の形成を抑制するために水性媒体中で処方されることが見出された。また、pH は、1 ~ 4 付近の最良の安定性を有する水性媒体中の化合物 A 2 の安定性にとって重要であることが理解され、物質のより高い濃度は、より低い pH をもたらした。1 mg / ml の前記水溶液は、pH 2 ~ 3 を有する。

得られた化合物 A 2 は、滅菌凍結乾燥粉末として処方され、注射又は点滴用の溶液を、注射用水などの水性溶媒中で上記の凍結乾燥粉末を溶解することによって調製した。各バイアルは、225.5 mg の製剤原料、及び 5 % のマンニトール (w/v) の溶液から調製された 160 mg の遊離塩基 (A) に相当する薬理学的に活性な化合物の量を含む。

【0083】

10

凍結乾燥物は、10 ml の水性溶媒中で再構成し得、その後、点滴のために、薬理学的に許容可能な添加剤、好ましくは 5 % マンニトール (w/v) を任意に含む水性溶媒中で 10 mg / ml に希釈した。

【0084】

例 5

化合物 B ; 2 - [(1E) - 1 - (2 - {6 - メチル - 5H - [1, 2, 4] トリアジノ [5, 6 - b] インドール - 3 - イル} ヒドラジン - 1 - イリデン) プロピル] ピリジンの合成

1 - (ピリジン - 2 - イル) プロパン - 1 - オン (35 mg, 0.26 mmol) を水 - 酢酸混合物 (20 : 1, 10 mL) に溶解し、次に、3 - ヒドラジニル - 6 - メチル - 5H - [1, 2, 4] トリアジノ [5, 6 - b] インドール (50 mg, 0.23 mmol) を添加した。反応混合物を 2 時間、50 °C で攪拌した。溶媒を蒸発させた後、暗緑色固体を得た (70 mg)。LC は、95 : 5 の異性体比を有する純粋な生成物を示す。

20

【0085】

例 6

化合物 C ; 2 - (3, 3 - ジメチル - N - {6 - メチル - 5H - [1, 2, 4] トリアジノ [5, 6 - b] インドール - 3 - イル} ブタンヒドラゾノイル) ピリジンの合成

3, 3 - ジメチル - 1 - (ピリジン - 2 - イル) ブタン - 1 - オン (46 mg, 0.26 mmol) を水 - 酢酸混合物 (20 : 1, 10 mL) 中で測定し、次に 3 - ヒドラジニル - 6 - メチル - 5H - [1, 2, 4] トリアジノ [5, 6 - b] インドール (48 mg, 0.23 mmol) を加えた。反応混合物を 50 °C で一晩攪拌した。溶媒を蒸発させた後、緑がかった黄色の固体が得られた (78 mg)。LC は、92 : 8 の異性体比を有する純粋な生成物を示した。

30

【0086】

例 7

化合物 B 1 のその二塩酸塩 (B 2) への変換を、以下の手順によって調製した：

2 - [(1E) - 1 - (2 - {6 - メチル - 5H - [1, 2, 4] トリアジノ [5, 6 - b] インドール - 3 - イル} ヒドラジン - 1 - イリデン) プロピル] ピリジン (30 mg, 0.09 mmol) をメタノール (0.6 mL) 中に懸濁し、次にエタノール中 HC 1 (1.04 当量、1.25 M, 75 μL) を滴下した。すべての固体を溶解後、エタノール中のより多くの HC 1 (2.08 当量、1.25 M, 150 μL) 及びエタノール (0.6 mL) を添加した。明褐色の沈殿物が現われた。懸濁液を -10 °C で 3 時間維持し、次に固体をろ過し、冷エタノールで洗浄し、乾燥させた。生成物は明るい黄色固体 (10 mg) であった。LC は、1 つの異性体のみを示し、少量の異性体は、生成物をその HC 1 塩に変換後、検出されない。

40

【0087】

例 8

化合物 C 1 のその二塩酸塩 C 2 への変換を、以下の手順によって調製した：2 - [(1E) - 1 - (2 - {6 - メチル - 5H - [1, 2, 4] トリアジノ [5, 6 - b] インドール - 3 - イル} ヒドラジン - 1 - イリデン) プロピル] - ピリジン (30 mg, 0.0

50

9 mmol)を、メタノール(0.6 mL)に懸濁し、次にエタノール中HCl(1.04当量、1.25 M、75 μL)を滴下した。全ての固体を溶解後、エタノール中より多くのHCl(2.08当量、1.25 M、150 μL)及びエタノール(0.6 mL)を添加した。懸濁液を-10°で3時間保持した後のみ、生成物は、直ちに沈殿しなかった。固体をろ過し、冷エタノールで洗浄し、乾燥させた。生成物は、明るい黄色固体(20 mg)であった。LCは1つの異性体(E)のみを示し、生成物をそのHCl塩に変換した後、少ない異性体(Z)は検出されない。

【0088】

特徴

単結晶X線は、E異性体は、固体状態で支配的であることを示した。

10

単結晶X線を、スウェーデンのSARomics Biostructures ABで実施した。約 $100 \times 30 \mu\text{m}$ を測定する化合物A1の結晶を、タンパク質結晶に通常使用される種類の標準的な低温ループで取り出し、パラフィン油に浸漬し、液体窒素中でフラッシュ冷却した。データは、225 mm mar CCD検出器を備えたMAX-1a b($\lambda = 0.9198 \text{ \AA}$)のステーションI1911-3で100 Kで集めた。ビームサイズは、 $50 \times 50 \mu\text{m}$ であった。X線結果は、化合物A1がE-ヒドラジン異性体であることを確認する。予測される構造は、図2bに示され、Nは窒素原子、Hは水素原子、CLは塩素原子、H₂Oは水分子である。

全ての試験は、参照標準を使用して実施し、全ての分析は、提案された構造と一致する。

20

【0089】

結論

生成物化合物A2は、容易に、水性溶媒中で加水分解するにもかかわらず、化合物Aの出発材料で4~7%の含水量が許容された。

母液中に異性体の痕跡がなく、適用された沈殿条件がZ異性体を標的異性体に変換することを示す。好ましくは、生成物は、酸感受性であるので、塩形成は、数時間以内に実施されるべきである。

【0090】

組成物開発作業は、上述の水性溶媒安定線試験及び添加剤評価によって開始された。これらの結果に基づいて、製剤の不純物形成及び薬物生成物の溶解性に対する効果(すなわち、二塩酸塩、例えば化合物A2)に関して、組成物(すなわち、製剤原料-エタノール共結晶沈殿物-添加剤の濃度及びタイプ及び量)を最適化することによって継続した。最適化の結果、バイアル当たりの遊離塩基(化合物A)の量は、100 mgから160 mgに増加した。

30

【0091】

例9 細胞傷害活性

化合物Aによる、生存指數(IC₅₀)として表される細胞傷害活性は、様々な細胞株で示され(図3)、ヒト腫瘍の初代培養に示される(表5)。Fluorometric Microculture Cytotoxicity Assay(FMCA), (Lindhagenら、2008年)を、様々な細胞株及びヒト腫瘍の初代培養において化合物の細胞毒性効果の測定のために使用した。ピペット操作ロボットPrecision 2000(Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT)を使用して、薬物調製384ウェルプレートに細胞を播種した。プレートを72時間インキュベートし、次に、自動FMCAのために、CO₂インキュベーター(Cytomat 2C, Kendro, Sollentuna, Sweden)、ディスペンサー・モジュール(MultiDrop 384, Tittertek, Huntsville, AL)、ウォッシャーモジュール(ELx 405, Bio-Tek Instruments Inc.)、デリッディングステーション、プレートホテル、バーコードリーダー(Beckman Coulter)、液体ハンドラー(Biomek 2000, Beckman Coulter)及び多目的リーダー(FLUOstar Optima, BMG L

40

50

a b t e c h G m b H , O f f e n b u r g , G e r m a n y) を有する O R C A 口ボット (Beckman Coulter) からなる統合された H T S S A G I A N C o r e System に移した。

【 0 0 9 2 】

異なる細胞株（例えば、CCRF - CEM T 細胞白血病、RPMI - 8226 多発性骨髄腫、A2780 卵巣癌、FaDu 頭頸部癌（扁平上皮癌種）、HT29 大腸癌、MCF7 乳癌及びHL-60 白血病細胞）並びに初代ヒト腫瘍細胞培養のパネル（表5）を（結腸、胃、腎臓、虫垂、小腸及び膵臓癌、並びに偽胚様体腹膜）を分析した。結果は、効果 - 濃度グラフに例示されるように（図3）、化合物Aの広範な抗癌活性を示す。

【 0 0 9 3 】

例 10

本発明者らはまた、異なる起源の癌を表す細胞系における化合物A、B及びCの活性を特徴付けることを始めた。使用された特異的アッセイ及び機構的評価からの結論は、以前に詳細に記載されている（Zhangら、2014年）。化合物A、B及びC（図4参照）を、細胞ベースの蛍光ミクロカルチャー細胞毒性アッセイ（FMC-A）を使用して、以前に詳細に記載されているように（Lindhagenら、2008年）、6つのヒト腫瘍細胞株における生存指数（SI）として表される細胞傷害性について評価した。この方法は、原形質膜を有する生存細胞によるFDAの加水分解から生成された蛍光フルオレセンスの測定に基づく。蛍光は、無傷の生存細胞の数に比例する。

【 0 0 9 4 】

材料及び方法

細胞培養

細胞株は、プロバイダーによって推奨されたそれぞれの細胞培地で培養した。培地に10%熱不活性ウシ胎児血清、2 mmol/LのL-グルタミン、100 µg/mLのストレプトマイシン及び100 U/mLのペニシリン（全てSigma - Aldrich製）を補充した。この細胞株を、5%CO₂を含む加湿雰囲気中、37℃で培養した。

【 0 0 9 5 】

細胞傷害活性の測定

簡潔にFMC-A分析、ウェル当たり2500細胞を384ウェルマイクロプレートに播種し、化合物で処理する前に一晩インキュベートした。化合物を音響液体移送（ECHO 550、Lab Cyte）を使用して添加した。プレートを37℃で72時間インキュベートし、次に洗浄し、FDAを37℃で50分のインキュベーションによってウェルに添加した。各ウェルの生存細胞の数に比例する蛍光を、Fluoroskan装置（Lab systems, GMI, Ramsey, MIN）で485 / 520 nmで測定した。細胞生存率は、対照ウェルの値のパーセンテージとして分析された化合物処理ウェルで蛍光値として定義され、プランク値を引いたものとして定義される生存指数（SI）として示される。品質基準は、対象及びプランクウェル<30%におけるシグナル／プランク比>10及び変動係数（CV）を含んだ。Graph Pad Prism（San Diego, California, USA）。全ての実験を2回行い、各濃度を、各実験において4回繰り返して評価した。化合物（A、B及びC）を、DMSO、5 mMに希釈した。

10

20

30

40

【表7】

表5. 異なる初代ヒト腫瘍細胞培養のパネルにおける IC₅₀

疾患	分析された患者数	IC ₅₀ μM
PMP*	50	9.4
大腸**	25	11
胃	9	6.9
腎臓	13	164
中皮腫	7	12
虫垂	4	21
小腸	1	5.4
卵巣	30	5.7
膵臓	1	6.0

* 腹膜偽粘液腫, ** 大腸癌、最大細胞検証手術および腹膜切除から得られた外科用標本

【0096】

結果と考察

試験化合物（A、B及びC）は、癌細胞株の広範な範囲に強い活性を示した（表6及び図4参照）。細胞株は、血液学的及び固体腫瘍の両方を表す、広範囲の癌タイプをカバーするように選択された（表6）。これらの結果から、化合物A、B及びCは、結腸癌、子宮頸部腺癌、急性リンパ芽球性白血病及び急性単球性白血病を含むいくつかの異なる腫瘍細胞に対して有効であることが、明らかに示される。

本明細書に提示される結果から、化合物A、B及びCは、結腸癌、子宮頸部腺癌、肝細胞癌、急性リンパ芽球性白血病及び急性単球性白血病を含むいくつかの異なる腫瘍細胞株に対して有効であることが明らかに示される。

10

20

30

【表8】

表6. 6つのヒト腫瘍細胞株における化合物A、BおよびCのIC₅₀

細胞株	起源	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀
		化合物A	化合物B	化合物C
HCT116	結腸癌	≈ 1 μM	≈ 1 μM	≈ 1 μM
RKO	結腸癌	< 250 nM	< 250 nM	< 250 nM
HeLa	子宮頸部腺癌	≈ 20 μM	≈ 20 μM	≈ 10 μM
HepG2	肝細胞癌	< 250 nM	< 250 nM	< 250 nM
CCRF-CEM	急性リンパ球性白血病	< 250 nM	< 250 nM	< 250 nM
THP-1	急性单球性白血病	< 250 nM	< 250 nM	< 250 nM

【0097】

特定の態様を、本明細書中で詳細に説明したが、これは、例示のみを目的として実施されたものであり、添付の特許請求の範囲を限定するものではない。特に、特許請求の範囲によって規定される本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、本発明に対して様々な置換、変更及び改変を行いうることは、発明者によって意図される。

【0098】

参考文献

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

Lindhagen E, Nygren P, Larsson R (2008) The fluorometric microculture cytotoxicity assay. Nature Protocols 3: 1364-1369.

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

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

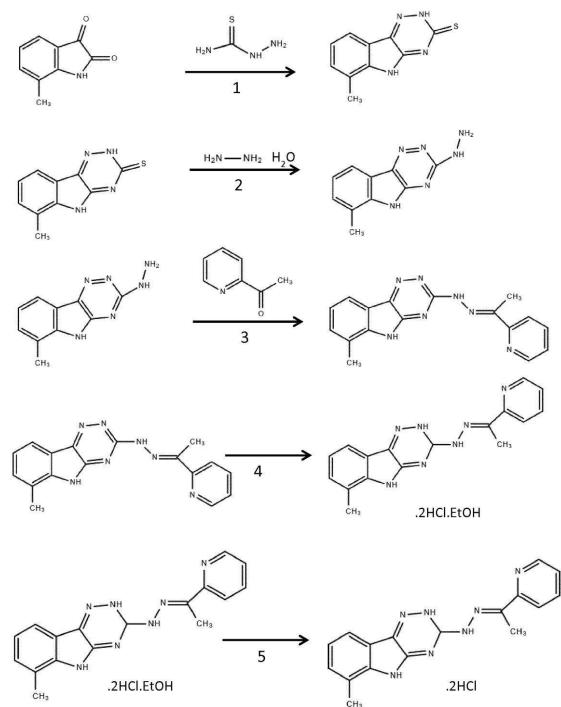
10

20

30

【図1】

Fig. 1



【図2】

Fig. 2A

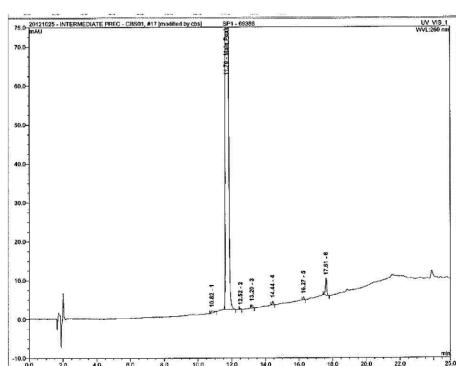
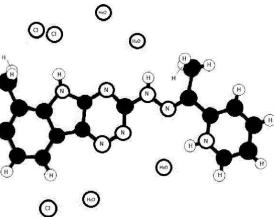
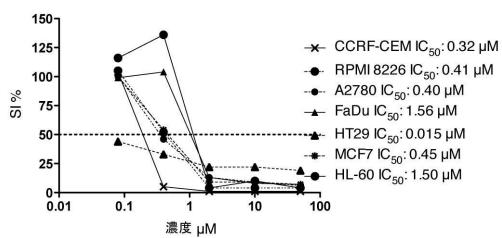


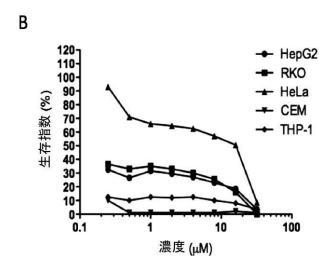
Fig. 2B



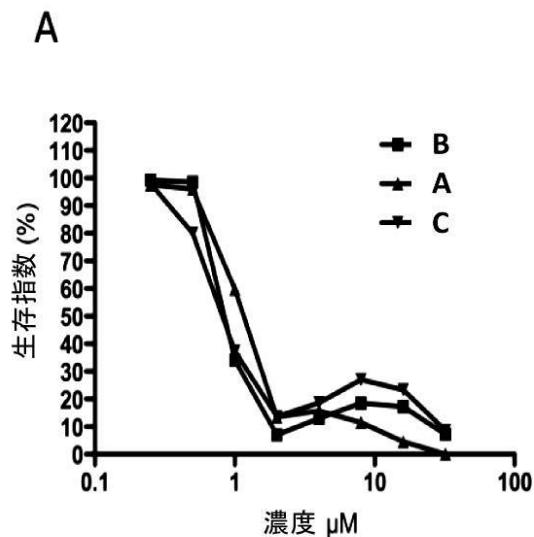
【図3】



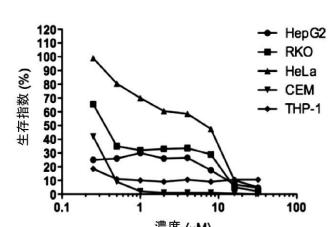
【図4-2】



【図4-1】



D



フロントページの続き

(56)参考文献 特表2015-529244(JP,A)
特表2014-508804(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 61 K 31 / 00

A 61 K 9 / 00

A 61 K 47 / 00

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)