

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291232** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.08.24

(22) Дата подачи заявки
2020.12.04

(51) Int. Cl. **C07D 405/06** (2006.01)
A61K 31/4196 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)

(54) ПОЛИМОРФЫ ТРИАЗОЛЬНОГО ПРОТИВОГРИБКОВОГО СОЕДИНЕНИЯ РС945

(31) **1917867.2**

(32) **2019.12.06**

(33) **GB**

(86) **PCT/GB2020/053107**

(87) **WO 2021/111142 2021.06.10**

(71) Заявитель:
ПАЛМОСАЙД ЛИМИТЕД (GB)

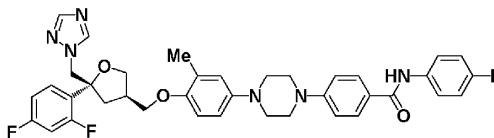
(72) Изобретатель:

**Уоллис Кристофер Джон, Стил
Джералд, Буттар Сюзанн, Сулейман
Осама, Нортен Джулиан, Микитюк
Джон, Маршалл Джейми (GB)**

(74) Представитель:

**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)**

(57) Изобретение относится к кристаллическим полиморфным формам соединения формулы (I)



и связанным аспектам.

202291232

A1

A1

202291232

ПОЛИМОРФЫ ТРИАЗОЛЬНОГО ПРОТИВОГРИБКОВОГО СОЕДИНЕНИЯ РС945

Область техники

Изобретение относится к кристаллическим полиморфным формам соединения, полезного для лечения микозов и к их композициям и применению.

Уровень техники

За последние два десятилетия заболеваемость грибковыми инфекциями значительно увеличилась, и инвазивные формы являются ведущими причинами заболеваемости и смертности, особенно среди пациентов с иммунодефицитом или иммуносупрессией. Диссеминированный кандидоз, аспергиллез легких и появление условно-патогенных грибов являются наиболее распространенными агентами, вызывающими эти серьезные микозы. Особенностью грибов является то, что они способны генерировать внеклеточный матрикс (ЕСМ), который связывает их вместе и позволяет им прилипать к своим субстратам *in vitro* или *in vivo*. Данные биопленки служат для их защиты от враждебных сред иммунной системы хозяина и сопротивления действию противогрибковых агентов (**Kaur and Singh**, 2013).

Легочный аспергиллез можно разделить на неинвазивное или инвазивное состояние. Еще одно подразделение используется для характеристики состояния у пациентов, у которых проявляются симптомы, имеющие аллергический компонент аспергиллеза (известный как АВРА; аллергический бронхолегочный аспергиллез), по сравнению с теми, у кого его нет. Факторы, провоцирующие легочный аспергиллез, могут быть острыми, например, воздействие высоких доз иммунодепрессантов или интубация в отделении интенсивной терапии. Альтернативно, они могут быть хроническими в результате перенесенной ранее инфекции, например, туберкулез (**Denning et al.**, 2011a). Хронические инфекции легких, вызванные аспергиллами, могут вызывать у пациентов обширное и необратимое поражение легких, требующее пожизненного лечения пероральными азольными препаратами (**Limper et al.**, 2011).

Растущее число исследований свидетельствует о том, что аспергиллез может играть важную роль в клинических проявлениях астмы (**Chishimba et al.**, 2012; **Pasqualotto et al.**, 2009). Кроме того, недавно опубликованная работа коррелирует с аспергиллезом с более плохими клиническими исходами у пациентов с COPD (**Bafadhel et al.**, 2013). Точно так же перекрестные исследования показали связь между присутствием *Aspergillus spp.* и *Candida spp.* в слюне больных и ухудшением их функции легких (**Chotirmall et al.**, 2010; **Agbetile et**

al., 2012).

Инвазивный аспергиллез (IA) приводит к высокой смертности среди пациентов с иммунодефицитом, например, у тех, кто перенес аллогенную трансплантацию стволовых клеток или паренхиматозных органов (таких как трансплантация легких). Первый случай IA, зарегистрированный у пациента с иммунодефицитом, возник в 1953 г. Это событие совпало с введением в схемы лечения кортикостероидов и цитотоксической химиотерапии (**Rankin**, 1953). Инвазивный аспергиллез является серьезной проблемой при лечении лейкемии и других гематологических злокачественных новообразований, учитывая его высокую заболеваемость и связанную с ним смертность. Уровень смертности обычно превышает 50% (**Lin et al.**, 2001) и долгосрочные показатели могут достигать 90% у реципиентов аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, несмотря на доступность пероральных триазольных препаратов (**Salmeron et al.**, 2012). У пациентов, перенесших трансплантацию паренхиматозных органов, особенно легкого, использование высоких доз стероидов делает пациентов уязвимыми к инфекции (**Thompson and Patterson**, 2008). Заболевание также появилось у пациентов с менее тяжелым иммунодефицитом. К ним относятся пациенты, страдающие COPD или циррозом печени, пациенты, получающие высокие дозы стероидов и лица с центральными венозными катетерами или с искусственной вентиляцией легких (**Dimopoulos et al.**, 2012).

Существующие противогрибковые препараты преимущественно вводятся либо перорально, либо системно. Эти обычно используемые пути доставки не подходят для лечения инфекций дыхательных путей легких, поскольку концентрации лекарственного средства, достигаемые в очаге инфекции, как правило, ниже, чем в непораженных органах. Это особенно касается печени, которая является основным очагом токсичности у 15% пациентов, получающих вориконазол и страдающих повышенным уровнем трансаминаз (**Levin et al.**, 2007; **Lat and Thompson**, 2011). Воздействие на печень также приводит к значительным лекарственным взаимодействиям, возникающим в результате ингибирования печеночных ферментов P450 (**Jeong et al.**, 2009; **Wexler et al.**, 2004).

Кроме того, широкое использование триазолов как в клинике, так и в сельском хозяйстве привело к растущему и проблематичному возникновению устойчивых микозов в некоторых местах (**Denning et al.**, 2011b; **Bowyer and Denning**, 2014).

Соединения, используемые при лечении микозов, описаны в WO 2016/087878 A1 (**Sunose et al.**, 2016) и WO 2016/087880 A1 (**Colley et al.**, 2016). Соединение I описано в вышеупомянутых публикациях патентных заявок и представляет собой 4-(4-(4-(((3*R*,5*R*)-5-(((1*H*-1,2,4-триазол-1-ил)метил)-5-(2,4-дифторфенил)тетрагидрофуран-3-ил)метокси)-3-метилфенил)пиперазин-1-ил)-*N*-(4-фторфенил)бензамид:



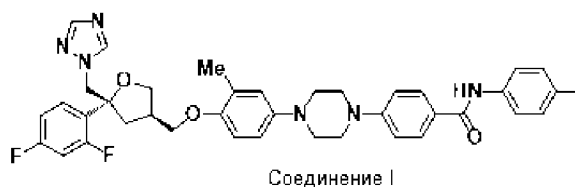
Соединение I представляет собой мощный ингибитор стерол 14 α -деметилазы *Aspergillus fumigatus* (CYP51A и CYP51B) и было охарактеризовано как мощный противогрибковый агент длительного действия *in vitro* и *in vivo* (Colley *et al.*, 2017). Кроме того, было описано, что местное лечение Соединением I в комбинации с известным системным триазольным агентом продемонстрировало синергетический противогрибковый эффект против *Aspergillus fumigatus* в модели двойного слоя альвеол человека *in vitro* и в легких мышей с нейтропенией и иммунодефицитом (Colley *et al.*, 2019). Также было обнаружено, что Соединение I является более мощным ингибитором, чем позаконазол, вориконазол и флуконазол, изолятов *Candida auris*, собранных во всем мире (Shivaprakash *et al.*, 2019). Анализ биомаркеров после интраназального дозирования Соединения I мышам с иммунодефицитом показал, что противогрибковые эффекты накапливались при повторном введении и были устойчивыми (Kimura *et al.*, 2017).

Полиморфизм является важным фактором при разработке лекарственного средства из-за его влияния на физико-химические и биофармацевтические свойства соединения. Данная характеристика возникает всякий раз, когда объект, такой как небольшая молекула, может принимать различные кристаллические решетки. Возникающие в результате вариации в упаковке в твердом состоянии могут привести к различиям в стабильности при хранении, профилях растворимости и плотности, что повлияет на состав и получение продукта, а также на характеристики растворения: важный фактор в определении биодоступности *in vivo*.

Остается потребность в полиморфных формах Соединения I для применения при лечении микозов. В частности, существует потребность в обеспечении Соединения I в кристаллической форме, которая имеет соответствующую физическую и химическую стабильность и другие свойства, связанные с лекарственным средством, относящиеся к его местному введению в легкие. К ним относятся его склонность к микронизации, его состав в виде легко диспергируемой водной суспензии, а также адекватная биодоступность и приемлемые фармакокинетические свойства.

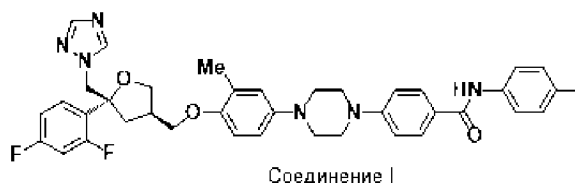
Суть изобретения

Изобретение обеспечивает соединение формулы (I):



то есть 4-(4-(4-(((3*R*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-триазол-1-ил)метил)-5-(2,4-дифторфенил)тетрагидрофуран-3-ил)метокси)-3-метилфенил)пиперазин-1-ил)-*N*-(4-фторфенил)бензамид в кристаллической форме, где кристаллическая форма представляет собой полиморфную Форму 1.

Кроме того, изобретение обеспечивает соединение формулы (I):



то есть 4-(4-(4-(((3*R*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-триазол-1-ил)метил)-5-(2,4-дифторфенил)тетрагидрофуран-3-ил)метокси)-3-метилфенил)пиперазин-1-ил)-*N*-(4-фторфенил)бензамид в кристаллической форме, где кристаллическая форма представляет собой полиморфную Форму 2.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что, хотя выше показан конкретный таутомер, соединение может существовать в нескольких таутомерных формах. Изобретение охватывает все такие таутомерные формы.

Соединение формулы (I) в настоящем документе обозначается как Соединение I.

Как описано в Примерах, кристаллическая полиморфная Форма 1 и кристаллическая полиморфная Форма 2 имеют совершенно разные кристаллические структуры. В частности, полиморфные Формы 1 и 2 изобретения имеют следующие характеристики и свойства, которые делают их особенно подходящими для применения в качестве терапевтических агентов. Полиморфы имеют высокие температуры плавления [~ 202 °C (Форма 1) и ~ 183 °C (Форма 2)]; физически устойчивы (как определено анализами РПД, ТГА и ДСК); имеют хорошую химическую стабильность (по данным спектроскопии ^1H ЯМР и анализа ВЭЖХ); легко микронизируются до респираторного размера частиц; и являются биодоступными при введении в виде водной суспензии посредством ингаляции. Таким образом, ожидается, что полиморфная Формы 1 и полиморфная Формы 2 будут полезны в различных терапевтических применениях, как описано в настоящем документе.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1: РПД высокого разрешения репрезентативного образца полиморфной Формы 1.

Фиг. 2: РПД высокого разрешения репрезентативного образца полиморфной Формы 2.

Фиг. 3: Вертикальное выравнивание РПД высокого разрешения полиморфных Форм 1 и 2.

Фиг. 4: Наложение РПД высокого разрешения полиморфных Форм 1 и 2

Фиг. 5: Расчетная РПД для полиморфной Формы 1.

Фиг. 6: Расчетная РПД для полиморфной Формы 2.

Фиг. 7: РПД образца Формы 3 предшествующего уровня техники по сравнению с РПД репрезентативных образцов Форм 1, 2 и 3.

Фиг. 8: Термический анализ (ДСК и ТГА) исходного сырья (полиморфная Форма 3).

Фиг. 9: След ДСК полиморфной Формы 1, полученный из водного ацетона (5% H_2O).

Фиг. 10: РПД полиморфной Формы 1, полученная из водного ацетона (5% H_2O) после микронизации.

Фиг. 11: Кривая РПД полиморфной Формы 2 полученная из ТГФ/ТБМЭ.

Фиг. 12: Кривая РПД полиморфной Формы 2 полученная из ТГФ/ТБМЭ.

Фиг. 13: РПД высокого разрешения полиморфной Формы 2, полученная из ТГФ/ТБМЭ после микронизации.

Фиг. 14: Кристаллическая структура полиморфной Формы 1, если смотреть по оси а

Фиг. 15: Кристаллическая структура полиморфной Формы 2, если смотреть по оси b

Фиг. 16: Быстрое сканирование кривой ДСК полиморфной Формы 1 (40 °С/мин).

Фиг. 17: Быстрое сканирование кривой ДСК полиморфной Формы 2 (40 °С/мин).

Фиг. 18: Термический анализ (ДСК и ТГА) полиморфной Формы 2 полученной из МИБК.

Фиг. 19: Средние концентрации лекарственного средства в плазме после ингаляционного введения полиморфной Формы 1 самцам крыс в номинальной дозе 2,2 мг/кг.

Фиг. 20: Средние концентрации лекарственного средства в плазме после ингаляционного введения полиморфной Формы 2 самцам крыс при номинальном уровне дозы 2,2 мг/кг.

Подробное описание изобретения

Рентгеновская порошковая дифрактограмма (РПД) состоит из графика зависимости интенсивности дифрагированного луча от угла дифракции 2θ . Положения пиков 2θ на рентгеновской порошковой дифрактограмме относятся непосредственно к элементарной ячейке кристаллической фазы, что приводит к дифрактограмме, уникальной для каждой полиморфной формы. Следовательно, дифрактограмма РПД характерна для каждого полиморфа и может использоваться для отличия одного полиморфа от другого. Рентгеновские порошковые дифрактограммы получали непосредственно для образцов полиморфных Форм 1 и 2, полученных, как описано в настоящем документе (**Фиг. 1 и 2**). Из визуального сравнения двух дифрактограмм (**Фиг. 3 и 4**) ясно видно, что Формы 1 и 2 Соединения I представляют собой две различные кристаллические формы.

Отражения в 2θ считаются уникальными (и, следовательно, характерными для кристаллической формы) при условии, что при сравнении двух (или более) дифрактограмм не наблюдается никакого отражения в пределах $\pm 0,2^\circ 2\theta$. Полиморфные формы 1 и 2 обладают рядом уникальных отражений (**Таблица 1**).

Таблица 1: Уникальные отражения РПД Полиморфных Форм 1 и 2.

Отражения в 2θ	
Форма 1	Форма 2
7,0	10,8
7,4	17,0
7,9	20,3
18,2	22,7
19,7	23,9
20,8	24,3
24,7	

Выяснение структур полиморфных Форм 1 и 2 с использованием рентгеновской кристаллографии с источником синхротронного света позволило рассчитать РПД полиморфных Форм 1 и 2 на основе экспериментальных дифракционных значений, полученных из набора данных монокристалла. Для обоих полиморфов наблюдается очень тесная корреляция между экспериментальными данными (**Фиг. 1 и 2**) и рассчитанными дифрактограммами (**Фиг. 5 и 6**).

Таким образом, обеспечивается кристаллическая форма Соединения I в полиморфной Форме 1, имеющая рентгеновскую порошковую дифрактограмму, по сути, такую, как показано на **Фиг. 1**.

Соответственно, обеспечивается кристаллическая форма Соединения I в полиморфной Форме 1, где указанная кристаллическая форма имеет рентгеновскую порошковую дифрактограмму, содержащую три, четыре, пять, шесть или семь пиков, выбранных из ($\pm 0,2$) 7,0, 7,4, 7,9, 18,2, 19,7, 20,8 и 24,7 градуса 2-тета.

Дополнительные пики профиля РПД для полиморфной Формы 1 показаны в **Таблице 3**. Таким образом, соответственно обеспечивается кристаллическая форма Соединения I в полиморфной Форме 1, где указанная кристаллическая форма имеет рентгеновскую порошковую дифрактограмму, содержащую следующие семь пиков: ($\pm 0,2$) 7,0, 7,4, 7,9, 18,2, 19,7, 20,8 и 24,7 градуса 2-тета и один, два, три, четыре или пять пиков, выбранных из ($\pm 0,2$) 10,2, 16,7, 17,9, 23,3 и 24,2 градуса 2 -тета.

Соответственно, обеспечивается кристаллическая форма Соединения I в полиморфной Форме 1, где указанная кристаллическая форма имеет параметры элементарной ячейки 16,80 Å, 23,58 Å и 25,58 Å и углы α , β и γ , равные 90°.

Таким образом, обеспечивается кристаллическая форма Соединения I в полиморфной Форме 2, имеющая рентгеновскую порошковую дифрактограмму, по сути, такую, как показано на **Фиг. 2**.

Также обеспечивается кристаллическая форма Соединения I в полиморфной Форме 2, где указанная кристаллическая форма имеет рентгеновскую порошковую дифрактограмму, содержащую три, четыре, пять или шесть пиков, выбранных из ($\pm 0,2$) 10,8, 17,0, 20,3, 22,7, 23,9 и 24,3 градуса 2-тета.

Дополнительные пики профиля РПД для полиморфной Формы 2 показаны в **Таблице 3**. Таким образом, соответственно обеспечивается кристаллическая форма Соединения I в полиморфной Форме 2, где указанная кристаллическая форма имеет рентгеновскую порошковую дифрактограмму, содержащую следующие шесть пиков: ($\pm 0,2$) 10,8, 17,0, 20,3, 22,7, 23,9 и 24,3 градуса 2-тета и один, два, три, четыре, пять или шесть пиков, выбранных из ($\pm 0,2$) 16,6, 19,5, 20,3, 22,0, 26,6 и 26,9 градуса 2-тета.

Соответственно, обеспечивается кристаллическая форма Соединения I в полиморфной Форме 2, где указанная кристаллическая форма имеет параметры элементарной ячейки 16,81 Å, 5,65 Å и 35,56 Å и угол α 90°, угол β 101,54° и угол γ 90°.

Полиморфная Форма 3 (известный уровень техники)

Соединение I описано в известном уровне техники в публикациях патентных заявок WO 2016/087878 A1 и WO 2016/087880 A1. В данных заявках Соединение I, полученное, как описано в них, выделяли одним из способов, включающих: (а) добавление воды к реакционной смеси, содержащей Соединение I в пиридине, с получением неочищенного твердого Соединения I с последующей очисткой колоночной флэш-хроматографией с элюированием 0-3% MeOH в ДХМ; (b) добавление воды к охлажденной реакционной смеси, содержащей Соединение I в ДМФА, с последующим дальнейшим охлаждением реакционной смеси и сбором фильтрованием с получением твердого Соединения I, с последующим суспендированием осадка на фильтре в воде и сбором твердых веществ фильтрованием или; (c) добавление воды к реакционной смеси, содержащей Соединение I в ДМСО, с последующей экстракцией Соединения I EtOAc, выпариванием летучих веществ *в вакууме* и очисткой остатка колоночной флэш-хроматографией с элюированием 0-2% MeOH в ДХМ и повторная очистка колоночной флэш-хроматографией с элюированием 0-50% EtOAc в ДХМ.

Для целей настоящего описания Соединение I, как описано ранее, полученное в

результате описанных в настоящем документе способов синтеза, представляет собой слабокристаллическое проявление Соединения I, называемого в настоящем документе как Форма 3. Общим признаком данных способов является то, что полиморфная Форма 3 получается в результате быстрого получения Соединения I либо путем добавления воды к раствору Соединения I в смешиваемом органическом растворителе (таком как ДМФА или ДМСО), либо путем выпаривания смеси растворителя после очистки хроматографией. Как описано ниже, вода является мощным антирастворителем для Соединения I, что приводит к его быстрому осаждению в данных случаях почти в аморфной форме. Тот же принцип применяется к образцам, возвращенным после хроматографии, где быстрое выпаривание элюента, содержащего Соединение I, дает полиморфную Форму 3, а не более упорядоченную кристаллическую форму, такую как Форма 1 или Форма 2.

Без ограничения теорией, экспериментальные данные показывают, что осаждение Соединения I путем быстрого выпаривания раствора в летучем растворителе (таком как ДХМ) приводит к неупорядоченной твердой форме. То же самое относится к (почти мгновенному) осаждению Соединения I путем добавления антирастворителя; например, путем гашения раствора Соединения I в смешиваемом органическом растворителе с водой. Оба данных способа, описанные ранее, не дают соединению формулы I достаточно времени для достижения более термодинамически стабильных, высокоупорядоченных кристаллических форм, примерами которых являются полиморфные Формы 1 и 2, описанные в настоящем документе.

Репрезентативный образец Формы 3 получали по следующей процедуре. К суспензии 4-(4-(4-(((3*R*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-триазол-1-ил)метил)-5-(2,4-дифторфенил)тетрагидрофуран-3-ил)метокси)-3-метилфенил)пиперазин-1-ил)бензойной кислоты (2,50 г, 4,24 ммоль), EDCI (1,63 г, 8,48 ммоль) и DMAP (0,03 г, 0,21 ммоль) в пиридине (30 мл) добавляли 4-фторанилин (0,41 мл, 4,32 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 60 °C в течение 2 часов, затем охлаждали до комнатной температуры, разбавляли водой (60 мл) и перемешивали в течение 5 минут. Полученное твердое вещество собирали фильтрованием, промывали водой (3 × 10 мл) и диэтиловым эфиром (2 × 15 мл) с получением порошка желтовато-коричневого цвета. Полученный таким образом неочищенный продукт очищали колоночной флэш-хроматографией (SiO₂, 40 г, 0-3% MeOH в ДХМ, градиентное элюирование). Полученное желтое твердое вещество (2,37 г) суспендировали в ДМСО (6,50 мл) и смесь нагревали при 60 °C до полного растворения. Раствор охлаждали до комнатной температуры и к перемешиваемому раствору добавляли воду (20 мл), что приводило к осаждению белого твердого вещества. Твердое вещество собирали фильтрованием, промывали водой (3 × 10 мл) и диэтиловым эфиром (3 × 5 мл) и затем сушили в вакууме при

50 °C в течение 3 дней с получением Соединения I в виде почти белого твердого вещества (2,25 г, 77%).

На **Фигуре 7** показана РПД Соединения I в виде полиморфной **Формы 3**, полученной, как описано выше («Образец известного уровня техники»), по сравнению с образцом **Формы 3**, типичным для серий, используемых в настоящих исследованиях («Стандартная форма 3»), и по сравнению с РПД, полученными из полиморфов **Формы 1** и **Формы 2**. Кривые РПД материала **Формы 3** показывают, что он слабокристаллический, и, следовательно, он не считался легко проявляемым объектом. В результате для данной полиморфной формы не было получено сравнительных данных о биодоступности (см. Примеры).

Свойства полиморфной Формы 1 и Формы 2

Термодинамическая стабильность полиморфных Форм 1 и 2 при различных температурах

Было определено, что кристаллические формы, обозначаемые в настоящем документе как **Форма 1** и **Форма 2**, составляют энантиотропную полиморфную пару. Данное свойство возникает из-за температурной зависимости их относительной термодинамической стабильности, при этом один из полиморфов является наиболее термодинамически стабильным проявлением материала вплоть до характерной (эмпирически определенной) температуры; выше которого их порядок стабильности инвертируется. В данном случае суспензии, содержащие равные количества двух полиморфов, созревали в одном из шести различных растворителей при 50 °C, 70 °C и 135 °C (**Таблица 6**). Во всех экспериментах, проведенных как при 50 °C, так и при 70 °C, смеси 1:1 превращались в суспензии, содержащие только полиморфную **Форму 2**. Напротив, все смеси, выдерживаемые при температуре 135 °C, превращались в **Форму 1**. Эти данные подтверждают постулат о том, что термодинамическая взаимосвязь между **Формами 1** и **2** является энантиотропной и что температура, при которой происходит инвертирование стабильности (точка энантиотропного перехода), находится в интервале температур 70-135 °C.

Предрасположенность **Формы 1** или **Формы 2** к образованию из различных кондиционирующих сред при температурах ниже точки энантиотропного перехода исследовали с помощью экспериментов с перекрестным затравливанием (см. **Таблицы 8-13** в настоящем документе). В системах с одним органическим растворителем, описанными в **Таблице 8**, смеси, содержащие равные количества **Формы 1** и **Формы 2**, обращались с получением суспензий, содержащих только полиморфную **Форму 2**. Исключение составляла бинарная смесь IPA с добавлением 5% воды, которая оставалась полиморфной смесью. (**Таблица 8**, данные 10-12). Этот результат можно интерпретировать как

возникающий двумя разными путями. Первый состоит в том, чтобы заключить, что в водном ИРА растворимость Соединения I в любой форме слишком низка для осуществления полиморфного взаимопревращения, и поэтому кинетические факторы определяют результат. Второй постулат заключается в том, что присутствие воды оказывает влияние на полиморфную смесь в пользу Формы 1, несмотря на то, что она остается метастабильным полиморфом в диапазоне температур эксперимента.

Данную гипотезу исследовали в серии экспериментов по суспендированию и перекрестному затравливанию (**Таблицы 9-13**), в ходе которых было определено, что присутствие воды в небольших количествах действует как соразтворитель, способствующий преобладанию полиморфной Формы 1. Данную характеристику наблюдали, когда полиморфную Форму 2 суспендировали только в ацетоне и воде и в их смесях (**Таблица 9**); в ТГФ и водном ТГФ (**Таблица 10**); в смесях диоксан/вода (**Таблица 11**) и в МЭК, содержащих возрастающие доли воды (**Таблица 12**).

Из данных видно, что именно присутствие воды, добавленной к данным растворителям, вызывает полиморфный переход. Однако, за исключением низких уровней, вода также является сильным антирастворителем и заметно снижает растворимость обоих полиморфов. Следствием такого профиля растворимости является то, что в одной воде или в смесях растворителей, богатых водой, процесс перехода от Формы 2 к Форме 1 либо не происходит, либо ингибируется предельной растворимостью (**Таблица 11, Данные 3, 6 и 8**).

Было обнаружено, что полиморфное взаимопревращение происходит легче при нагревании (**Таблица 9, 10 и 12**), как и ожидалось из зависимости скорости оборота от температуры (по уравнению Аррениуса), и предположительно усиливалось увеличением растворимости суспендированных твердых веществ. Было обнаружено, что судьба полиморфов при уравнивании в охлажденном МЭК или ТГФ зависит не только от присутствия или отсутствия воды в системе, но также зависит от их исходной полиморфной композиции (**Таблица 13**). Смеси двух полиморфов превращались в суспензии Формы 2 в номинально сухой среде, как и ожидалось, в то время как одиночные полиморфы оставались неизменными. Напротив, присутствие воды снова благоприятствовало Форме 1, и были дополнительные доказательства того, что начальное присутствие данного полиморфа в исходной смеси (действующее как затравка) способствовало взаимопревращению.

Данные экспериментов по суспендированию и перекрестному затравливанию, описанные в настоящем документе, показывают, что преобладание полиморфных Форм 1 и 2 при воздействии систем растворителей зависит от выбора органического растворителя,

содержания в нем воды, температуры суспензии, времени контакта и чистоты (т.е. его полиморфная композиция). Тем не менее исследования, описанные в настоящем документе, обеспечивают понимание данных параметров, что позволяет манипулировать ими для получения и сохранения физической целостности Формы 1 или Формы 2 по желанию. Кроме того, было определено, что, хотя кристаллическая Форма 1 предпочтительно в водных органических средах, среды, в которых вода является основным компонентом, по сути, инертны по отношению к полиморфному взаимопревращению.

Поведение данных систем и информация, которую они дают, важны для разработки подходящих составов, с помощью которых Соединение I может быть доставлено пациентам.

Полиморфные Формы 1 и 2 можно легко микронизировать. Это означает, что они подходят для использования в препаратах для доставки в дыхательные пути (например, в легкие).

Исследования, описанные в настоящем документе, неожиданно показали, что полиморфная Форма 2, в частности, является подходящей кристаллической формой Соединения I для составления в виде водной суспензии, несмотря на доказательства того, что эта форма является метастабильной в таких средах при температуре окружающей среды. Данные, полученные из описанных в настоящем документе исследований, показывают, что в средах, содержащих большое количество воды, чрезвычайно низкая растворимость Соединения I в воде обеспечивает эффективный кинетический барьер для потери полиморфной целостности. Физико-химические свойства Соединения I (высокая молекулярная масса и липофильность) гарантируют, что две основные кристаллические формы трудно взаимопревращаются друг в друга в таких условиях и, следовательно, сохраняют свою исходную полиморфную форму. Как продемонстрировано в другом месте настоящего документа, полиморфная Форма 2 неожиданно и выгодно проявляет более высокую биодоступность по сравнению с биодоступностью полиморфной Формы 1 при составлении в виде водной суспензии и введении путем ингаляции. Соответственно, полиморфная Форма 2 является предпочтительной формой Соединения I для применения в качестве ингаляционного терапевтического агента в распыляемых водных суспензиях.

Свойства полиморфной стабильности вместе с более низкой системной биодоступностью Формы 1 при ингаляционном введении благоприятствуют альтернативным показаниям и представлениям для этого полиморфа, которые обсуждаются ниже.

Общие синтетические способы

Сольваты

В одном аспекте обеспечивается Соединение I в сольватированной форме. Подходящие сольваты получают при дозревании Соединения I в ряде ароматических растворителей, таких как анизол, ацетофенон, бензиловый спирт, хлорбензол и кумол. Альтернативно подходящий сольват получают при дозревании соединения I в ТГФ. Соответственно, полученный таким образом сольват Соединения I содержит около 13-14 мас.% растворителя при анализе с помощью ТГА. Соответственно, соотношение Соединения I и растворителя приблизительно равно стехиометрическому (1:1).

Было обнаружено, что идентифицированные сольваты Соединения I десольватируются термически с образованием кристаллической полиморфной Формы 1. Сольват анизола, например, показал две резкие эндотермы при анализе ДСК. Первая, происходящая при 112-114°C, совпала со снижением массы на 13,4%, как определено по профилю ТГА, что соответствует чуть менее одному эквиваленту растворителя и согласуется с данными ^1H ЯМР. Вторая эндотерма с максимумом при 202°C соответствует температуре плавления Формы 1.

Таким образом, в одном аспекте обеспечивается способ получения Соединения I в виде кристаллической полиморфной Формы 1, который включает нагревание Соединения I в сольватированной форме, т.е. сольват, образованный с анизолом, ацетофеноном, бензиловым спиртом, хлорбензолом или кумолом, для удаления растворителя и, таким образом, получения Соединения I в виде кристаллической полиморфной Формы 1. Соответственно, Соединение I в сольватированной форме является промежуточным продуктом в синтезе полиморфной Формы 1.

Полиморфная Форма 1

В одном варианте реализации обеспечивается способ получения Соединения I в виде полиморфной Формы 1, включающий стадию кристаллизации Соединения I в виде полиморфной Формы 1 из раствора Соединения I в растворителе, где растворитель выбирают из группы, состоящей из толуола, 2-метоксиэтанола, водного IPA (например, содержащего 3-6% H_2O по объему, например, 5% H_2O по объему) и водного ацетона (например, содержащего 5-10% H_2O по объему).

Соответственно, растворителем является водный раствор ацетона (содержащий 5% H_2O по объему).

Полиморфная Форма 2

В одном варианте реализации обеспечивается способ получения Соединения I в виде полиморфной Формы 2, включающий стадию кристаллизации Соединения I в виде

полиморфной Формы 2 из раствора Соединения I в номинально сухом органическом растворителе, где растворитель выбирают из группы, состоящей из МИБК, ТГФ, PrOAc, EtOH, ДМЭ, MeOH, MeCN, MeNO₂, н-гептана, Et₂O, IPA, МЭК, ацетона, ТБМЭ, i-BuOH, или смеси ТГФ и ТБМЭ. Соответственно, способ включает стадию кристаллизации Соединения I в виде полиморфной Формы 2 из раствора Соединения I в номинально сухой смеси органических растворителей, где смесь растворителей включает два или более растворителей, выбранных из группы, состоящей из МИБК, ТГФ, PrOAc, EtOH, ДМЭ, MeOH, MeCN, MeNO₂, н-гептана, Et₂O, IPA, МЭК, ацетона, ТБМЭ и i-BuOH.

Для целей настоящего изобретения «номинально сухой» означает, что в растворитель не добавлялась вода. В зависимости от гидрофильности выбранного растворителя могут присутствовать следы воды, хотя экспериментальные условия предназначены для ее исключения.

Подходящим растворителем является МИБК. Альтернативно, система растворителей представляет собой смесь ТГФ и толуола, при этом подходящая смесь содержит от 2:1 до 1:2 ТГФ:толуол (например, 10:5 по объему; 9:5 по объему; 8:4 по объему; 8:16 по объему ТГФ:толуол соответственно). Альтернативно, система растворителей представляет собой смесь ТГФ и ТБМЭ, где подходящая смесь содержит от 4:1 до 1:2 ТГФ:ТБМЭ (например, 8:2 по объему; 8:2,5 по объему; 8:4 по объему; 8:6 по объему; 8:8 по объему; 8:10 по объему или 8:12 по объему ТГФ:ТБМЭ соответственно).

Фармацевтические композиции

В одном варианте реализации обеспечивается фармацевтическая композиция, содержащая соединение по изобретению, необязательно в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми разбавителями или носителями.

Подходящим образом соединение по изобретению вводят местно в легкие или нос, в частности, местно в легкие. Таким образом, в одном варианте реализации обеспечивается фармацевтическая композиция, содержащая соединение по изобретению, необязательно в комбинации с одним или несколькими приемлемыми для местного применения разбавителями или носителями. Подходящим образом соединение по изобретению вводят путем ингаляции.

Подходящим фармацевтически приемлемым разбавителем или носителем является вода.

Композиции удобно вводить в стандартной дозированной форме, и их можно получить любым из способов, хорошо известным в области фармацевтики, например, как описано в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17-е изд., Mack Publishing Company, Easton, PA., (1985). Композиции также можно удобно вводить в виде многократной стандартной

дозированной формы.

Подходящие композиции для легочного или интраназального введения включают порошки, жидкие растворы, жидкие суспензии, водные суспензии, назальные капли, содержащие растворы, или суспензии, или аэрозоли под давлением или без него.

Местное введение в нос или легкое может быть достигнуто путем использования состава без давления, такого как водная суспензия. Такие составы можно вводить с помощью распыления, т.е. с помощью распылителя, т.е. такого, который может быть как ручным и портативным, так и не портативным и предназначенным для использования дома или в больнице. Примером такого устройства является ингалятор RESPIMAT.

Жидкие суспензионные и аэрозольные составы (под давлением или без давления) обычно содержат соединение по изобретению в форме частиц, например, с D_{50} 0,5-10 мкм, подходящим образом около 1-5 мкм, например, 1-2 мкм. Соответственно, соединение по изобретению в форме частиц имеет D_{10} от 0,2 до 1 мкм, например, от 0,2 до 0,5 мкм. Соответственно, соединение по изобретению в форме частиц имеет D_{90} от 2 до 6 мкм, например, от 3 до 4 мкм. Форма частиц соединения может быть, например, микронизированной формой. Микронизацию можно осуществлять с использованием струйной мельницы, такой как производимые Hosokawa Alpine. Результирующее распределение частиц по размерам можно измерить с помощью лазерной дифракции (например, с помощью прибора Malvern Mastersizer 2000S). Распределение частиц по размерам может быть представлено с использованием значений D_{10} , D_{50} и D_{90} . Среднее значение D_{50} распределения частиц по размерам определяется как размер частиц в микронах, который делит распределение пополам. Измерение, полученное с помощью лазерной дифракции, более точно описывается как объемное распределение, и, следовательно, значение D_{50} , полученное с использованием этой процедуры, более осмысленно называется значением Dv_{50} (медиана для объемного распределения). Используемые в настоящем документе значения Dv относятся к распределениям частиц по размерам, измеренным с использованием лазерной дифракции. Точно так же значения D_{10} и D_{90} , используемые в контексте лазерной дифракции, считаются значениями Dv_{10} и Dv_{90} и относятся к размеру частиц, при котором 10 % распределения лежит ниже значения D_{10} , и 90% распределения лежит ниже значение D_{90} соответственно.

В соответствии с одним конкретным аспектом изобретения обеспечивается фармацевтическая композиция, содержащая соединение по изобретению в виде водной суспензии, т.е. в форме частиц, суспендированных в водной среде.

Водная среда обычно содержит воду и одно или несколько вспомогательных веществ, выбранных из буферов, агентов, регулирующих тоничность (таких как хлорид натрия),

агентов, регулирующих pH, модификаторов вязкости, сорастворителей (таких как пропиленгликоль) и поверхностно-активных веществ (таких как Lipoid S100).

Соответственно, водная среда содержит по меньшей мере около 40% воды, например, по меньшей мере около 60% воды, по меньшей мере около 80% воды, по меньшей мере около 95% воды или по меньшей мере около 99% воды, например, по меньшей мере около 99% воды.

Соответственно, когда Соединение I вводят в виде водной суспензии, Соединение I используют в виде кристаллической полиморфной Формы 2. Подходящая концентрация Соединения I в составе водной суспензии составляет 1-10 мг/мл, например, 4-6 мг/мл.

Таким образом, в соответствии с одним вариантом реализации обеспечивается фармацевтическая композиция, содержащая Соединение I, используемое в виде кристаллической полиморфной Формы 2, в форме частиц, суспендированных в водной среде.

Местное введение в нос или легкие также может быть достигнуто с помощью аэрозольной композиции под давлением. Аэрозольные составы обычно содержат активный ингредиент, суспендированный или растворенный в подходящем аэрозольном пропелленте, таком как хлорфторуглерод (CFC) или гидрофторуглерод (HFC). Подходящие CFC пропелленты включают трихлормонофторметан (пропеллент 11), дихлортетрафторметан (пропеллент 114) и дихлордифторметан (пропеллент 12). Подходящие HFC пропелленты включают тетрафторэтан (HFC-134a) и гептафторпропан (HFC-227). Пропеллент обычно содержит 40%-99,5%, т.е. 40%-90% по массе всей ингаляционной композиции. Состав может содержать вспомогательные вещества, включая сорастворители (например, этанол) и поверхностно-активные вещества (например, лецитин, сорбитантриолеат и т.п.). Другие возможные вспомогательные вещества включают полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон, глицерин и т.п. Аэрозольные составы упаковываются в канистры, и подходящая доза доставляется с помощью дозирующего клапана (например, поставляемого компаниями Bepak, Valois или 3M или, альтернативно, компаниями Aptar, Coster или Vari).

Местное введение в легкие также может быть достигнуто путем использования сухого порошкообразного состава. Сухой порошкообразный состав будет содержать соединение по настоящему изобретению в форме частиц, обычно с ММАД 1-10 мкм или D₅₀ 0,5-10 мкм, например, около 1-5 мкм. Порошки соединения по изобретению в форме частиц могут быть получены путем микронизации или аналогичного процесса измельчения. Микронизацию можно осуществлять и измерять, как описано выше. Состав, как правило, содержит приемлемый для местного применения разбавитель, такой как лактоза, глюкоза или маннит

(предпочтительно лактоза), обычно со сравнительно большим размером частиц, например, ММАД 50 мкм или более, например, 100 мкм или более или D_{50} 40-150 мкм. Используемый в настоящем документе термин «лактоза» относится к лактозосодержащему компоненту, включая моногидрат α -лактозы, моногидрат β -лактозы, безводную α -лактозу, безводную β -лактозу и аморфную лактозу. Компоненты лактозы могут быть обработаны микронизацией, просеиванием, измельчением, прессованием, агломерацией или распылительной сушкой. Также охватываются коммерчески доступные формы лактозы в различных формах, например, продукты Lactohale® (лактоза для ингаляций; DFE Pharma), InhaLac®70 (просеянная лактоза для ингалятора сухого порошка; Meggle), Pharmatose® (DFE Pharma) и Respitose® (просеянная лактоза для ингаляций DFE Pharma). В одном варианте реализации лактозный компонент выбирают из группы, состоящей из моногидрата α -лактозы, безводной α -лактозы и аморфной лактозы. Предпочтительно лактоза представляет собой моногидрат α -лактозы.

Составы сухих порошков могут также содержать другие вспомогательные вещества, такие как стеарат натрия, стеарат кальция или стеарат магния.

Сухой порошкообразный состав обычно доставляется с использованием устройства для ингаляции сухого порошка (DPI). Примеры систем доставки сухого порошка включают SPINHALER, DISKHALER, TURBOHALER, DISKUS, SKYEHALER, ACCUHALER и CLICKHALER. Другие примеры систем доставки сухого порошка включают ECLIPSE, NEXT, ROTAHALER, HANDIHALER, AEROLISER, CYCLOHALER, BREEZHALER/NEOHALER, MONODOSE, FLOWCAPS, TWINCAPS, X-CAPS, TURBOSPIN, ELPENHALER, MIATHALER, TWISTHALER, NOVOLIZER, PRESSAIR, ELLIPTA, ингалятор сухого порошка ORIEL, MICRODOSE, PULVINAL, EASYHALER, ULTRAHALER, TAIFUN, PULMOJET, OMNIHALER, GYROHALER, TAPER, CONIX, XCELOVAIR и PROHALER.

В составах, отличных от водных суспензий, таких как кремы и пессарии, Соединение I целесообразно использовать в виде кристаллической полиморфной Формы 1.

Медицинское применение

Соединение I полезно при лечении микозов и для предотвращения или лечения заболеваний, связанных с микозами.

В одном из аспектов изобретения обеспечивается применение Соединения I в получении лекарственного средства для лечения микозов и для предотвращения или лечения заболеваний, связанных с микозами.

В другом аспекте изобретения обеспечивается способ лечения субъекта с микозом,

который включает введение указанному субъекту эффективного количества Соединения I.

В другом аспекте изобретения обеспечивается способ предотвращения или лечения заболевания, связанного с микозом, у субъекта, который включает введение указанному субъекту эффективного количества Соединения I.

В другом аспекте изобретения обеспечивается способ лечения субъекта с микозом легкого или носа (в частности, легкого), который включает введение указанному субъекту посредством ингаляции эффективного количества Соединения I.

В другом аспекте изобретения обеспечивается способ предотвращения или лечения заболевания, связанного с микозом легкого или носа (в частности, легкого) у субъекта, который включает введение указанному субъекту посредством ингаляции эффективного количества Соединения I.

Микозы могут, в частности, быть вызваны *Aspergillus* spp. такими как *Aspergillus fumigatus* или *Aspergillus pullulans*, особенно *Aspergillus fumigatus*. Микозы также могут быть вызваны *Candida* spp., например, *Candida albicans* или *Candida glabrata*; *Rhizopus* spp., например, *Rhizopus oryzae*; *Cryptococcus* spp., например, *Cryptococcus neoformans*; *Chaetomium* spp., например, *Chaetomium globosum*; *Penicillium* spp., например, *Penicillium chrysogenum* и *Trichophyton* spp., например, *Trichophyton rubrum*.

Заболеванием, связанным с микозом, является, например, аспергиллез легких.

Соответственно, обеспечивается Соединение I в форме полиморфной Формы 2 для применения при лечении микозов и заболеваний, связанных с микозом.

Альтернативно, обеспечивается Соединение I в форме полиморфной Формы 1 для применения при лечении микозов и заболеваний, связанных с микозом.

Соединение I можно использовать в профилактических целях путем введения Соединения I до начала микоза. Например, Соединение I можно вводить профилактически субъектам с риском развития микоза, таким как недоношенные дети, дети с врожденными пороками легких или сердца, субъекты с иммунодефицитом (например, страдающие ВИЧ-инфекцией), астматики, субъекты с муковисцидозом, пожилые субъекты и субъекты, страдающие от хронического состояния здоровья, поражающего сердце или легкие (например, застойная сердечная недостаточность или хроническое обструктивное заболевание легких).

Соответственно, обеспечивается Соединение I в форме полиморфной Формы 1 для применения при предотвращении микозов и заболеваний, связанных с микозом.

Альтернативно, обеспечивается Соединение I в форме полиморфной Формы 2 для применения при предотвращении микозов и заболеваний, связанных с микозом.

Субъекты включают людей и животных, особенно людей.

Соединение по изобретению особенно полезно для лечения микозов, таких как инфекция *Aspergillus fumigatus*, и для предотвращения или лечения заболеваний, связанных с микозами, таких как инфекция *Aspergillus fumigatus*, у субъектов из группы риска. Субъекты группы риска определены выше.

Соединение по изобретению также применимо для лечения азолрезистентных микозов, таких как азолрезистентная инфекция *Aspergillus fumigatus*, особенно в комбинации с посаконазолом.

Соединение по изобретению можно вводить в комбинации со вторым или дополнительным активным ингредиентом. Второй или дополнительные активные ингредиенты могут быть выбраны, например, из других противогрибковых агентов (таких как вориконазол или позаконазол), амфотерицина В, эхинокандина (такого как каспофунгин) и ингибитора 3-гидрокси-3-метил-глутарил-КоА редуктазы (например, ловастатин, правастатин или флувастатин).

Вторые или дополнительные активные ингредиенты включают активные ингредиенты, подходящие для лечения или предотвращения микоза, такого как инфекция *Aspergillus fumigatus*, или заболевания, связанного с микозом, такого как инфекция *Aspergillus fumigatus*, или состояний, сопутствующих микозу, такого как инфекция *Aspergillus fumigatus*.

Соединение по изобретению может быть составлено совместно со вторым или дополнительным активным ингредиентом, или второй или дополнительный активный ингредиент может быть составлен для введения отдельно тем же или другим путем.

Например, соединение по изобретению можно вводить пациентам, которые уже проходят системное лечение противогрибковым средством, таким как вориконазол или позаконазол.

Например, соединение по изобретению можно вводить совместно, например, комбинированный препарат с одним или несколькими агентами, выбранными из амфотерицина В, эхинокандина, такого как каспофунгин, и ингибитора 3-гидрокси-3-метил-глутарил-КоА редуктазы, такого как ловастатин, правастатин или флувастатин.

Соединение по изобретению можно альтернативно (или дополнительно) вводить совместно, например, комбинированный препарат с одним или несколькими агентами, выбранными из кандицидина, филипина, гамицина, натамицина, нистатина, римоцидина, бифоназола, бутконазола, клотримазола, эконазола, фентиконазола, изоконазола, кетоназола, луликоназола, миконазола, омоконазола, оксиконазола, сертаконазола, сулконазола, тиоконазола, альбаконазола, эфинаконазола, эпоксиконазола, флуконазола, изавуконазола, итраконазола, пропиконазола, равуконазола, терконазола, абафунгина,

аморолфина, бутенафина, нафтифина, тербинафина, анидулафунгина, микафунгина, бензойной кислоты, циклопирокса, флуцитозин (5-фторленцитозина), гризеофульвина, толнафтата и ундециленовой кислоты.

Предпочтительные партнеры по комбинации включают интраконазол, вориконазол, каспофунгин и позаконазол.

В соответствии с аспектом изобретения обеспечивается набор частей, включающий: **(a)** фармацевтическую композицию, содержащую соединение по изобретению, необязательно в комбинации с одним или несколькими разбавителями или носителями; **(b)** фармацевтическую композицию, содержащую второй активный ингредиент, необязательно в комбинации с одним или несколькими разбавителями или носителями; **(c)** необязательно одну или несколько дополнительных фармацевтических композиций, каждая из которых содержит третий или дополнительный активный ингредиент, необязательно в комбинации с одним или несколькими разбавителями или носителями, и **(d)** инструкции по введению фармацевтических композиций субъекту, нуждающемуся в этом. Субъект, нуждающийся в этом, может страдать или быть восприимчивым к микозу, такому как инфекция *Aspergillus fumigatus*.

Соединение по изобретению можно вводить с подходящим интервалом, например, один раз в неделю, один раз через день, один раз в день, два раза в день, три раза в день или четыре раза в день.

Ожидается, что подходящая доза для человека со средним весом (50-70 кг) будет составлять от 50 мкг до 10 мг/день, например, от 500 мкг до 5 мг/день, хотя точная доза для введения может быть определена специалистом в данной области техники.

Ожидается, что Соединение I в кристаллической форме полиморфной Формы 1 будет иметь одно или несколько из следующих благоприятных свойств:

- проявлять широкий диапазон термической стабильности, о чем свидетельствует высокая температура плавления ($>200^{\circ}\text{C}$);
- быть восприимчивым к микронизации при сохранении своей полиморфной целостности; и
- препятствовать превращению в Форму 2 в составах, предназначенных для ее введения, например, в составах, отличных от водных суспензий.

Ожидается, что Соединение I в кристаллической форме полиморфной Формы 2 будет иметь одно или несколько из следующих благоприятных свойств:

- проявлять широкий диапазон термической стабильности, о чем свидетельствует высокая температура плавления ($>180^{\circ}\text{C}$);
- иметь эффективную биодоступность для местного лекарственного средства,

в частности, предназначенного для лечения заболеваний легких, и проявлять более высокую биодоступность, чем у Формы 1, при введении путем ингаляции в виде водной суспензии;

- быть восприимчивым к микронизации при сохранении своей полиморфной целостности; и

- препятствовать превращению в Форму 1 в водных суспензиях, предназначенных для применения при ее введении пациентам.

Эксперимент

Сокращения

Любые неопределенные сокращения предназначены для передачи их общепринятого значения.

водн.	водный
AUC	площадь под кривой
BW	средняя масса тела группы
конц.	концентрация
ц-гексан	циклогексан
D	длительность воздействия
ДМЭ	1,2-диметоксиэтан
ДМСО	диметилсульфоксид
ДСК	дифференциальная сканирующая калориметрия
Et ₂ O	диэтиловый эфир
EtOH	этанол
Эксп	эксперимент
Выпар	выпаривание
¹ H-ЯМР	протонный ядерный магнитный резонанс (спектроскопия)
ВЭЖХ	жидкостная хроматография высокого давления
<i>i</i> -BuOH	<i>изо</i> -бутанол (2-метил-1-пропанол)
IPA	<i>изо</i> -пропиловый спирт (2-пропанол)
K ₂ EDTA	дикалиевая этилендиаминтетрауксусная кислота
KF	Карл Фишер (титрование)
ЖХ-МС/МС	жидкостная хроматография-танDEMная масс-спектрометрия
ЖГХ	жидкостно-газовая хроматография
2-МЭ	2-метоксиэтанол
MeCN	ацетонитрил

МЭК	метилэтиловый кетон
MeNO ₂	нитрометан
МИБК	метилизобутиловый кетон
мин	минута(ы)
ММАД	Масс-медианный аэродинамический диаметр
МТБЭ	метил <i>трет</i> -бутиловый эфир
н/п	не применимо
NMP	<i>N</i> -метилпирролидон
№	номер
ПСМ	поляризованная светловая микроскопия
PrOAc	пропилацетат
ОВ	относительная влажность
ОСО	относительное стандартное отклонение
КТ	комнатная температура
ОФ	обращенная фаза
ТБМЭ	третичный бутилметиловый эфир
темп	температура
ТГА	термо-гравиметрический анализ
ТГФ	тетрагидрофуран
об	объем(ы)
SC	монокристал
ТБМЭ	<i>трет</i> -бутилметиловый эфир
сек	секунда(ы)
СВЭЖХ	сверхэффективная жидкостная хроматография
ПТ	переменная температура
РПД	рентгеновская порошковая дифракция (кристаллография)

Инструменты и методика

Следующие описания инструментов, методик и процедур относятся к экспериментам, которые проводились в ряде различных лабораторий и мест, что требует использования множества одинаковых, эквивалентных по своему эффекту. Специалистам в данной области техники будет понятно, что многие такие параметры могут варьироваться без ущерба для желаемого результата. Таким образом, несмотря на то, что такие инструменты, методики и способы, описанные ниже, использовались в некоторых обстоятельствах, они также представляют собой примерные экспериментальные условия, которые можно

использовать для практического применения настоящего изобретения. Таким образом, инструменты, методики и способы, которые следуют, никоим образом не должны рассматриваться как ограничивающие настоящее изобретение.

Рентгеновская порошковая дифракция

Рентгеновские порошковые дифрактограммы получали на дифрактометре PANalytical с использованием Cu K α -излучения (45 кВ, 40 мА), θ - θ гониометра, фокусирующего зеркала, дивергентной щели (1/2 дюйма), соллеровских щелей как на падающем, так и на расходящемся луче (4 мм) и детекторе PIXcel. Для сбора данных использовалось программное обеспечение X'Pert Data Collector, версия 2.2f и данные были представлены с помощью X'Pert Data Viewer, версия 1.2d. РПД получали в условиях окружающей среды с помощью предметного столика для образца из пропускающей фольги (полиимид-каптон, пленка толщиной 12,7 мкм) в условиях окружающей среды с использованием PANalytical X'Pert PRO. Диапазон сбора данных составлял 2,994-35°2 θ со скоростью непрерывного сканирования 0,202 с⁻¹.

Альтернативно, порошковые рентгеновские дифрактограммы получали на дифрактометре Bruker AXS C2 GADDS с использованием Cu K α -излучения (40 кВ, 40 мА), с использованием автоматизированного предметного столика с направлением движения по осям XYZ, лазерного видеомикроскопа для автоматического позиционирования образца и двумерного площадного детектор HiStar. Рентгеновская оптика состояла из одного многослойного зеркала Гебеля, соединенного с коллиматором с точечным отверстием 0,3 мм. Ежедневную проверку производительности осуществляли с использованием сертифицированного стандарта NIST 1976 Corundum (плоская пластина). Расхождение пучка составляла приблизительно 4 мм. Использовали режим непрерывного сканирования θ - θ с расстоянием от образца до детектора 20 см, что обеспечило эффективный диапазон 2 θ 3,2°-29,7°. Обычно образцы подвергались воздействию рентгеновского луча в течение 120 секунд. Для сбора данных использовалось программное обеспечение GADDS для XP/2000 4.1.43, и данные анализировали и представляли с помощью *DiffraC Plus* EVA v15.0.0.0.

Образцы, анализированные в условиях окружающей среды, получали в виде плоских образцов с использованием порошка в том виде, в котором он был получен, без измельчения. Приблизительно 1-2 мг образца слегка прижимали к предметному стеклу для получения плоской поверхности. Образцы, анализированные в условиях отличных от окружающей среды, устанавливались на кремниевой пластине с теплопроводным компаундом. Затем образец нагревали до соответствующей температуры со скоростью 20°С/мин и затем выдерживали изотермически в течение 1 мин перед началом сбора

данных.

Рентгеновские порошковые дифрактограммы получали на дифрактометре Bruker D8 с использованием Cu K α излучения (40 кВ, 40 мА), гониометра θ -2 θ , расхождения V4 и приемных щелей, Ge-монокроматора и детектора Lynxeye. Прибор проверяли на работоспособность с использованием сертифицированного стандарта Corundum (NIST 1976). Для сбора данных использовалось программное обеспечение *Diffraction Plus XRD Commander v2.6.1* и данные анализировали и представляли с помощью *Diffraction Plus EVA v15.0.0.0*.

Образцы анализировали в условиях окружающей среды в виде плоских образцов с использованием порошка в том виде, в котором он был получен. Образец аккуратно помещали в полость, вырезанную из полированной кремниевой пластины с нулевым фоном (510). Во время анализа образец вращался в своей плоскости. Данные собирали следующим образом:

Угловой диапазон: От 2° до 42° 2 θ

Размер шага: 0,05° 2 θ

Время сбора: 0,5 сек/шаг

Рентгеновская кристаллография с алмазным источником света

Данные получали на 3-кружном дифрактометре Fluid Film Devices с использованием детектора Dectris Pilatus 2M. Кристалл устанавливали в петлю MiTeGen с использованием перфторполиэфирного масла. Используемая длина волны составляла 0,6889 Å. Все данные получали при 295 К. Структуру определяли обычными автоматическими прямыми способами и уточняли методом наименьших квадратов по всем уникальным измеренным значениям F^2 .

¹H ЯМР спектроскопия

Спектры ЯМР получали на приборе Bruker 400 МГц, оборудованном автоматическим пробоотборником и управляемым консолью DRX400. Автоматизированные эксперименты получали с использованием ICON-NMR v4.0.7, работающего с Topspin v1.3, с использованием стандартных экспериментов Bruker с нагрузкой. Для нестандартной спектроскопии данные получали с использованием только Topspin. Образцы получали в ДМСО- d_6 , если не указано иное. Автономный анализ проводили с помощью ACD Spectrum Processor 2012.

Дифференциальная сканирующая калориметрия

Данные ДСК получали на приборе TA Instrument Q2000, оснащенном автоматическим пробоотборником на 50 позиций. Калибровку теплоемкости проводили с использованием

сапфира и калибровку энергии и температуры проводили с использованием сертифицированного индия. Обычно 0,5-3 мг образца, содержащегося в алюминиевом поддоне с точечным отверстием, нагревали со скоростью 10°C/мин от 25°C до 300°C (для низких скоростей сканирования) или со скоростью 40°C/мин от 25°C до 300°C (для высоких скоростей сканирования). Над образцом поддерживали продувку сухим азотом со скоростью 50 мл/мин. Программным обеспечением для управления прибором было Advantage for Q Series v2.8.0.394 и Thermal Advantage v5.5.3, и данные анализировали с помощью Universal Analysis v4.5A.

Термо-гравиметрический анализ

Данные ТГА получали на приборе TA Instrument Q500 TGA, оснащенном автоматическим пробоотборником на 16 позиций. Прибор был откалиброван по температуре с использованием сертифицированного алюминия и никеля. Обычно 5-10 мг образца загружали в предварительно тарированный алюминиевый поддон ДСК и нагревали со скоростью 10°C/мин от температуры окружающей среды до 350°C. Над образцом поддерживали продувку азотом со скоростью 60 мл/мин. Программным обеспечением для управления прибором было Advantage for Q Series v2.5.0.256 и Thermal Advantage v5.5.3, и данные анализировали с помощью Universal Analysis v4.5A.

Определение химической чистоты с помощью ВЭЖХ

Анализ чистоты осуществляли на системе серии Agilent HP1100, оснащенной детектором с диодной матрицей, с использованием программного обеспечения ChemStation vB.04.03. Образцы получали растворением в водном растворе MeCN (смесь 1:1) при нагревании до 50°C с получением раствора с концентрацией 0,5 мг/мл. Образцы анализировали с использованием параметров, приведенных ниже (**Таблица 2**).

Таблица 2: Параметры ВЭЖХ/Способ определения химической чистоты.

Колонка	Supelco Ascentis Express C18
Параметры колонки	100 x 4,6 мм x 2,7 мкм
Температура колонки	25°C
Вводимый объем	5 мкл
Длина волны обнаружения	255 нм
Скорость потока	2 мл/мин
Фаза А	0,1% ТФУ в воде
Фаза В	0,085% ТФУ в MeCN

График градиентного элюирования		
Время (мин)	% Фаза А	% Фаза В
0	95	5
6	5	95
6,2	95	5
8	95	5

Получение полиморфных Формы 1 и Формы 2

Ссылка на «неочищенный исходный материал» в настоящем документе означает Форму 3, которая была синтезирована и выделена в соответствии с любым из способов, описанных выше. Репрезентативная эталонная кривая РПД данного материала показана на **Фиг. 7** и соответствует материалу с низкой кристалличностью.

Получение микронизированной Формы 1 путем перекристаллизации из водного ацетона (5% H₂O по объему).

Образец исходного неочищенного материала (100 г, Форма 3) суспендировали в смеси 5% воды в ацетоне (1,00 л), добавляли затравку Формы 1 (100 мг) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Суспензию фильтровали и осадок на фильтре промывали смесью 5% воды в ацетоне (20 мл) и твердые вещества сушили при 40°C с получением полиморфной Формы 1 в виде белого порошка (85,5 г, выход 85,5%, чистота 98,7% по ВЭЖХ), как определено по кривой ДСК (**Фиг. 9**). Микронизация полученного таким образом продукта позволила получить порошок, для которого распределение частиц по размерам, выраженное в значениях D, было следующим: D₁₀ = 0,75 мкм; D₅₀ = 1,59 мкм и D₉₀ = 3,23 мкм. Кривая РПД микронизированного твердого вещества (**Фиг. 10**) подтвердила, что его полиморфная целостность сохранялась во время этого способа.

Получение полиморфной Формы 2 путем выдерживания в МИБК

Неочищенный исходный материал (10 г) суспендировали в МИБК (30 объемов, 300 мл) при комнатной температуре. Суспензию выдерживали при температуре от 25°C до 50°C (цикл нагрева-охлаждения, 8 часов на цикл) в течение 24 часов. Аликвоту отбирали через 3 ч при 50°C, фильтровали, сушили на воздухе и анализировали методом РПД. Через 24 часа оставшееся твердое вещество отфильтровывали при комнатной температуре и сушили на воздухе в течение 2 часов. Полученное твердое вещество было обозначено как полиморфная Форма 2. РПД репрезентативного образца показана на **Фиг. 2**.

Получение микронизированной Формы 2 путем перекристаллизации из ТГФ/ТБМЭ.

Неочищенный исходный материал (476,4 г) помещали в ТГФ (3,82 л) при 45-55°C в

атмосфере азота. Теплый раствор очищали через встроенный фильтр, поддерживая внутреннюю температуру 45-55°C. Добавляли ТБМЭ (0,72 л) по каплям в течение 1,5 часов, поддерживая внутреннюю температуру 45-55°C. Добавляли затравку полиморфной Формы 2 (500 мг) с последующим добавлением по каплям осветленного ТБМЭ (5,01 л) в течение 10,5 часов при 45-55°C. После завершения добавления смесь охлаждали до 0°C в течение 3,5 часов. Перемешивание продолжали при этой температуре еще в течение 7,5 ч, полученную суспензию фильтровали *в вакууме* и твердые вещества промывали смесью осветленного ТГФ (380 мл) и ТБМЭ (570 мл). Осадок на фильтре отсасывали насухо и выделенные твердые вещества сушили в вакууме при 45°C в атмосфере азота в течение 21 часа с получением твердого вещества почти белого цвета (401,4 г, 84,2%), которое согласно анализам РПД и ДСК было подтверждено как полиморфная Форма 2 (Фиг. 11 и 12 соответственно).

Микронизация полученного таким образом продукта позволила получить порошок, для которого распределение частиц по размерам, выраженное в значениях D , было следующим: $D_{10} = 0,42$ мкм; $D_{50} = 1,24$ мкм и $D_{90} = 3,57$ мкм. Специалистам в данной области техники будет понятно, что эти характеристики подходят для продукта, предназначенного для введения путем ингаляции. Сохранение полиморфной целостности во время микронизации было подтверждено кривыми РПД, полученными после измельчения (Фиг. 13), которые не показывают значительных изменений по сравнению с данными, полученными до уменьшения размера частиц (Фиг. 11). Таким образом, полиморфная Форма 2 чувствительна к процессу микронизации и устойчива к нему, что необходимо для получения материала со свойствами, необходимыми для его предполагаемой цели.

Характеристика полиморфной Формы 1 и Формы 2

Рентгеновская порошковая кристаллография

Следы РПД с высоким разрешением полиморфной Формы 1 (Фиг.1) и Формы 2 (Фиг.2), которые были получены способами, описанными в настоящем документе, отчетливо показывают разные дифрактограммы, характерные для двух альтернативных твердых форм. Установлено, что экспериментально полученные закономерности согласуются с рассчитанными по данным, полученным на синхротронном источнике (Фиг. 5 и 6 соответственно), из которых были получены кристаллические структуры. Сравнение двух дифрактограмм (Фиг. 3 и 4) демонстрирует надежность анализа РПД для определения полиморфной природы данного образца. Значения 2θ (в градусах), d -интервал и относительная интенсивность пиков, полученные из их соответствующих кривых РПД, которые характеризуют полиморфные Формы 1 и 2, приведены в таблице ниже (Таблица

3).

Таблица 3: Пики рентгеновской порошковой дифракции для полиморфных Форм 1 и 2 Соединения I.

Форма 1			Форма 2		
2θ Значение	d-интервал (Å)	Относительная интенсивность (%)	2θ Значение	d-интервал (Å)	Относительная интенсивность (%)
5,06	17,46	12,95	5,37	16,44	4,84
5,65	15,65	6,09	10,75	8,23	16,17
6,99	12,64	12,06	11,54	7,67	8,23
7,35	12,02	5,80	11,85	7,47	3,04
7,91	11,18	6,55	12,77	6,93	3,63
8,15	10,85	3,43	14,41	6,15	2,05
10,17	8,70	21,46	15,88	5,58	8,28
11,13	7,95	2,80	16,19	5,48	3,95
11,60	7,63	7,57	16,61	5,33	94,97
12,84	6,89	2,75	17,02	5,21	22,15
13,11	6,75	3,15	17,45	5,08	10,17
14,51	6,10	3,51	17,91	4,95	3,92
15,28	5,80	2,80	18,72	4,74	22,45
15,88	5,58	2,71	19,08	4,65	31,18
16,28	5,45	10,51	19,52	4,55	24,12
16,66	5,32	25,57	20,05	4,43	7,78
17,49	5,07	13,92	20,29	4,38	13,83
17,85	4,97	37,53	21,28	4,18	82,09
18,17	4,88	14,59	21,66	4,10	73,31
18,82	4,71	10,26	22,00	4,04	21,08
19,38	4,58	13,53	22,38	3,97	38,28
19,70	4,51	100,00	22,65	3,93	100,00
20,43	4,35	8,01	23,16	3,84	7,67
20,83	4,26	8,72	23,43	3,80	9,21
21,26	4,18	6,69	23,89	3,73	8,79

21,53	4,13	6,81	24,43	3,64	11,18
21,00	4,04	13,99	24,94	3,57	12,45
22,52	3,95	14,36	25,20	3,53	8,40
22,87	3,89	5,00	25,89	3,44	8,37
23,32	3,81	21,62	26,56	3,36	36,79
24,20	3,68	15,27	26,88	3,32	25,43
24,67	3,61	12,85	27,35	3,26	7,51
25,00	3,56	2,49	27,83	3,21	6,36
25,46	3,50	1,14	28,23	3,16	3,86
25,90	3,44	1,80	30,37	2,94	1,53
26,26	3,39	2,58	31,04	2,88	1,93
26,69	3,34	12,65	31,78	2,82	2,51
27,44	3,25	8,81	32,92	2,72	3,62
28,10	3,18	4,18	33,30	2,69	3,08
28,37	3,15	3,22	34,23	2,62	1,65
29,50	3,03	1,69			
30,52	2,93	0,62			
31,07	2,88	0,51			
31,70	2,82	0,80			
32,77	2,73	0,29			
33,10	2,71	0,32			
33,83	2,65	0,95			
34,15	2,63	1,52			

Определение структуры Форм 1 и 2 с помощью рентгеновской кристаллографии с синхротронным источником света

Определение структуры полиморфных Форм 1 и 2 проводили в Diamond Light Source, Оксфордшир, Великобритания. Данные из Формы 1 получали из монокристалла $7 \times 12 \times 140$ мкм на линии пучка I19. Кристаллические данные и параметры уточнения структуры для кристаллической полиморфной Формы 1 приведены ниже (**Таблица 4**), и изображение полученной структуры, просматриваемой вдоль ее оси а, включено в настоящий документ (**Фиг. 14**).

Таблица 4: Кристаллические данные и параметры уточнения структуры для полиморфной Формы 1.

Эмпирическая формула	$C_{38} H_{37} F_3 N_6 O_3$
Молекулярная масса	682,73
Температура	295(2) К
Длина волны	0,6889 Å
Кристаллическая система	Орторомбическая
Пространственная группа	P 21 21 21
Параметры элементарной ячейки	$a = 16,7962(3) \text{ Å} \quad \alpha = 90^\circ$
	$b = 23,5841(6) \text{ Å} \quad \beta = 90^\circ$
	$c = 25,5756(6) \text{ Å} \quad \gamma = 90^\circ$
Объем	10131,1(4) Å ³
Z	12
Плотность (рассчитанная)	1,343 мг/м ³
Коэффициент абсорбции	0,059 мм ⁻¹
F(000)	4296
Размер кристалла	7 x 12 x 140 мкм
Тета-диапазон для сбора данных	1,406 до 24.226°

Данные для Формы 2 получали из монокристалла $5 \times 5 \times 50$ мкм на линии пучка I19. Кристаллические данные и параметры уточнения структуры для кристаллической полиморфной Формы 2 приведены ниже (**Таблица 5**), и изображение полученной структуры, просматриваемой вдоль ее оси b, включено в настоящий документ (**Фиг. 15**).

Таблица 5: Кристаллические данные и параметры уточнения структуры для полиморфной Формы 2.

Эмпирическая формула	$C_{38} H_{37} F_3 N_6 O_3$
Молекулярная масса	682,73
Температура	295(2) К
Длина волны	0,6889 Å
Кристаллическая система	Моноклинная
Пространственная группа	P 21
Параметры элементарной ячейки	$a = 16,8148(7) \text{ Å} \quad \alpha = 90^\circ$
	$b = 5,6467(2) \text{ Å} \quad \beta = 101,540(3)^\circ$
	$c = 35,5556(11) \text{ Å} \quad \gamma = 90^\circ$

Объем	3307,7(2) Å ³
Z	4
Плотность (рассчитанная)	1,371 мг/м ³
Коэффициент абсорбции	0,060 мм ⁻¹
F(000)	1432
Размер кристалла	5 x 5 x 50 мкм
Тета-диапазон для сбора данных	1,133 до 24.246°

Соотношения термодинамической стабильности

Термодинамическая стабильность полиморфных Форм 1 и 2 при различных температурах

Смесь равных количеств Форм 1 и 2 (100 мг) загружали в пробирки для кристаллизации с последующим добавлением выбранного растворителя. Суспензии нагревали до указанных температур (Таблица 6) в течение 72 часов, в течение которых образцы отбирали с 24-часовыми интервалами. Твердые вещества выделяли при температуре выдерживания путем фильтрации и затем сушили *в вакууме* при 45°C в течение 20 часов. В двух случаях (Таблица 6, Данные 1 и 2) суспензии, содержащие Форму I, выдерживали при 135°C с 24-часовой временной точки до завершения эксперимента. В остальных случаях (Таблица 6, Данные 4-6) растворы образовывались через 72 часа и твердые вещества извлекались путем легкого охлаждения, и все они были определены как Форма 1. Все те, которые выдерживали при более низких температурах, давали Форму 2 в течение 24 часов.

Таблица 6: Анализ РПД суспензий Форм 1 и 2, выдержанных при различных температурах.

Исходное вещество	Растворитель	Полиморф, полученный при указанной температуре ^a (°C)		
		50	70	135
1	ксилены	2	2	1
2	мезитилен	2	2	1
3	дифениловый эфир	2	2	1 ^b
4	декалин	2	2	1 ^b
5	гептанол	2	2	1 ^b
6	п-кумен	2	2	1 ^b

Сноски: **а.** По данным анализа РПД через 72 часа; **б.** Растворение происходило при этой температуре; твердое вещество, полученное при легком охлаждении.

Профилирование с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии

Исследования ДСК проводились по способам, описанным выше.

Образец исходного неочищенного материала чистотой 98,4% подвергали дифференциальной сканирующей калориметрии, которая показала ряд тепловых явлений при нагревании образца. Небольшая эндотерма при 166°C предшествовала второй, более значительной эндотерме при 180°C, за которой почти сразу следовала экзотерма при ~183°C и конечная эндотерма при ~201°C (см. **Фиг. 8**). Данные анализы показывают, что происходит ряд термически индуцированных превращений, во время которых исходный слабокристаллический материал (Форма 3) превращается в полиморфную Форму 2 (т.пл. 180-185°C), которая затем плавится и превращается в Форму 1 (т.пл. 201-202°C).

Для получения точного значения теплоты плавления (ΔH_f) полиморфной Формы 1 и полиморфной Формы 2 использовали быстрое сканирование ДСК (с использованием скорости нагрева 40 °C/мин) для исключения рекристаллизации Формы 1 из расплава Формы 2, который возникает при более низких скоростях сканирования (10 C/мин). Повторный анализ ($n = 10$) тех же образцов полиморфов показал, что Формы 1 и 2 имеют средние теплоты плавления 72,28 Дж/г и 77,15 Дж/г соответственно (**Таблица 7**).

Таблица 7: Данные слияния из кривых быстрого сканирования ДСК для Форм 1 и 2.

Полиморф	Начальная температура °C (% ОСО)	Пиковая температура °C (% ОСО)	Линейная энтальпия Дж/г (% ОСО)
Форма 1	202,6 (0,08)	203,5 (0,10)	72,28 (0,89)
Форма 2	182,6 (0,05)	183,7 (0,12)	77,15 (0,61)

Фигура 16 содержит кривую ДСК быстрого сканирования данного образца полиморфной Формы 1 и показывает, что он имеет точку плавления 202,6°C. Аналогично, на **Фигуре 17** показана кривая ДСК быстрого сканирования данного образца полиморфной Формы 2 и показывает, что данная форма имеет точку плавления 182,6°C.

Правила Бургера и Рамбургера (1979) гласят, что «если форма с более высокой температурой плавления имеет более низкую теплоту плавления, две формы обычно энантиотропны, в противном случае они монотропны». Анализ ДСК нескольких партий

подтвердил, что теплота плавления **Формы 1** была сильно меньше, чем у **Формы 2**, из чего можно сделать вывод, что полиморфные **Формы 1** и **2** энантиотропно связаны. Отсюда следует, что **Форма 2** является более термодинамически стабильным состоянием (имеет наименьшую свободную энергию Гиббса) от абсолютного нуля до точки перехода, которая является температурой, при которой **Формы 1** и **2** имеют равную термодинамическую стабильность. Выше данной температуры перехода полиморфная **Форма 1** является более термодинамически предпочтительной, пока не будет достигнута ее точка плавления.

Термо-гравиметрический анализ (ТГА)

ТГА-профилирование проводили в соответствии с описанными выше способами и использовали для определения количества остаточных растворителей, связанных с полиморфами Соединения **I**. Кроме того, его использовали для измерения количества растворителя, выделившегося при нагревании из сольватированных форм Соединения **I**. Типичные уровни остаточного растворителя, обнаруженные в образцах полиморфов Соединения **I**, следующие.

Полиморфная **Форма 1**, полученная из толуола, показал снижение веса на 0,3% мас./мас. при нагревании от 25 до 120°C, что согласуется с потерей 0,1 моля воды. Разложение было очевидным при 320°C (данные не показаны).

Образец **Формы 2**, полученный из EtOH, показал снижение массы на 0,2% мас./мас. в диапазоне от 25 до 150°C, приписываемое потере 0,03 моля EtOH. Разложение соединения **I** началось при 320°C. Полиморфный материал **Формы 2**, выделенный из МИБК, не показал потери массы до тех пор, пока образец не начал разлагаться при 320°C (**Фиг. 18**). Потеря сольвата анизола составила 13,4% мас./мас. при нагревании образца от 25 до 160°C (данные не показаны).

Эксперименты с суспендированием и перекрестной затравкой

Получали смесь **Форм 1** и **2** (50% мас./мас.) и затем образец смеси (20 мг) суспендировали в системе растворителей (50 объемов, 1,0 мл) и встряхивали при различных температурах в течение 96 часов. Твердые вещества отфильтровывали, сушили на воздухе и анализировали способом РПД. Полученные результаты (**Таблица 8**) показывают, что во всех исследованных системах, кроме одной (**Данные 10-12**), смесь полиморфных форм превращалась в **Форму 2** при выдерживании как при комнатной температуре, так и при 50°C. Превращение в пропилацетате оказалось особенно легким, поскольку **Форму 2** также выделили из суспензии, которую выдерживали при 5°C (**Данные 1**). Примечательно, что конверсия происходила не только в данном растворителе и в ТБМЭ (**Данные 4-6**), но также и в ароматическом растворителе толуоле (**Данные 7-9**), который ранее доставлял **Форму 1** из неочищенного входного материала (**Форма 3**). Было обнаружено, что материал,

извлеченный из водного раствора изопропилового спирта, представляет собой смесь обеих форм (Данные 10–12).

Таблица 8: Эксперименты по перекрестной затравке Форм 1 и 2 при 5°C, 25°C и 50°C.

Исходное вещество	Система Растворителя	Температура °C	Полиморфная форма по РПД
1	PrOAc	5	2
2		25	
3		50	
4	ТБМЭ	5	1 и 2
5		25	2
6		50	
7	Толуол	5	1 и 2
8		25	2
9		50	
10	IPA:	5	1 и 2
11	Вода	25	
12	(5%)	50	

Сноска: Все образцы оставались в виде суспензий во время дозревания.

Это наблюдение позволяет предположить, что либо растворимость Соединения I в данной системе растворителей слишком низка для полного превращения, либо данные условия по сути менее благоприятны для превращения Формы I в Форму 2. Чтобы определить влияние воды на выход из таких экспериментов по кондиционированию, поведение полиморфной Формы 2 исследовали в номинально сухой органической среде, и также в монофазных, водных смесях со смешиваемыми с водой растворителями.

Когда твердую Форму 2 суспендировали в гептане, ТБМЭ, толуоле или в циклогексане в качестве единственного растворителя, как при 25, так и при 50°C в течение 24 часов, заметного изменения кристаллической структуры не происходило. Такой же результат был также получен, когда кондиционирующей средой был чистый ацетон (Таблица 9, Данные 1 и 6) или только вода (Таблица 9, Данные 5 и 10). Однако в смесях ацетон-вода при 50°C в течение 24 часов было четкое доказательство того, что в двух случаях Форма 2 превращалась в Форму 1 (Таблица 9, Данные 7 и 9). Данный результат

был неожиданным, учитывая, что данное полиморфное Соединение I является метастабильным в данном диапазоне температур по сравнению с Формой 2.

Таблица 9: Поведение Формы 2, суспензированной в ацетоне, воде и смесях ацетон/вода.

Исходное вещество	Содержание воды (об.%)	Температура (°C)	Полиморфная форма по РПД	
			1 и 4 ч	24 ч
1	0	25	2	2
2	10		2	2
3	20		2	2
4	40		2	2
5	100		2	2
6	0	50	2	2
7	10		2	1
8	20		2	2
9	40		2	1
10	100		2	2

Для исследования общего характера этого непредвиденного превращения аналогичный эксперимент проводили в ТГФ и в смесях ТГФ/вода. В соответствии с данными, описанными выше, было обнаружено, что инкубация Соединения I в виде полиморфной Формы 2 только в ТГФ при 25 и 50°C в течение по меньшей мере 4 часов не влияла на полиморфную композицию смеси. Однако добавление воды показало выраженное действие на конверсию полиморфной Формы 2 в Форму 1, которое наблюдалось как при более низкой, так и при более высокой температуре (**Таблица 10**). При 25°C смеси, содержащие 10% и 20% воды, возвращались в Форму 1 через 4 и 24 часа соответственно (**Таблица 10, Данные 2 и 3**). Поразительно, что при 50°C все водные смеси ТГФ приводили к образованию кристаллической формы Формы 1 (**Таблица 10, Данные 6-8**).

Таблица 10: Поведение Формы 2, суспендированной в ТГФ и смесях ТГФ/вода.

Исходное вещество	Содержание воды (об.%)	Темпе- ратура (°C)	Полиморфная форма по РПД		
			1 ч	4 ч	24 ч
1	0	25	2	2	н.д.
2	10		2	1	1
3	20		2	2	1
4	40		2	2	2
5	0	50	2	2	н.д.
6	10		1	1	1
7	20		1	1	1
8	40		1	1	1

Сноска: н.д. означает, что не определено (данные не собраны)

Очевидно, что присутствие воды вызывает описанный выше полиморфный переход. Однако, за исключением низких концентраций, вода является сильным антирастворителем в этих системах и заметно снижает растворимость лекарственного вещества в водной смеси растворителей по мере увеличения ее доли. Следствием такого профиля растворимости является то, что в одной воде или в смесях растворителей, богатых водой, процесс перехода от Формы 2 к Форме 1 либо вообще не происходит, либо ингибируется предельной растворимостью, особенно при температуре окружающей среды. В случае ацетона и особенно в ТГФ повышение температуры повышает растворимость исходной Формы 2 и ускоряет ее превращение в Форму 1.

Аналогичный показательный характер взаимного превращения получали в эксперименте, в котором Форму 2 суспендировали в различных смесях диоксана и воды при температуре окружающей среды и повышенной температуре (**Таблица 11**). В присутствии 10% воды полиморфная Форма 1 проявляется в суспензионной смеси в течение часа при 25°C. Однако, когда содержание воды повышается до 40%, переход замедляется до такой степени, что только образец, взятый через 24 часа, обнаруживает присутствие Формы 1. Аналогично ведет себя данная тройная система при 50°C. Однако при более высокой температуре 65°C скорость превращения увеличивается, так что Форма 1 образуется через

3 часа. В соответствии с данными, полученными в описанных выше экспериментах, увеличение доли воды до 80% в данной системе было достаточным для прекращения полиморфного взаимопревращения при 25°C, 50°C и даже при 65°C.

Таблица 11: Поведение Формы 2, суспензированной в смеси 1,4-диоксан/вода.

Исходное вещество	1,4 диоксан % воды	Температура °C	Полиморфная форма по РПД			
			1 ч	3 ч	6 ч	24 ч
1	10	25	1 [†]	1 [†]	1 [†]	1 [†]
2	40		2	2	2	1
3	80		2	2	2	2
4	10	50	-	-	-	1
5	40		2	2	2	1
6	80		2	2	2	2
7	40	65	2	1	1	1
8	80		2	2	2	2

† След Формы 2 остался

Взаимодействие природы органического растворителя, присутствия случайной воды и температуры суспензии (и предполагаемого времени контакта) выявляли путем дозревания твердого вещества Формы 2 в МЭК, в котором содержание воды постепенно увеличивалось от 1 до 8% по объему как при 25, так и при 50°C (**Таблица 12**). Было обнаружено, что целостность Формы 2 сохранялась в течение по меньшей мере 24 часов при более низкой температуре до тех пор, пока содержание воды не превышало 6%, несмотря на увеличение растворимости Соединения I с 19 до 30 мг/мл (данные не представлены). Как только доля воды достигала 8%, в суспензионной смеси возвращалась полиморфная Формы 1, даже несмотря на то, что растворимость лекарственного средства уменьшалась до 23 мг/мл.

Повышение температуры до 50°C способствовало процессу превращения, так что полиморфное взаимопревращение наблюдалось через 24 часа для смесей, в которых содержание воды превышает 2%. Из этих данных очевидно, что условия окружающей среды, которым подвергается Соединение I, определяют не только то, какой из двух полиморфов, 1 или 2, образуется, но также и скорость, с которой происходит взаимное превращение.

Таблица 12: Поведение Формы 2, суспензированной в смеси МЭК/вода.

Содержание воды (%об.)	Температура °С	Полиморфная форма по РПД
1	25	2
2		2
4		2
6		2
8		1
1	50	2
2		2
4		1
6		1
8		1

Влияние исходной полиморфной композиции на поведение образцов исследовали путем уравнивания либо отдельных полиморфов, либо их равной смеси в безводных МЭК и ТГФ, а также в тех же растворителях с добавлением 5% воды.

Таблица 13: Уравнивание Форм 1 и 2 по отдельности и в виде смесей в МЭК и ТГФ по отдельности и в присутствии воды.

Исходное вещество	Растворитель	Форма по РПД	
		Входной материал	Продукт Уравнивание ^а
1	МЭК	1	1
2		2	2
3		1 + 2	2
4	ТГФ	1	1 ^б
5		2	2
6		1 + 2	2
7	МЭК/	1	1

8	5% Вода	2	2
9		1 + 2	1
10	ТГФ/	1	1
11	5% Вода	2	1
12		1 + 2	1

а. Результаты при обеих температурах уравнивания одинаковы, если не указано иное. **б.** Некоторые свидетельства присутствия Формы 2 при 10°C.

Полученные результаты (**Таблица 13**) показывают, что в безводной среде две полиморфные модификации сохраняют свою структурную целостность, если они присутствуют поодиночке (**Таблица 13, Данные 1, 2, 4 и 5**). Некоторые незначительные свидетельства превращения наблюдались в ТГФ при 10°C (**Таблица 13, Данные 4**), что может быть связано с наличием следов влаги в высокогигроскопичном растворителе. Однако смеси двух полиморфов превращались в Форму 2 либо в МЭК, либо в ТГФ при обеих температурах (**Таблица 13, Данные 3 и 6**), показывая, что данная форма предпочтительна в безводных или почти безводных условиях.

Результаты, наблюдаемые при примешивании 5% воды к двум растворителям, показывают, что преобладание двух форм в этих условиях меняется на противоположное с учетом кинетических факторов. В водном МЭК (5% воды) отдельные полиморфы снова оставались неизменными на протяжении всего эксперимента (**Таблица 13, Данные 7 и 8**). Напротив, бинарная полиморфная смесь превращалась в Форму 1 в данной среде (**Таблица 13, Данные 9**). В водном ТГФ (5% воды) было особенно очевидно преобладание Формы 1 как наиболее предпочтительного полиморфа. В данной среде суспензия Формы 1 оставалась неизменной (**Таблица 13, Данные 10**), что согласуется с результатом, наблюдаемым для водного МЭК в тех же условиях.

Однако в ТГФ, легированном 5% воды, как суспензия, содержащая бинарную смесь, так и суспензия, состоящая только из полиморфной Формы 2, превращались в суспензии, содержащие только Форму 1 (**Таблица 13, Данные 11 и 12**). Эти данные особенно удивительны, поскольку присутствие воды в качестве второстепенного компонента в этих смесях переопределяет иерархию стабильности, что, как считается, благоприятствует Форме 2, когда она отсутствует. Этот результат является неожиданным, учитывая, что мы описываем в другом месте настоящего документа свидетельства того, что полиморфная Форма 2 является более термодинамически стабильным энантиотропом Соединения I в диапазоне температур (5-10°C) данного эксперимента и ниже температуры по меньшей

мере 70°C.

Сравнительный фармакокинетический профиль Форм 1 и 2 при ингаляционном введении крысам.

Было предпринято исследование для сравнения динамики неизменных концентраций лекарственного средства в плазме после однократной ингаляционной дозы Формы 1 или Формы 2 у крыс.

Самцы крыс ResHan™:WIST были признаны подходящим видом и породой из-за их одобрения регулирующими органами. Ингаляционный путь введения был выбран для имитации условий клинического введения. Всего в исследовании использовали 14 животных (шесть животных в группе с двумя запасными) в возрасте от 10 до 12 недель и массой от 306 до 341 г на момент начала лечения препаратом. Лечение состояло из однократного 2-часового ингаляционного воздействия распыляемой композиции либо микронизированной Формы 1 (чистота 98,94%) для животных Группы 1, либо микронизированной Формы 2 (чистота 98,10%) для животных Группы 2. Фармакокинетические параметры двух полиморфных форм были определены для подтверждения фармакологических и токсикологических исследований на животных и клинических исследований на людях.

Суспензии получали, предварительно приготовив концентрированный раствор поверхностно-активных веществ (смачивающий раствор) и солевой раствор. Затем они использовались для получения носителя. Солевой раствор получают следующим образом. Взвешивали хлорид натрия (50 г) в мерную колбу объемом 5000 мл, доводили водой, перемешивали магнитной мешалкой в течение 10 мин и затем пропускали через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм. Смачивающий раствор получают следующим образом. Взвешивали Lipoid S100 (10 г) в дюрановую бутылку объемом 2000 мл, добавляли 1000 г пропиленгликоля и смесь перемешивали на смесителе Silverson, оснащенном 1-дюймовым ситом с высоким усилием сдвига, в течение 1 мин при 8000 об/мин, а затем пропускали через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм. Носитель получали следующим образом. Смачивающий раствор (500 мл) переносили в мерную колбу объемом 5000 мл, доводили до объема соляным раствором, перемешивали магнитной мешалкой в течение 10 мин и затем пропускали через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм.

Партию 1000 мл суспензии Соединения I с концентрацией 4 мг/мл получали следующим образом. Взвешивали Соединение I (4,00 г) в небольшой химический стакан, добавляли 100 мл смачивающего раствора и смесь перемешивали смесителем Silverson, оснащенным 1-дюймовым ситом с высоким усилием сдвига, в течение 5 мин при 8000

об/мин. Затем смесь переносили в дюрановую бутылку объемом 5000 мл с использованием соляного раствора и перемешивали с помощью смесителя Silverson, оснащенного 1-дюймовым ситом с высоким усилием сдвига, в течение 5 мин при 8000 об/мин, после чего хранили при температуре от 2 до 8°C. Суспензии с более высокой или более низкой концентрацией (диапазон от 0,2 до 20 мг/мл) получали путем регулирования входной массы API в соответствии с требованиями для суспензий с более высоким мг/мл или путем дальнейшего разбавления носителем для суспензий с более низким мг/мл. Все составы перемешивали с помощью магнитной мешалки в течение по меньшей мере 30 минут и перед введением оценивали визуально.

Крыс акклиматизировали к процедуре ингаляционного дозирования в течение трех дней подряд перед введением дозы. Животных обрабатывали испытуемым веществом путем ингаляционного аэрозольного введения в течение 120 мин только через мордочку при целевой концентрации аэрозоля 25,2 мкг/л. Оценки ингаляционной дозы при продолжительности воздействия 2 часа и предполагаемой массе тела 300 г рассчитывались по формуле:

$$\text{Доза (мг/кг/день)} = \frac{C \times \text{RMV} \times D}{\text{BW} \times 10}$$

где: C - концентрация аэрозоля (мкг/л); RMV - минутный объем дыхания (л/мин); D - продолжительность воздействия (120 мин), и BW - средняя групповая масса тела (кг). Сводные данные о средних достигнутых концентрациях аэрозоля, расчетной ингаляционной дозе и распределении частиц по размерам (PSD) представлены ниже. (Таблица 14).

Таблица 14: Концентрации аэрозоля в камере и расчетные вдыхаемые дозы Соединения I, достигаемые при введении аэрозольных ингаляций.

Группа №	Средний аэрозоль Конц (мкг/л)	Расчетное вдыхание Доза (мг/кг)	ММАД (мкм)	σg
1	28,8	2,48	2,3	1,60
2	32,6	2,82	2,2	1,70

Сноски: ММАД. Масс-медианный аэродинамический диаметр; σg. Геометрическое стандартное отклонение

Как показано в **Таблице 14**, целевые концентрации аэрозолей 25,2 мкг/л выбирали для доставки номинальных доз 2,2 мг/кг. Достигали фактической концентрации аэрозоля 28,8 мкг/л Формы 1, что обеспечило расчетную ингаляционную дозу приблизительно 2,48 мг/кг

для животных Группы 1. Концентрация аэрозоля, достигаемая для Формы 2, составляла 32,6 мкг/л, таким образом обеспечивая расчетную ингаляционную дозу приблизительно 2,82 мг/кг для животных Группы 2.

Достигнутые концентрации аэрозолей были близки к целевому значению и расчетные ингаляционные дозы составили 113% и 128% от целевого значения для Групп 1 и 2 соответственно. Распределение частиц по размерам подтвердило, что образующиеся аэрозоли пригодны для вдыхания крысами.

Образцы венозной крови (0,3 мл) отбирали из хвостовой вены животных и образцы собирали после введения дозы (2 часа от начала введения дозы), и затем в моменты времени 3, 4, 6, 8, 12, 24, 28, 32, 36 и 48 часов после обработки. Образцы обрабатывали антикоагулянтом K_2EDTA , центрифугировали при 2000 g в течение 10 минут при 4°C, и затем хранили в замороженном виде (-20°C $\pm$ 10) в ожидании анализа. Затем образцы плазмы анализировали на Соединение I способом ЖГХ с использованием утвержденного способа ЖХ-МС/МС.

Процедуры экстракции и анализа

Образцы плазмы крыс перемешивали на вортексе, отбирали аликвоту объемом 25 мкл и обрабатывали 12,5 мкл рабочего раствора внутреннего стандарта (содержащего 20 нг/мл Соединения 2) и 25 мкл 10 мМ водного раствора формиата аммония. Смесь перемешивали на вортексе в течение 5 минут при 1400 об/мин, после чего добавляли 300 мкл МТВЭ, после чего образец перемешивали в барабане в течение 10 минут. После центрифугирования при 3500 g в течение 5 мин удаляли аликвоту 150 мкл органического слоя и выпаривали досуха в атмосфере азота при 50°C в течение приблизительно 15 мин. Остаток восстанавливали в 100 мкл смеси ацетонитрила и воды (50:50), содержащей 0,1% муравьиной кислоты, и перемешивали на вортексе в течение 5 мин при 1400 об/мин. Образцы, полученные таким образом, затем анализировали с использованием утвержденного способа ЖХ-МС/МС для определения исходной концентрации Соединения I в плазме.

Система ЖХ включала Acquity Binary Solvent Manager, оснащенную аналитической колонкой Acquity UPLC C8 (50 x 2,1 мм), последнюю поддерживали при номинальной температуре 40°C. Образцы анализировали в течение 2,3 мин способом градиентного элюирования (**Таблица 15**) с использованием 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле (подвижная фаза А) и 0,1% муравьиной кислоты в воде (подвижная фаза В) при скорости потока 0,8 мл/мин.

Таблица 15: Профиль градиента элюента для ВЭЖХ.

Время (мин)	%А	%В
0	30	70
0,2	30	70
1,4	95	5
1,9	95	5
2,0	30	70
2,3	30	70

Соединение I использовали в качестве эталонного стандарта и тетрадейтеропроизводное Соединения 2 использовали в качестве внутреннего стандарта. Соединение 2 представляет собой: 4-(4-(4-(((3*R*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-триазол-1-ил)метил)-5-(2,4-дифторфенил)тетрагидрофуран-3-ил)метокси)-3-метилфенил)пиперазин-1-ил)-*N*-(4-фторфенил-2,3,5,6-*d*₄)бензамид.



Все управление прибором, сбор данных, интеграция площади пика и хранение выполнялись с помощью MassLynx (версия 4.1). Отклик масс-спектрометра (отношение площади пика аналита к внутреннему стандарту) каждого калибровочного стандарта рассчитывали с помощью Watson LIMS (версия 7.2) и наносили на график относительно номинальной (полученной) концентрации. Для расчета уравнения калибровочной кривой использовали взвешенный ($1/x^2$) линейный регрессионный анализ методом наименьших квадратов. Концентрации Соединения I в образцах рассчитывали путем обратных вычислений по калибровочным кривым с точностью до 3 значащих цифр. Для дальнейших расчетов использовался Microsoft Excel 2010. Все проценты представлены с точностью до одного десятичного знака.

Фармакокинетический анализ осуществляли в Phoenix WinNonlin. Определяли максимальные средние концентрации в плазме ($C_{\max}$) и время их возникновения ($T_{\max}$). Площади под кривыми зависимости средней концентрации в плазме от времени до времени взятия последнего количественного образца (AUC_t) оценивали по линейному правилу трапеций. Побочных эффектов лекарственного вещества после его введения не наблюдалось, и серийные образцы крови отбирали в течение 48 часов после начала ингаляционного воздействия.

Средние фармакокинетические параметры для двух полиморфов после их ингаляционного введения крысам суммированы в **Таблице 16** и более подробно описаны ниже.

Таблица 16: Средние фармакокинетические параметры Форм 1 и 2 Соединения I после их ингаляционного введения крысам.

Фармакокинетические параметры	Среднее значение	
	Форма 1	Форма 2
Номинальная доза (мг/кг)	2,2	2,2
Расчетная ингаляционная доза (мг/кг)	2,48	2,82
$C_{\max}$ (нг/мл)	4,95	8,59
$T_{\max}$ (ч)	6	6
AUC_t (нг.ч/мл) ^a	122	230
AUC_t нормализованная доза (нг.ч/мл) ^b	122	202
Относительная биодоступность	Эталон (100%)	166%

Сноски: **a.** Оба значения AUC_t составляют 0-48 часов; **b.** AUC_t Формы 2, нормализованная на дозу, достигнутую для Формы 1 (2,48 мг/кг)

Концентрация плазмы

Концентрации лекарственного средства в плазме после ингаляционного введения Форм 1 и 2 оставались поддающимися количественному определению вплоть до 48 ч после начала воздействия для обеих групп и представлены ниже (**Таблицы 17** и **18** соответственно). Полученные из них профили средней концентрации в плазме от времени представлены графически (**Фиг. 19** и **20** для Форм 1 и 2 соответственно).

Таблица 17: Концентрации лекарственного средства в плазме после ингаляционного введения Формы 1 самцам крыс при номинальном уровне дозы 2,2 мг/кг.

Время ч ^a	Концентрация лекарственного средства (нг/мл) у животного по №						Среднее значение	sd
	1	2	3	4	5	6		
IAD	1,16	0,826	1,35	-	-	-	1,11	0,27
3	-	-	-	5,31	4,35	2,41	4,02	1,48
4	4,73	6,32	3,78	-	-	-	4,94	1,28

6	-	-	-	5,38	3,97	5,49	4,95	0,85
8	3,28	NS	2,88	-	-	-	3,08	-
12	-	-	-	4,05	NS	3,64	3,85	-
24	2,47	3,00	3,85	2,75	2,02	3,03	2,85	0,62
28	1,85	2,22	3,92	1,87	NS	2,04	2,38	0,87
32	1,36	1,85	2,79	1,66	2,20	1,32	1,86	0,56
36	1,21	1,36	1,74	1,70	1,01	1,80	1,47	0,32
48	1,10	1,45	1,28	1,26	NS	1,19	1,26	0,13

Сноски: **а.** от начала ингаляционного воздействия; **IAD:** сразу после дозирования; **NS:** нет образца.

Таблица 18: Концентрации лекарственного средства в плазме после ингаляционного введения Формы 2 самцам крыс при номинальном уровне дозы 2,2 мг/кг.

Время ч^а	Концентрация лекарственного средства (нг/мл) у животных по №						Среднее значение	sd
	1	2	3	4	5	6		
IAD	2,24	2,59	3,15	-	-	-	2,66	0,46
3	-	-	-	8,95	5,40	6,01	6,79	1,90
4	7,53	9,31	8,88	-	-	-	8,57	0,93
6	-	-	-	11,8	5,38	NS	8,59	-
8	6,85	5,90	6,79	-	-	-	6,51	0,53
12	-	-	-	10,7	4,57	5,84	7,04	3,24
24	11,5	3,24	4,22	5,26	3,58	3,24	5,17	3,19
28	8,15	3,17	3,32	4,15	2,94	2,93	4,11	2,03
32	7,72	3,50	3,33	4,05	2,75	2,51	3,98	1,91
36	6,28	2,43	2,54	3,59	2,49	2,43	3,29	1,53
48	3,78	1,79	1,89	2,52	1,83	1,91	2,29	0,78

Сноски: **а.** от начала ингаляционного воздействия; **IAD:** сразу после дозирования; **NS:** нет образца.

Средние концентрации Формы 1 в плазме (Группа 1) увеличивались до максимума

через 6 часов после начала воздействия и затем неуклонно снижались до момента последнего отбора проб через 48 часов после начала воздействия. Среднее значение $C_{\max}$ составляло 4,95 нг/мл, и среднее значение AUC_t составляло 122 нг.ч/мл для Формы 1. Средние концентрации Формы 2 в плазме увеличились до максимума через 6 часов после начала воздействия и затем неуклонно снижались до 48 часов после начала воздействия. Среднее значение $C_{\max}$ составляло 8,59 нг/мл, и среднее значение AUC_t составляло 230 нг.ч/мл для Формы 2. Оба полиморфа имели сходные значения $T_{\max}$, но индивидуальные средние концентрации в плазме были выше во все 11 раз в группе крыс, получавших Форму 2, по сравнению с данными для Формы 1. Следовательно, нормализованные по дозе значения $C_{\max}$ и AUC_t были в 1,5 и 1,7 раза выше, соответственно, для Формы 2.

Относительная биодоступность

Относительную биодоступность (ОБ) двух полиморфов после ингаляционного введения рассчитывали по формуле:

$$\text{ОБ} = \frac{AUC_t(\text{Форма 2})}{AUC_t(\text{Форма 1})} \times \frac{\text{достигнутая доза (Форма 1)}}{\text{достигнутая доза (Форма 2)}}$$

Нормализованные по дозе значения AUC_t для полиморфной Формы 2 (**Таблица 16**) указывают на относительную биодоступность 166% относительно Формы 1 после ингаляционного введения крысам.

Это исследование показывает, что обе кристаллические формы были системно доступны при ингаляционном пути и что воздействие сохранялось в течение периода до 48 часов после начала введения. Однако следует отметить, что Форма 2 (**Фиг. 20**) давала последовательно более высокие системные концентрации лекарственного средства в течение 48 ч фармакокинетического профиля, чем Форма 1 (**Фиг. 19**). Нормализованные по дозе значения $C_{\max}$ и AUC_t для полиморфной Формы 2 приблизительно в 1,5 и 1,7 раза выше соответственно, чем для Формы 1.

Ввиду ее превосходной биодоступности можно ожидать, что полиморфная Форма 2 будет полезна при лечении микозов, при которых требуется быстрое растворение и амплификация концентрации лекарственного средства в месте терапевтического действия. В водной суспензии предотвращается переход Формы 2 в Форму 1, хотя считается, что Форма 2 является метастабильной в данной среде, как обсуждалось выше. Следовательно, полиморфная Форма 2 особенно подходит для введения путем ингаляции в виде водной суспензии.

Также можно ожидать, что Форма 1 будет полезна при лечении микозов, о чем свидетельствует системная биодоступность данной полиморфной формы. Кроме того, можно ожидать, что полиморфная Формы 1 будет полезна в составах, отличных от водных

суспензий, таких как кремы и пессарии. Такое введение может быть полезным для предотвращения микозов у лиц, подверженных риску инфицирования микозами, такими как микозы, поражающие кожу и другие участки, которое можно вводить местно.

Сводка данных

В заявке описаны две новые полиморфные формы Соединения I: Форма 1 и Форма 2. Обе формы имеют хорошую термическую стабильностью, о чем свидетельствуют их высокие температуры плавления (см. **Таблицу 7**). Кроме того, оба полиморфа имеют приемлемую биодоступность при введении в виде водной суспензии путем ингаляции, хотя у Формы 2 она заметно выше, чем у Формы 1 (см. данные относительной биодоступности, представленные выше). Обе кристаллические формы поддаются микронизации для получения распределения частиц по размер, совместимого с ингаляционным введением (см. **Фиг. 10 и 13**). Ожидается, что полиморфная Форма 1 будет особенно подходящей для использования в составах, отличных от водных суспензий. Полиморфная Форма 2 особенно подходит для использования в составах водной суспензии, таких как те, которые предназначенные для введения путем ингаляции.

Во всем описании и последующей формуле изобретения, если контекст не требует иного, слово «содержать» и варианты, такие как «содержит» и «содержащий», будут пониматься как подразумевающие включение указанного целого числа, стадии, группы целых чисел, или группы стадий, но не исключая любого другого целого числа, стадии, группы целых чисел или группы стадий.

Все патенты, патентные заявки и ссылки, упомянутые в описании настоящего изобретения, включены в настоящее описание посредством ссылки во всей их полноте.

Изобретение охватывает все комбинации предпочтительных и более предпочтительных групп и подходящих и более подходящих групп и вариантов реализации групп, указанных выше.

Ссылки

Burger A. and Ramburger R. On the polymorphism of pharmaceuticals and other molecular crystals. I Theory of Thermodynamic Rules. *Mikrochim. Acta*, 1979, **72**, 259-271.

Sunose M., Colley T.C., Ito K., Rapeport G. and Strong P. WO 2016/087878, 9 Jun 2016; PCT/GB2015/053731 A1, 4 Dec 2015.

Colley T.C., Ito K., Rapeport G., Strong P., Murray P.J., Onions S.T. and Sunose M., WO 2016/087880 A1, 9 Jun 2016; PCT/GB2015/053733, 4 Dec 2015.

Colley T., Sehra G., Daly L., Kimura G., Nakaoki T., Nishimoto Y., Kizawa Y., Strong P., Rapeport G. and Ito K. Antifungal synergy of a topical triazole, PC945, with a systemic triazole against respiratory *Aspergillus fumigatus* infection. *Nature Scientific Reports*, 2019, **9**:9482.

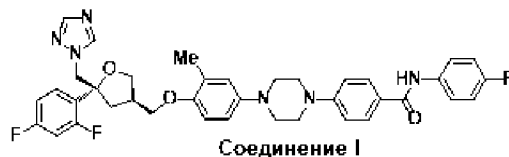
Colley T., Alanio A., Kelly, S.L., Sehra G., Kizawa Y., Warrilow A.G.S., Parker J.E., Kelly D.E., Kimura G., Anderson-Dring L., Nakaoki T., Sunose M., Onions S., Crepin D., Lagasse F., Critall M., Shannon J., Cooke M., Bretagne S., King-Underwood J., Murray J., Ito K., Strong P., Rapeport G. *In Vitro* and *In Vivo* Antifungal Profile of a Novel and Long-Acting Inhaled Azole on *Aspergillus fumigatus* Infection. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2017, **61**:e02280-16.

Shivaprakash M., Rudramurthy S.M., Colley T., Abdolrasouli A., Ashman J., Dhaliwal M., Kaur H., Armstrong-James D., Strong P., Rapeport G., Schelenz S., Ito K. and Chakrabarti A. *In vitro* antifungal activity of a novel topical triazole PC945 against emerging yeast *Candida auris*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2019, **74**(10); 2943-2949.

Kimura G., Nakaoki T., Colley T., Rapeport G., Strong P., Ito K., Kizawa Y. *In vivo* Biomarker Analysis of the Effects of Intranasally Dosed PC945, a Novel Antifungal triazole, on *Aspergillus fumigatus* Infection in immunocompromised mice. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2017, **61**:e00124-17.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I):



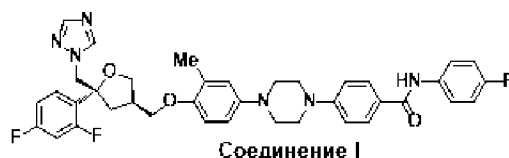
то есть 4-(4-(4-(((3*R*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-триазол-1-ил)метил)-5-(2,4-дифторфенил)тетрагидрофуран-3-ил)метокси)-3-метилфенил)пиперазин-1-ил)-*N*-(4-фторфенил)бензамид в кристаллической форме, где кристаллическая форма представляет собой полиморфную Форму 1.

2. Соединение по п. 1, отличающееся тем, что кристаллическая форма имеет рентгеновскую порошковую дифрактограмму, содержащую три, четыре, пять, шесть или семь пиков, выбранных из ($\pm 0,2$) 7,0, 7,4, 7,9, 18,2, 19,7, 20,8, 24,7 градуса 2-тета.

3. Соединение по п. 2 в форме, имеющей рентгеновскую порошковую дифрактограмму, по сути, как показано на **Фиг. 1** (Форма 1).

4. Соединение по любому из пп. 1-3, отличающееся тем, что кристаллическая форма имеет параметры элементарной ячейки 16,80 Å, 23,58 Å и 25,58 Å и углы α , β и γ , равные 90°.

5. Соединение формулы (I):



то есть 4-(4-(4-(((3*R*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-триазол-1-ил)метил)-5-(2,4-дифторфенил)тетрагидрофуран-3-ил)метокси)-3-метилфенил)пиперазин-1-ил)-*N*-(4-фторфенил)бензамид в кристаллической форме, где кристаллическая форма представляет собой полиморфную Форму 2.

6. Соединение по п. 5, отличающееся тем, что кристаллическая форма имеет рентгеновскую порошковую дифрактограмму, содержащую три, четыре, пять или шесть пиков, выбранных из ($\pm 0,2$) 10,8, 17,0, 20,3, 22,7, 23,9 и 24,3 градуса 2-тета.
7. Соединение по п. 6 в форме, имеющей рентгеновскую порошковую дифрактограмму, по сути, как показано на **Фиг. 2** (Форма 2).
8. Соединение по любому из пп. 5-7, отличающееся тем, что кристаллическая форма имеет параметры элементарной ячейки 16,81 Å, 5,65 Å и 35,56 Å и угол α 90°, угол β 101,54° и угол γ 90°.
9. Соединение по любому из пп. 1-8 для применения в качестве фармацевтического средства в комбинации со вторым или дополнительным активным ингредиентом.
10. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп. 1-8, необязательно в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми разбавителями или носителями.
11. Фармацевтическая композиция по п. 10, отличающаяся тем, что соединение по пп. 1-8 находится в форме частиц, суспендированных в водной среде.
12. Фармацевтическая композиция по п. 11, отличающаяся тем, что, водная среда содержит по меньшей мере около 40% воды, например, по меньшей мере около 60% воды, по меньшей мере около 80% воды, по меньшей мере около 95% воды, по меньшей мере около 99% воды, например, по меньшей мере около 99% воды.
13. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 10-12, отличающаяся тем, что водная среда содержит заряженный агент, регулирующий тоничность.
14. Фармацевтическая композиция по п. 13, отличающаяся тем, что заряженным агентом, регулирующим тоничность, является хлорид натрия.
15. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 10-14, отличающаяся тем, что водная среда содержит соразтворитель, например, пропиленгликоль.

16. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 10-15, отличающаяся тем, что водная среда содержит поверхностно-активное вещество, например, Lipoid S100.
17. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 10-16, отличающаяся тем, что содержит второй или дополнительный активный ингредиент.
18. Соединение для применения по п. 9 или фармацевтическая композиция по п. 17, отличающиеся тем, что второй или дополнительный активный ингредиент выбирают из противогрибковых агентов (таких как вориконазол или позаконазол), амфотерицина В, эхинокандина (такого как каспофунгин) и ингибитора 3-гидрокси-3-метил-глутарил-КоА редуктазы (такого как ловастатин, правастатин или флувастатин).
19. Соединение для применения по п. 9 или фармацевтическая композиция по п. 17, отличающиеся тем, что второй или дополнительный активный ингредиент выбирают из кандицидина, филипина, гамицина, натамицина, нистатина, римоцидина, бифоназола, бутконазола, клотримазола, эконазола, фентиконазола, изоконазола, кетоконазола, луликоназола, миконазола, омоконазола, оксиконазола, сертаконазола, сулконазола, тиоконазола альбаконазола, эфинаконазола, эпоксиконазола, флуконазола, изавуконазола, итраконазола, пропиконазола, равуконазола, терконазола, абафунгина, аморолфина, бутенафина, нафтифина, тербинафина, анидулафунгина, микафунгина, бензойной кислоты, циклопирокса, флуцитозина (5-фторцитозина), гризеофульвина, толнафтата и ундециленовой кислоты.
20. Соединение по любому из пп. 1-8 или фармацевтическая композиция по любому из пп. 10-19 для применения в качестве лекарственного средства.
21. Соединение по любому из пп. 1-8 или фармацевтическая композиция по любому из пп. 10-19 для применения при лечении микозов или для применения при предотвращении или лечении заболеваний, связанных с микозами.
22. Применение соединения по любому из пп. 1-8 или фармацевтической композиции по любому из пп. 10-19 при получении лекарственного средства для лечения микозов или для предотвращения или лечения заболеваний, связанных с микозами.
23. Способ лечения субъекта с микозом, включающий введение указанному субъекту

эффективного количества соединения по любому из пп. 1-8 или фармацевтической композиции по любому из пп. 10-19.

24. Способ предотвращения или лечения заболевания, связанного с микозом, у субъекта, который включает введение указанному субъекту эффективного количества соединения по любому из пп. 1-8 или фармацевтической композиции по любому из пп. 10-19.

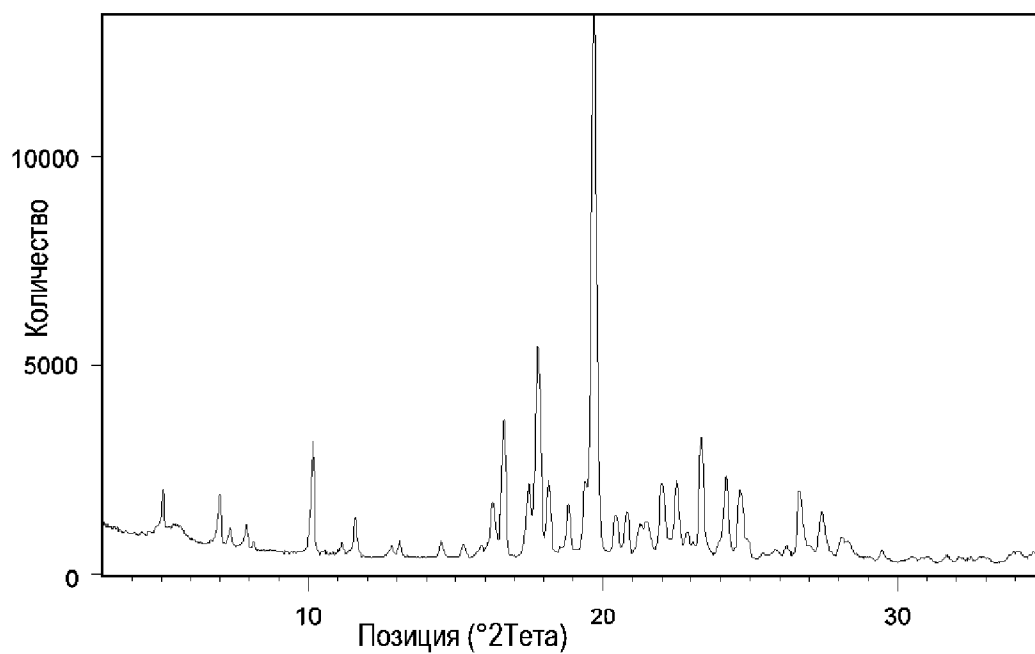
25. Соединение для применения, применение или способ по любому из пп. 21-24, отличающиеся тем, что микоз вызван *Aspergillus spp.*.

26. Соединение для применения, применение или способ по п. 25, отличающиеся тем, что *Aspergillus spp.* представляет собой *Aspergillus fumigatus* или *Aspergillus pullulans*, особенно *Aspergillus fumigatus*.

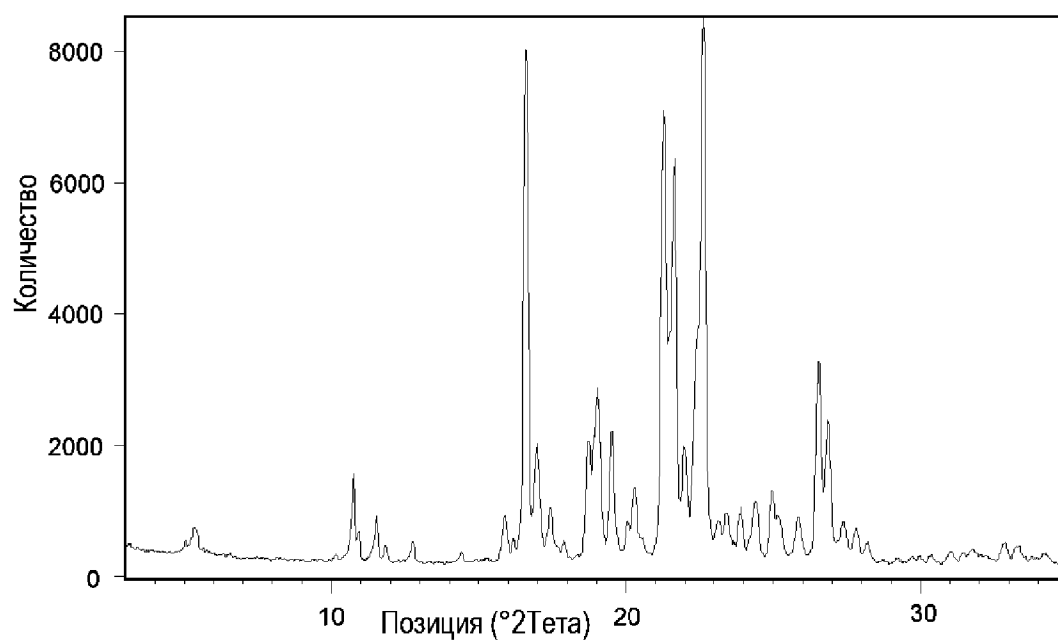
27. Соединение для применения, применение или способ по п. 26, отличающиеся тем, что *Aspergillus spp.* представляет собой устойчивый к азолам *Aspergillus fumigatus*.

28. Соединение для применения, применение или способ по любому из пп. 21-24 отличающиеся тем, что микоз вызван *Candida spp.*, например, *Candida albicans* или *Candida glabrata*; *Rhizopus spp.*, например, *Rhizopus oryzae*; *Cryptococcus spp.*, например, *Cryptococcus neoformans*; *Chaetomium spp.*, например, *Chaetomium globosum*; *Penicillium spp.*, например, *Penicillium chrysogenum* или *Trichophyton spp.*, например, *Trichophyton rubrum*.

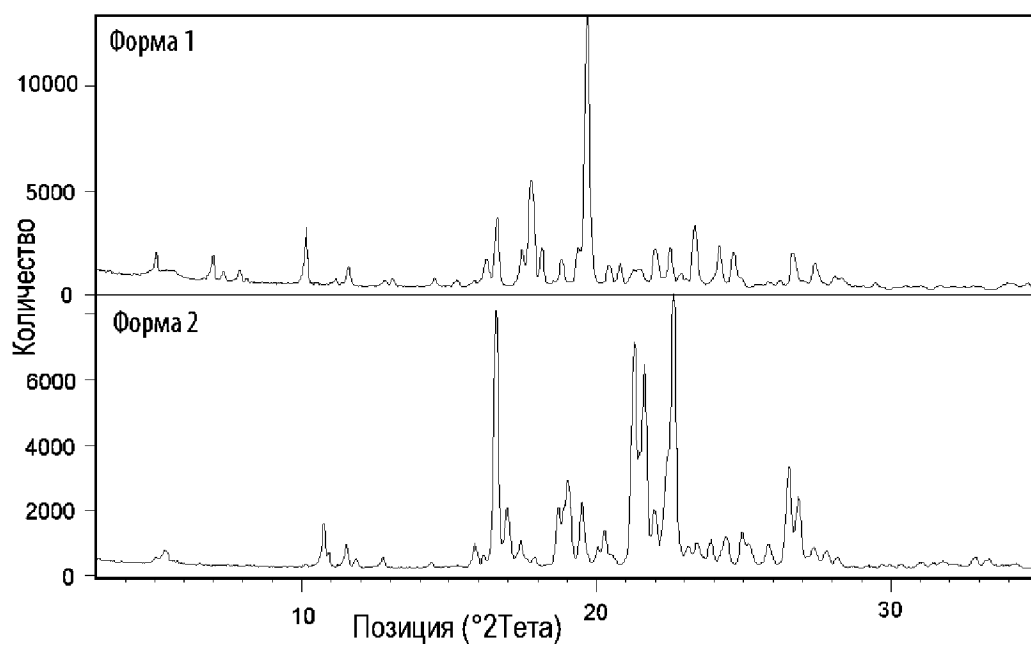
Фиг. 1



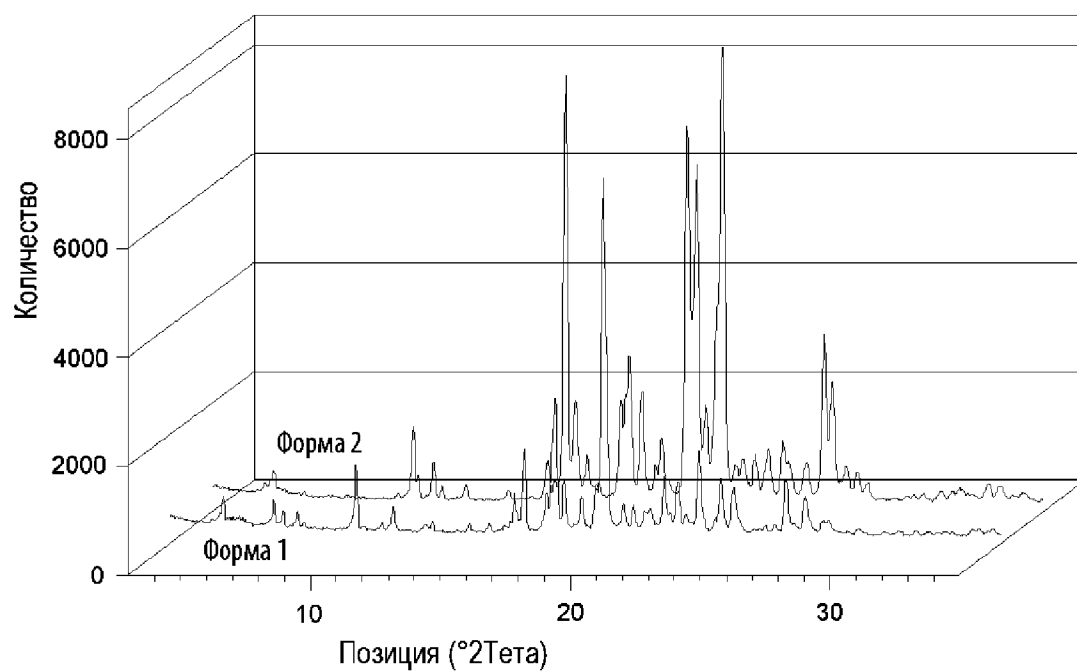
Фиг. 2



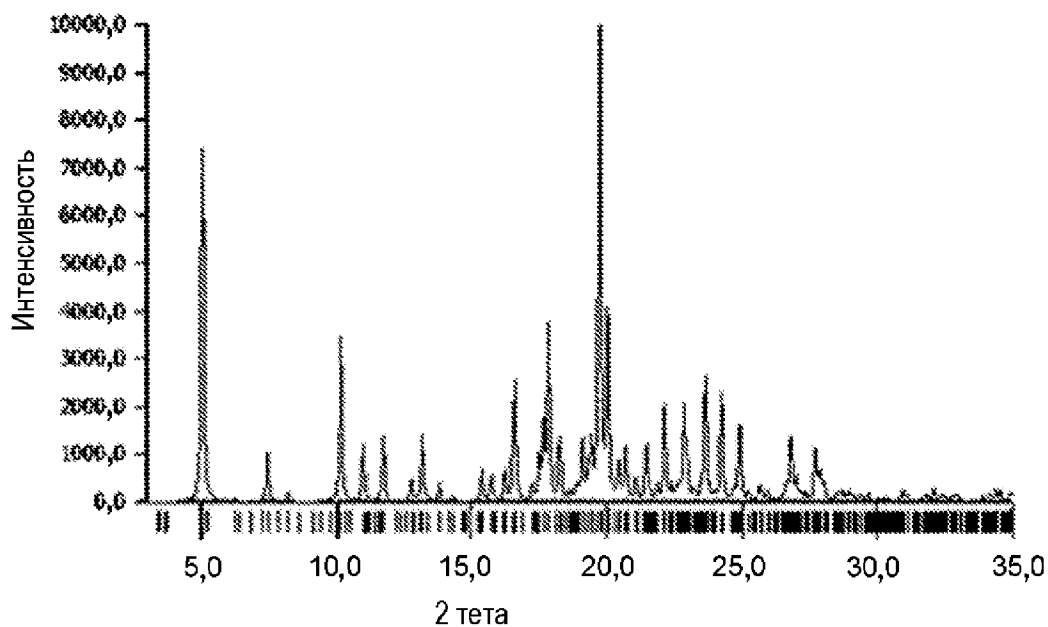
Фиг. 3



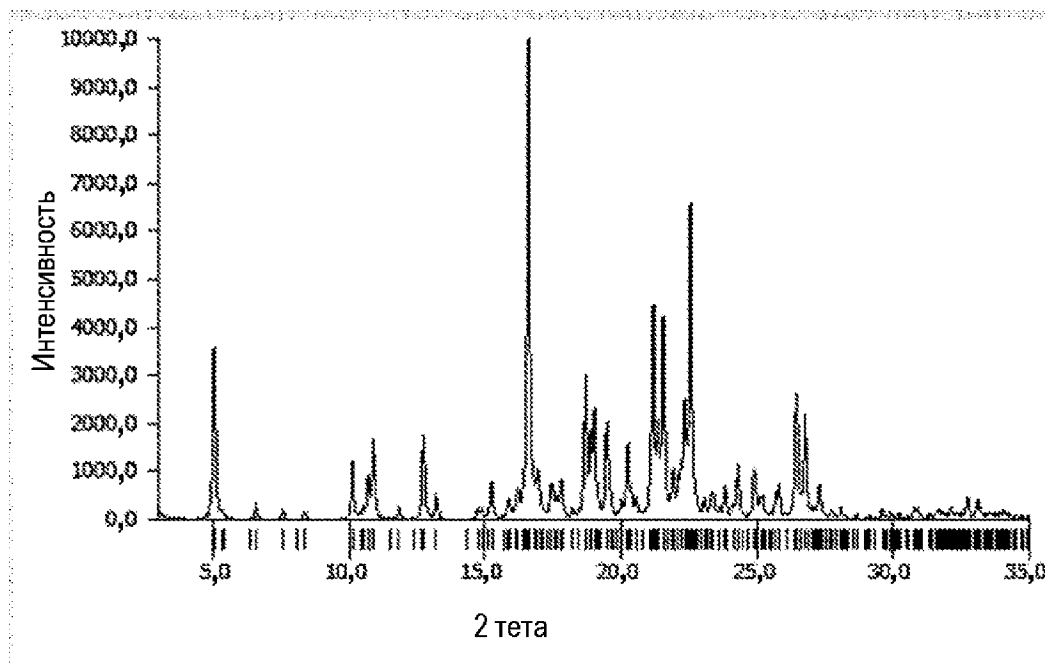
Фиг. 4



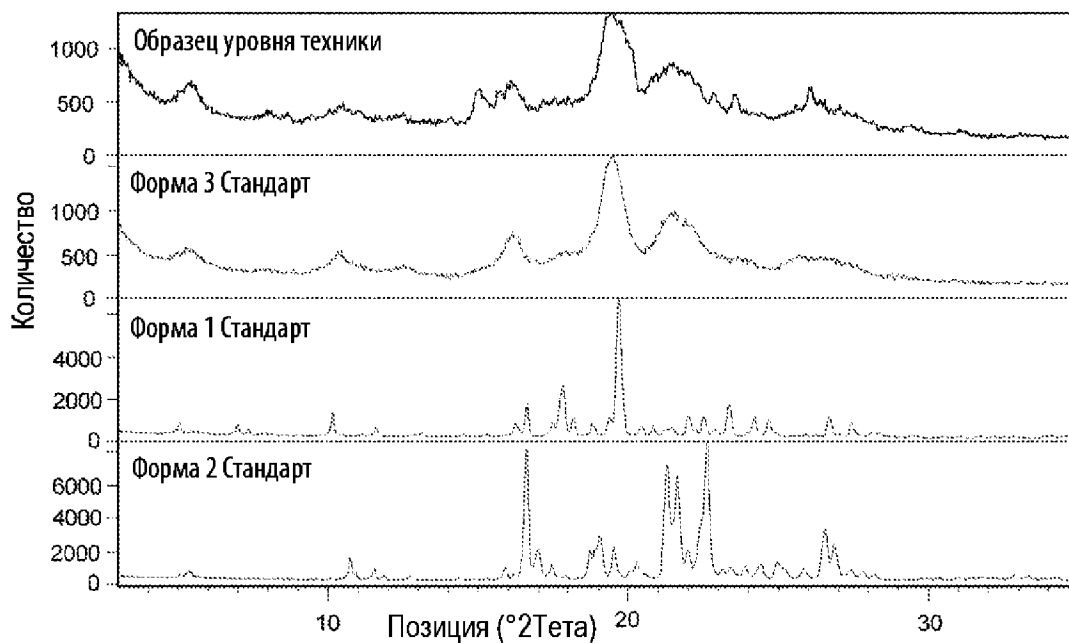
Фиг. 5



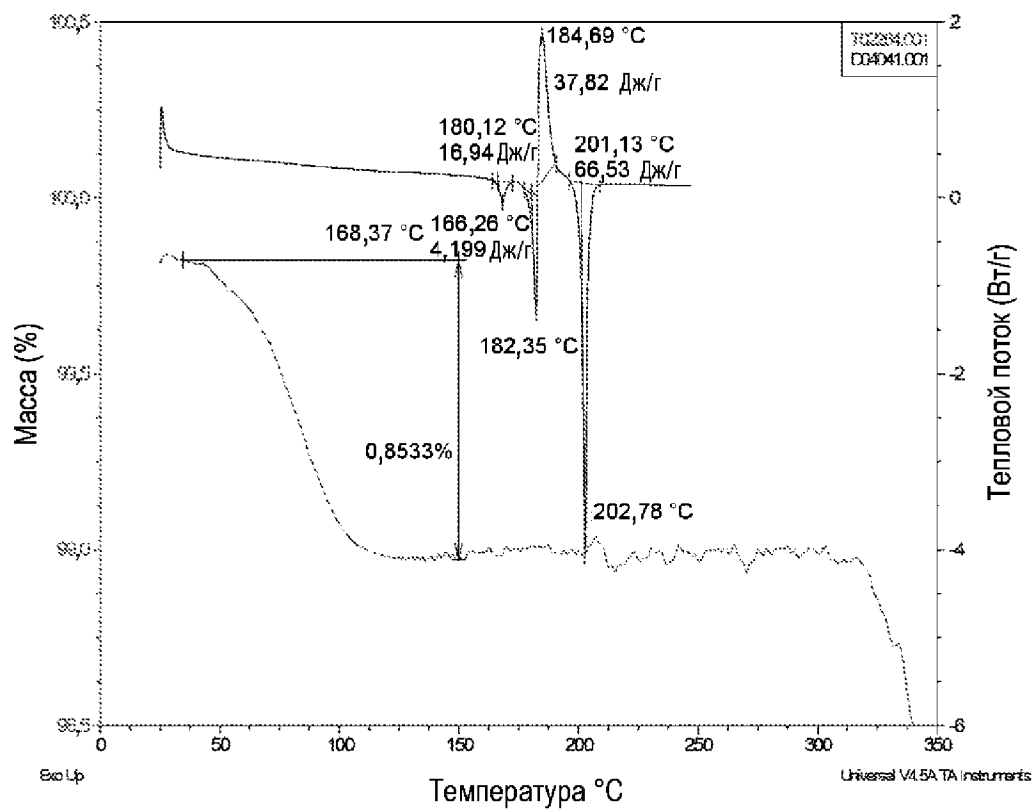
Фиг. 6



Фиг. 7



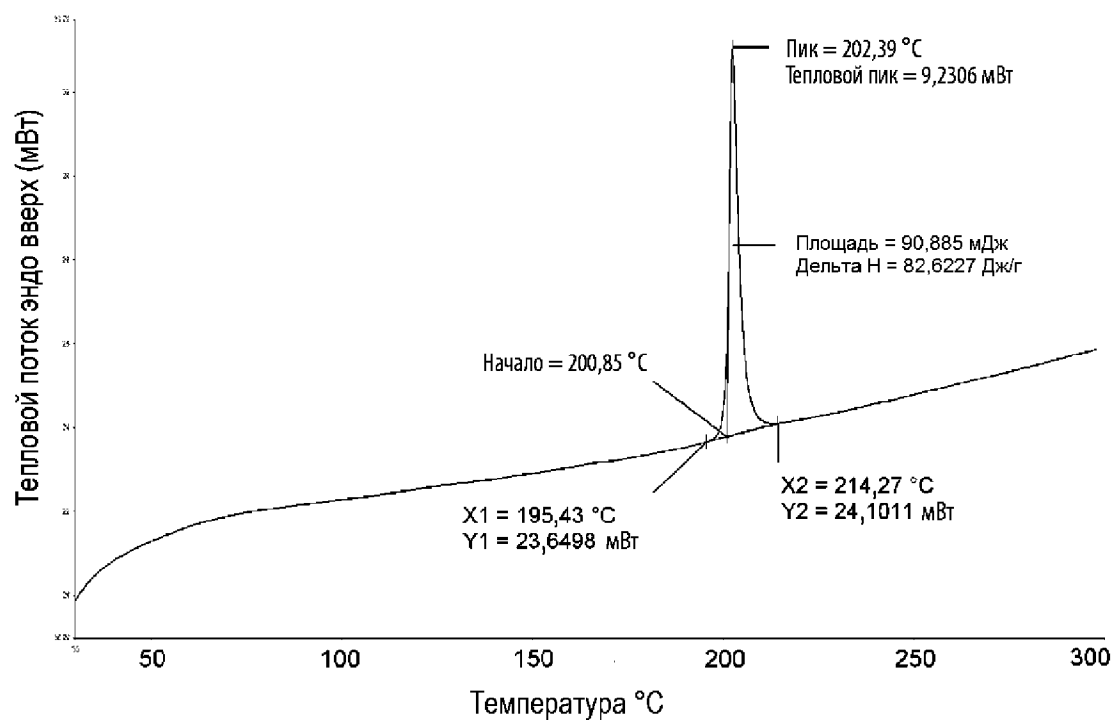
Фиг. 8



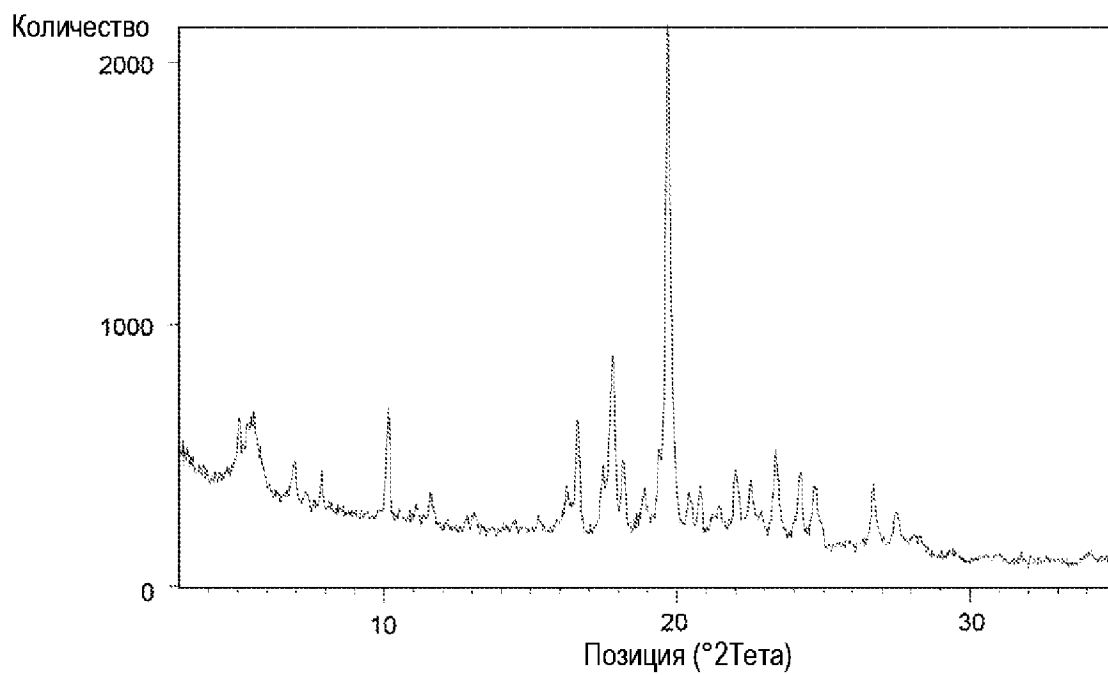
ПОЛИМОРФЫ ТРИАЗОЛЬНОГО
ПРОТИВОГРИБКОВОГО СОЕДИНЕНИЯ РС945

5/10

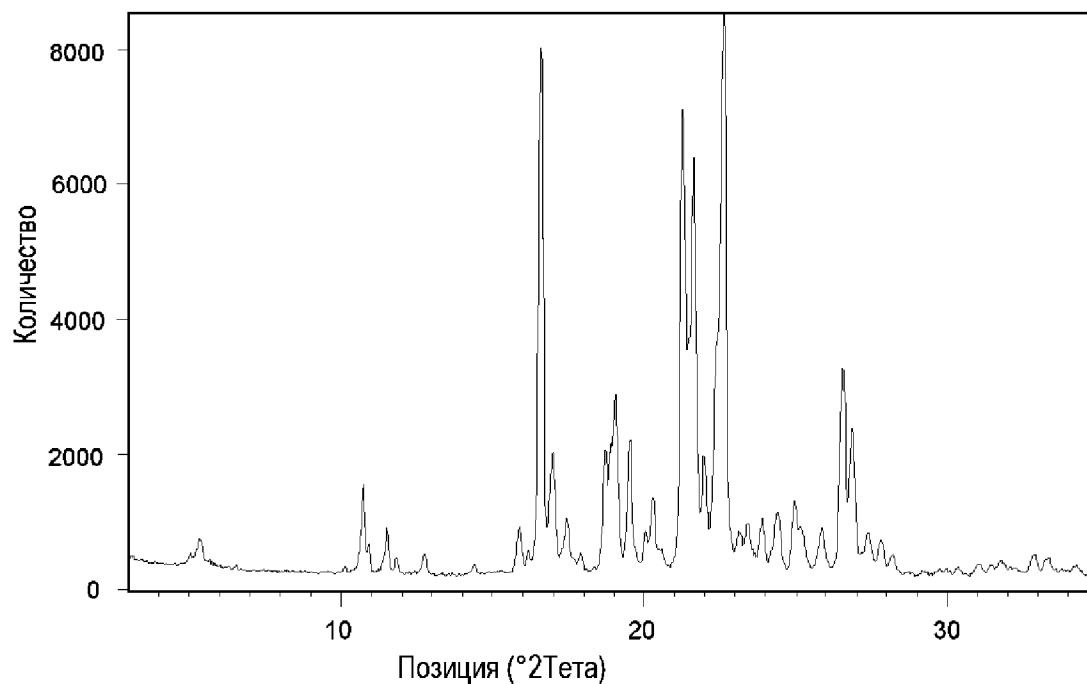
Фиг. 9



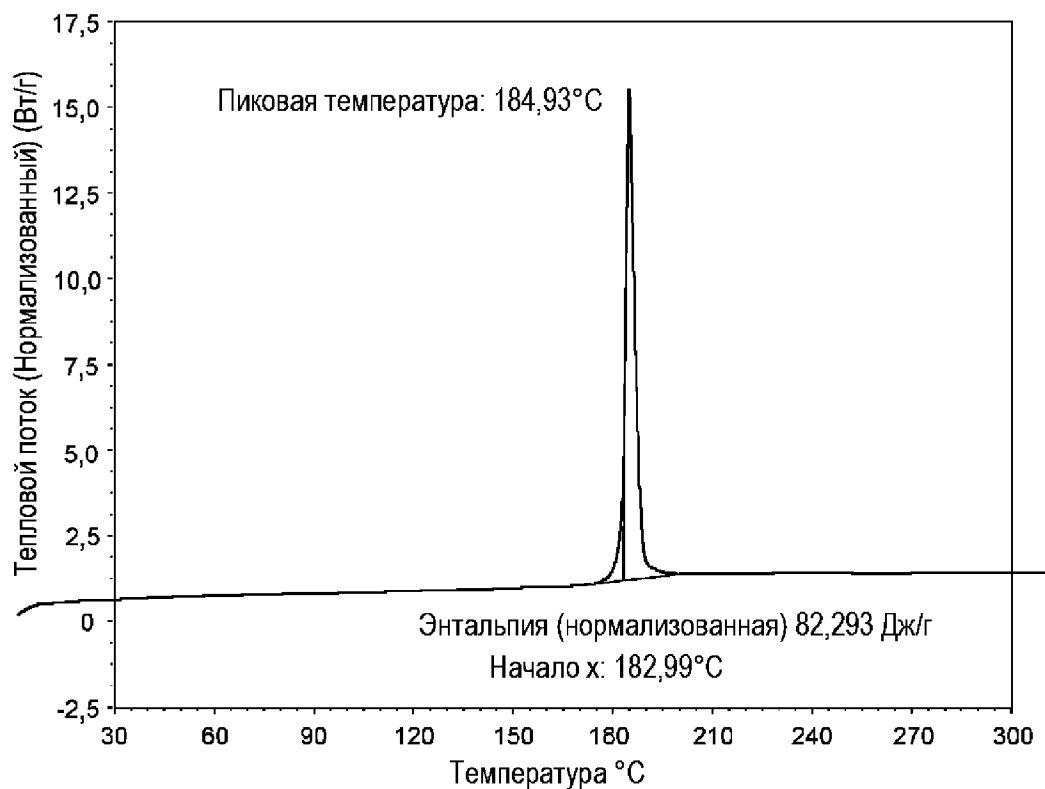
Фиг. 10



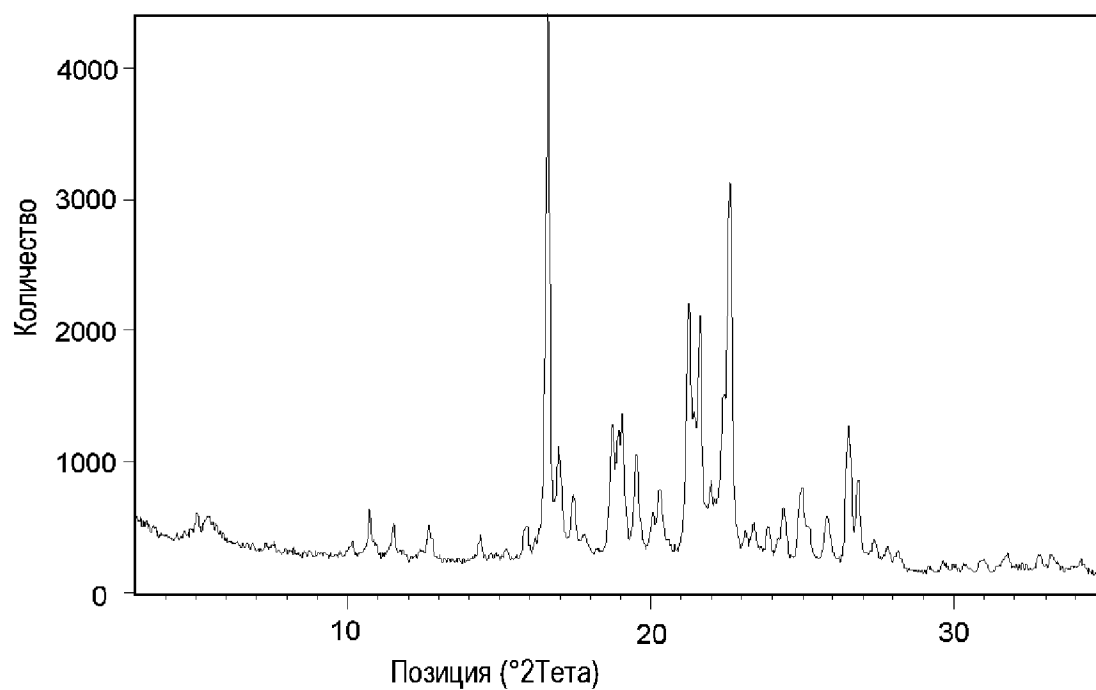
Фиг. 11



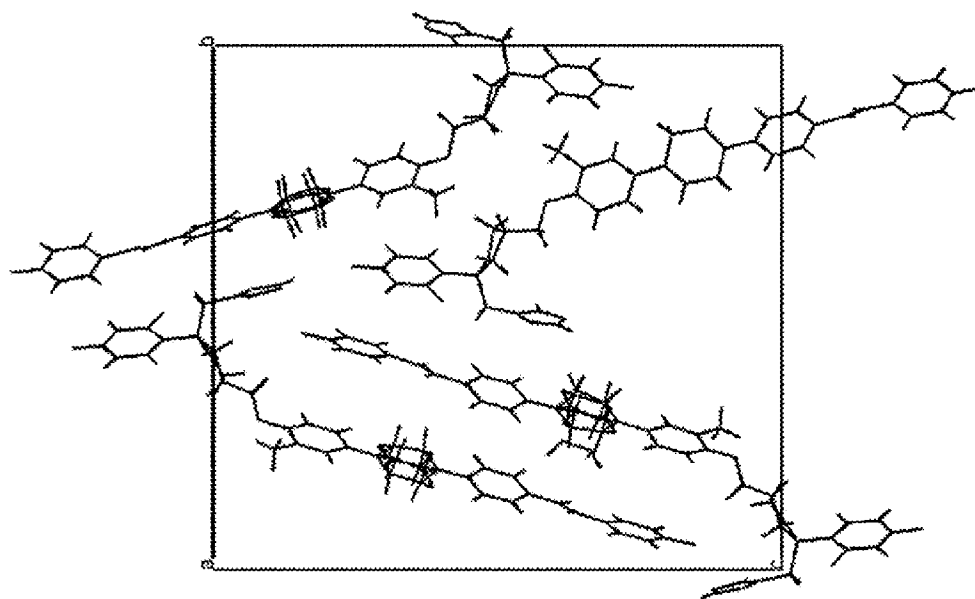
Фиг. 12



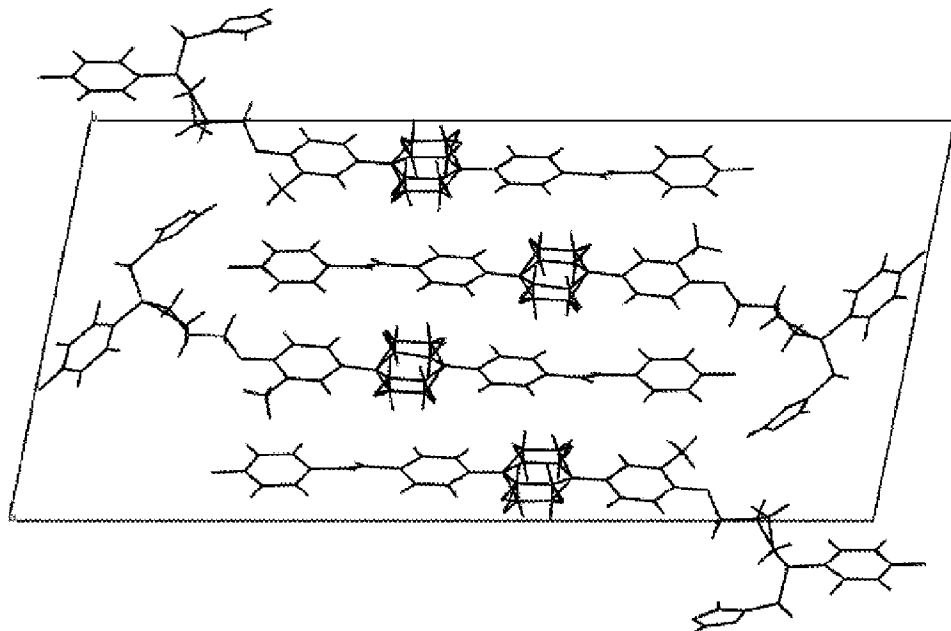
Фиг. 13



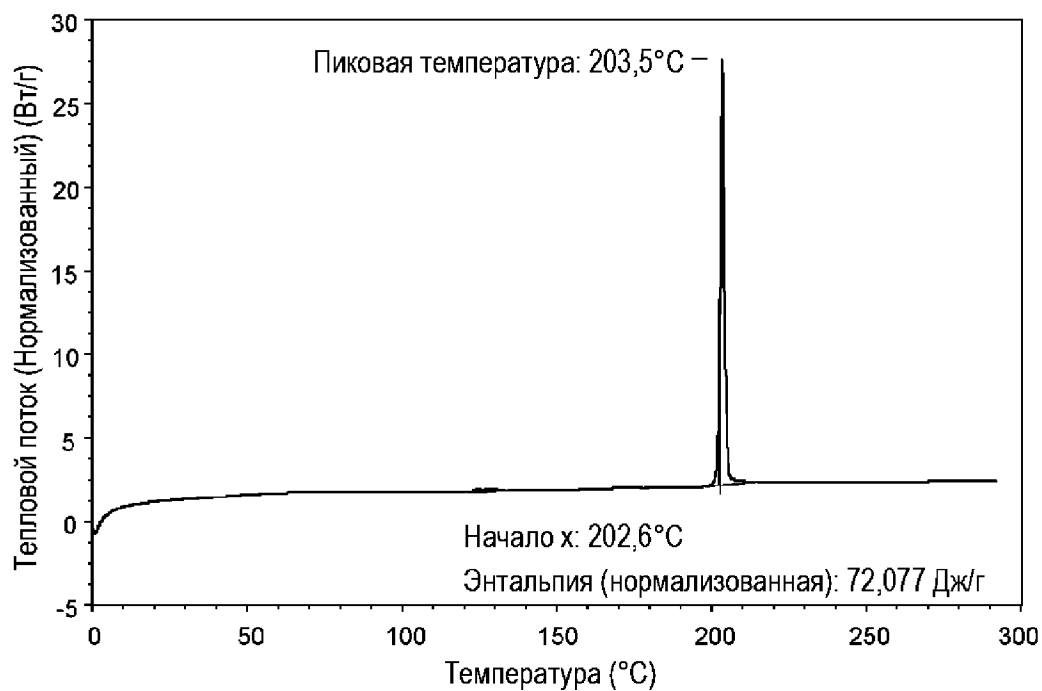
Фиг. 14



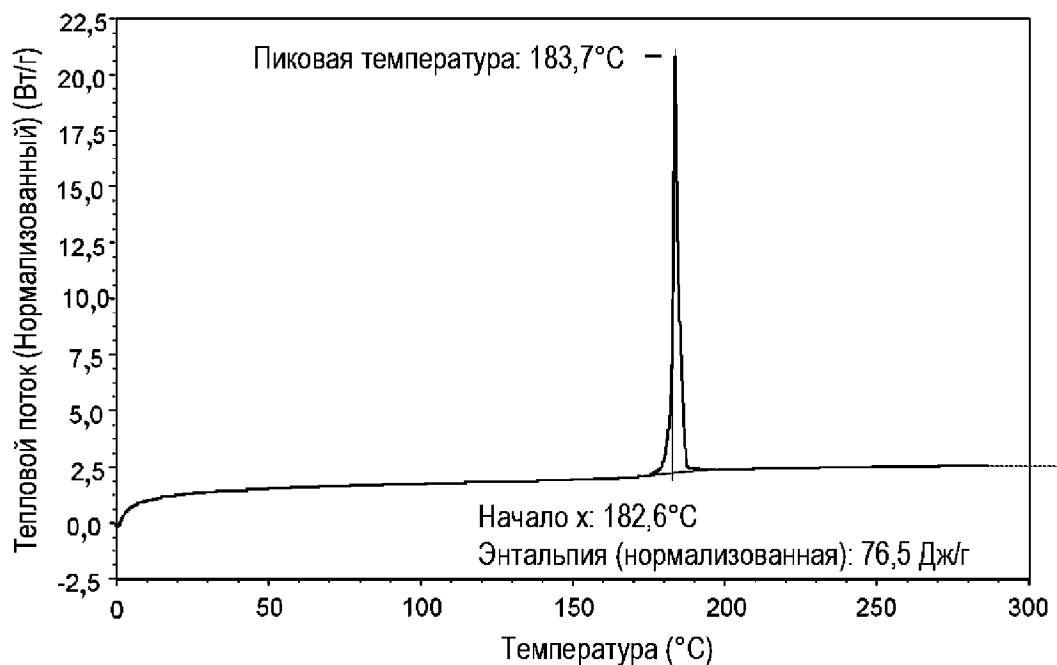
Фиг. 15



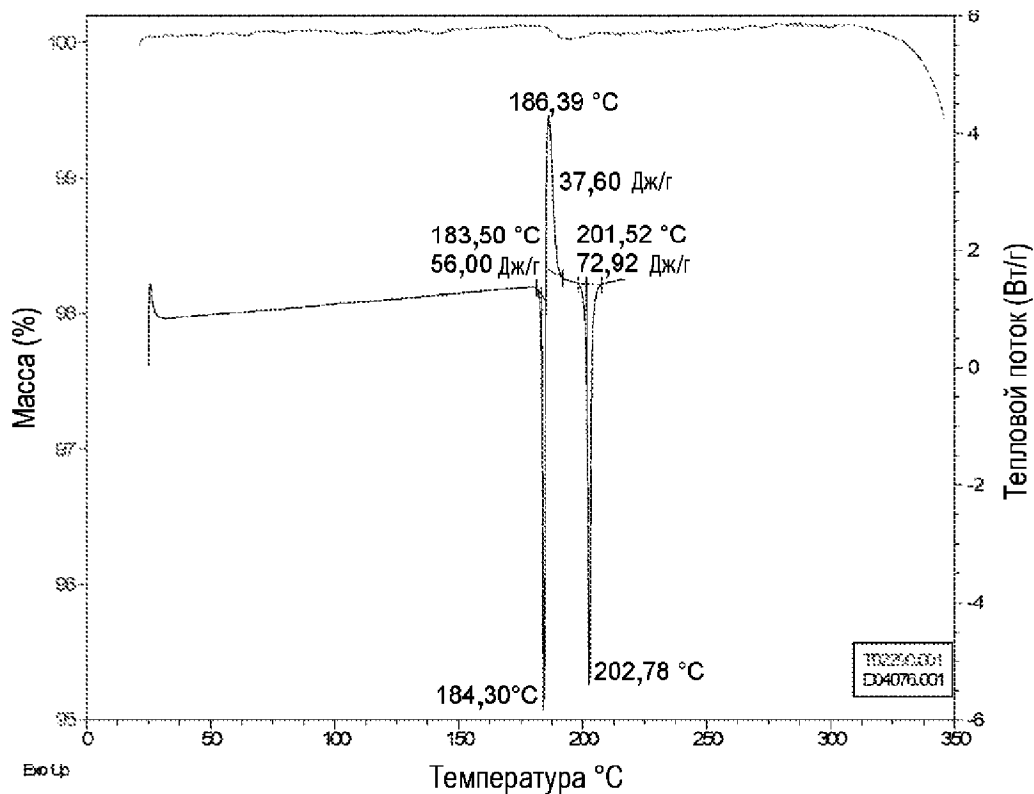
Фиг. 16



Фиг. 17

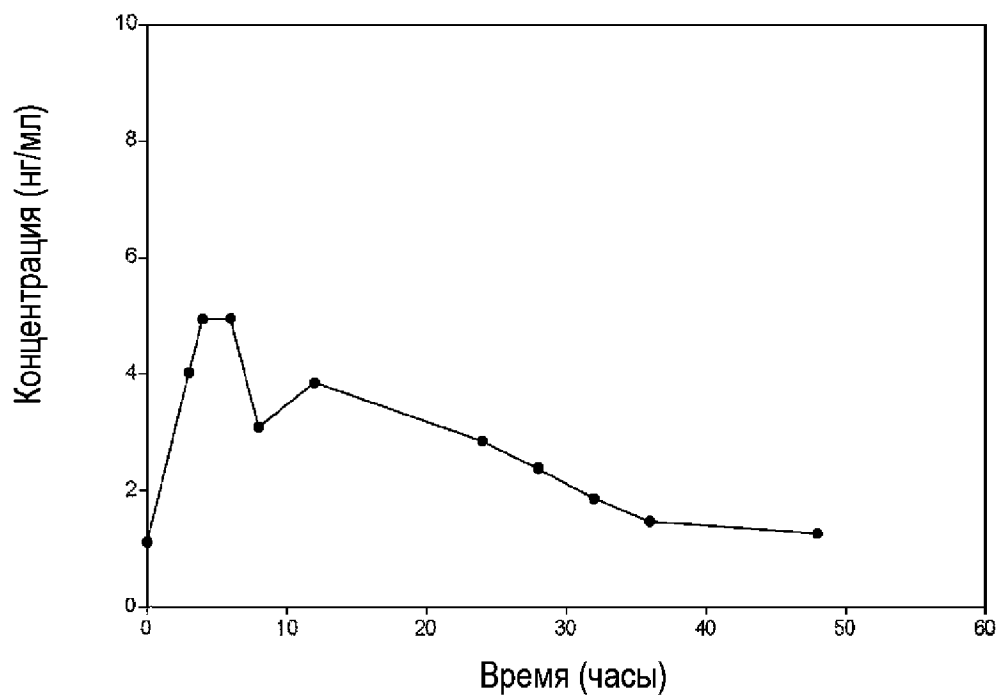


Фиг. 18



10/10

Фиг. 19



Фиг. 20

